ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Sandra
Moraña Fernández

Tesis doctoral

REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y DEL METABOLISMO CARDIOMIOCITARIO POR PARTE DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN MEDICINA CARDIOVASCULAR

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Investigación y Desarrollo de Medicamentos

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y DEL METABOLISMO CARDIOMIOCITARIO POR PARTE DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN MEDICINA CARDIOVASCULAR

Sandra Moraña Fernández

Directores: María Francisca Lago Paz

José Ramón González Juanatey

Manuel Campos Toimil

Tutor: Manuel Campos Toimil

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE PUBLICACIONES

A. Aragón-Herrera, S. Moraña-Fernández, M. Otero-Santiago, L. Anido-Varela, M. Campos-Toimil, J. García-Seara, et al., The lipidomic and inflammatory profiles of visceral and subcutaneous adipose tissues are distinctly regulated by the SGLT2 inhibitor empagliflozin in Zucker diabetic fatty rats, Biomed Pharmacother 161 (2023) 114535. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114535.

Actualmente en revisión en la revista Biochemical Pharmacology: Sandra Moraña-Fernández, Xocas Vázquez-Abuín, Alana Aragón-Herrera, Laura Anido-Varela, Javier García-Seara, Óscar Otero-García, et al., Cardiometabolic effects of sacubitril/valsartan in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

No hay barrera,
cerradura ni cerrojo
que puedas imponer
a la libertad de mi mente.

Virginia Woolf- Una habitación propia

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AGRADECEMENTOS

En primeiro lugar, gustaríame darlle as grazas aos meus directores de tese, a Dra. Francisca Lago Paz, o Dr. José Ramón González Juanatey e o Dr. Manuel Campos Toimil, por darme a oportunidade de poder traballar neste proxecto tan apaixoante, por permitirme coñecer como é traballar nun laboratorio de investigación e por guiarme durante estos 5 anos.

Grazas tamén aos meus compañeiros de laboratorio Sandra, Alana e Xocas por estar dispostos a axudar sempre que as dúbidas aparecían.

Grazas a Laura que, además de compañeira, chegou a convertirse nunha amiga fora do laboratorio, coa que puiden compartir inquietudes, problemas, alegrías, festivais e viaxes. Estou completamente segura de que, sen a túa compañía, este doutoramento sería moito más difícil, e espero que nesta nova estapa das nosas vidas, aínda que os nosos camiños vaian por lugares diferentes, poidamos manter este vínculo tan especial.

Grazas a Miguel, a Laura A, a Alfonso, a Djidji, e a María por toda esa alegría que contaxiades, por saber atopar sempre palabras de ánimo e por amenizar con tantas anécdotas os cafés.

Grazas tamén a outros moitos compañeiros do IDIS cos que tiven a sorte de compartir momentos. Grazas Fede, Pablo (Lab 15), Yousuf e María V (Lab 9), David, Rümeysa e Mon (Lab 6), e Noel (durante o teu paso polo Lab 9)

Grazas ao Dr. Oreste Gualillo e a Dra. Sonia Eiras por toda a axuda e polos consellos.

Obrigada ao Departamento de Cirurgia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e, em especial, à Professora Inês Falcão Pires por me ter acolhido no seu grupo de investigação durante o meu estágio pré-doutoral e por me ter feito sentir como em casa.

Obrigada à Inês, ao Alexandre G, ao Alexandre R, à Juliana e à Lidiane, não só por tudo o que aprendi convosco, mas também pelos “Miércoles de Copas”, pelas francesinhas e os 100 Montaditos, pelas canecas depois de um dia difícil, pelos “concertos" durante a calibração dos Oroboros, por me ensinarem o pouco português (e brasileiro) que sei, e por fazerem de tudo um motivo de festa e celebração, mesmo quando tínhamos de trabalhar até tarde. Tenho muitas saudades de todos vós.

Obrigada à Cláudia e à Liliana pela vossa ajuda e por terem sido tão pacientes comigo. Obrigada à Zita, por ter cuidado tão bem de mim.

Grazas a Tomás e a Nuria, os meus profesores de Química e Física no instituto, por descubrirme a beleza das ciencias, en especial da Química.

Grazas a miña psicóloga Ana, por axudarme nesta etapa onde tantas veces me sentín perdida, por ensinarme a xestionar dunha forma máis saudable todo o que acontece ao meu redor, por axudarme a comprender por qué suceden certas cousas, e por facerme entender que otras cousas suceden sen máis.

Grazas aos meus amigos María, Claudia, Matías, Borja e Sandra D por todo o cariño e apoio. Grazas por impulsarme a sair fora da miña zona de confort, aínda que as veces sexa un pouco difícil. Síntome moi agradecida de que formedes parte da miña vida e de que, a pesar de que todos tomásemos camiños bastante diferentes, sempre atopemos a forma de volver a coincidir, para actualizar as nosas vidas, compartir os logros, e recordar que esos adolescentes que algún día fumos seguen habitando dentro de nós.

Grazas a Sandra, a persoa que mellor me coñece (despóis de miña nai) por acompañarme ao longo destos máis de dez anos nos bos e, sobre todo, nos malos momentos, por ensinarme o que é a amizade verdadeira, e por demostrarme que a familia tamén se escolle. Grazas por estar sempre ao meu carón, aconsellándome, escoitándome ou simplemente acompañándome. Grazas tamén por ser unha das mellores compañeiras de piso que puiden ter, e pola gran cantidade de anécdotas que aportaches a miña vida. Sei que agora o futuro parece algo incerto, pero non teño dúbida alguna de que mellorará e, senón, polo menos sempre nos teremos a unha á outra.

Grazas a Sara pola amizade, pola compresión e por aportar esa calma que as veces tanto necesito. Grazas pola diversión nos dous anos de convivencia e perdón polos traumas xerados. Grazas por ser esa persoa á que podo recurrir cando penso que calquera dor ou mancha nova na miña pel é un indicador de morte inmediata, e por axudarme con algún dos conceptos médicos desta tese, que a miña mente de Química non era capaz de comprender. Eres todo un exemplo a seguir.

Grazas a Rebeca, mellor dito, Dra. Rebeca, pola túa amizade, por todas esas tardes de cafés, polos consellos, e por sempre estar ahí, disposta a axudar. Estou moi orgullosa de todo o que conseguiches. Estou segura que o futuro che depara grandes oportunidades.

Grazas a Silvia, por todos estos anos de amizade, polas risas durante as prácticas de laboratorio da carreira e, sobre todo, por todas esas tardes onde compartimos as nosas inquedanzas na de Luis. Espero seguir celebrando moitos 25 de xullo na túa compaña.

Grazas a Pedro, por chegar á miña vida para enchela de cores, e por facerme tan feliz. Grazas por acompañarme nesta etapa e por apoiarme, incluso cando ás veces non o poño fácil, e sobre todo grazas polo soporte informático. Son moi afortunada de que os nosos camiños se atopasen, e de poder compartir esta viaxe contigo.

Grazas aos meus tíos Divina e Avelino, e aos meus padriños Mary e Elías, por todo o cariño, pola vosa axuda e por preocuparvos sempre por min. Grazas a miña avoa Carmucha porque, a pesar de non entender moi ben a que me dediquei estos últimos anos, sempre estivo preocupada de que todo me fose ben e, sobre todo, de que fose feliz.

Grazas a miña nai, polo amor e o apoio incondicional, por axudarme sempre que o necesitei e por respetar cada unha das decisións que tomei, aínda que ás veces non fosen as correctas. Grazas por ensinarme a loitar polo que un quere e, sobre todo, grazas por ensinarme que ás veces é necesario parar para poder avanzar. Sen ti, esta tese non sería posible.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Grazas a min mesma, pola constancia e por non rendirme.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABREVIATURAS I
SUMMARY XV
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR 1
1.1.1. Factores de riesgo cardiovascular 1
1.1.1.1. Factores de riesgo modificables 2
1.1.1.2. Factores de riesgo no modificables 4
1.2. SÍNDROME CARDIOMETABÓLICO Y RIESGO CARDIOVASCULAR 5
1.2.1. Obesidad 5
1.2.1.1. Epidemiología de la obesidad 5
1.2.1.2. Diagnóstico y clasificación de la obesidad 5
1.2.1.3. Fisiopatología de la obesidad 6
1.2.1.3.1. Hiperplasia e hipertrofia 7
1.2.1.3.2. Angiogénesis e hipoxia 8
1.2.1.3.3. Distribución corporal del tejido adiposo 8
1.2.1.3.4. Fibrosis 9
1.2.1.3.5. Inflamación 9
1.2.1.3.6. Estrés oxidativo 10
1.2.1.3.7. Resistencia a la insulina y lipotoxicidad 10
1.2.1.4. Tratamiento de la obesidad 11
1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2 11
1.2.2.1. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2 12
1.2.2.2. Síntomas y diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2 13
1.2.2.3. Fisopatología diabetes mellitus tipo 2 14
1.2.2.3.1. Disfunción de las células β-pancreáticas 14
1.2.2.3.2. Alteraciones de la gluconeogénesis 15
1.2.2.4. Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 15
1.2.2.4.1. Tratamiento farmacológico 15

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2.4.1.1. Insulina 15
1.2.2.4.1.2. Biguanidas 15
1.2.2.4.1.3. Agonistas del receptor del péptido 1 similar a la glucosa ... 16
1.2.2.4.1.4. Tiazolidinadionas (TZD) 16
1.2.2.4.1.5. Sulfonilureas 17
1.2.2.4.1.6. Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) 17
1.2.2.4.1.7. Inhibidores del co-transportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) 18
1.2.2.5. Empagliflozina 21
1.2.2.5.1. Posología y propiedades farmacocinéticas de la empagliflozina 21
1.2.2.5.2. Ensayos clínicos de la empagliflozina 22
1.2.2.5.3. Empagliflozina en el sistema cardiovascular 26
1.2.2.5.3.1. Empagliflozina y fibrosis *26*
1.2.2.5.3.2. Empagliflozina e hipertrofia *27*
1.2.2.5.3.3. Empagliflozina y cardiotoxicidad producida por agentes quimioterapéuticos *27*
1.2.2.5.3.4. Empagliflozina, apoptosis y estrés oxidativo *28*
1.2.2.5.3.5. Empagliflozina e inflamación *28*
1.2.2.5.3.6. Empagliflozina y metabolismo energético *29*
1.3. INSUFICIENCIA CARDÍACA 30
1.3.1. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca 30
1.3.2. Síntomas y diagnóstico de la insuficiencia cardíaca 31
1.3.3. Clasificación de la insuficiencia cardíaca 33
1.3.3.1. Clasificación según la fracción de eyección del ventrículo izquierdo 33
1.3.3.2. Clasificación según las guías del colegio americano de cardiología y la asociación estadounidense del corazón 34
1.3.3.3. Clasificación de la asociación neoyorquina del corazón 34
1.3.4. Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada 35
1.3.4.1. Alteraciones neurohormonales 35
1.3.4.1.1. Sistema nervioso simpático 36

1.3.4.1.2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona 36
1.3.4.1.3. Sistema de péptidos natriuréticos 39
1.3.4.2. Hipertrofia y fibrosis 41
1.3.4.3. Inflamación 41
1.3.4.4. Metabolismo 42
1.3.5. Tratamiento 44
1.3.5.1. Dispositivos implantables 45
1.3.5.2. Farmacoterapia 45
1.3.5.2.1. Diuréticos 45
1.3.5.2.2. β-bloqueantes 46
1.3.5.2.3. Inhibidores del SRAA 46
1.3.5.2.3.1. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs) *46*
1.3.5.2.3.2. Antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina II *47*
1.3.5.2.4. Antagonistas del receptor de mineralocorticoides 47
1.3.5.2.5. Inhibidores del co-transportador de sodio-glucosa tipo 2 47
1.3.5.2.6. Estimuladores de la guanilato ciclasa soluble 48
1.3.5.2.7. Inhibidor dual del receptor AT1 de la Ang II y de la neprilisina 48
1.3.6. Sacubitril/valsartán 49
1.3.6.1. Posología y propiedades farmacocinéticas del sacubitril/valsartán 50
1.3.6.2. Ensayos clínicos del sacubitril/valsartán 50
1.3.6.2.1. Ensayos clínicos del sacubitril/valsartán en pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida 50
1.3.6.2.2. Ensayos clínicos del sacubitril/valsartán en pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada 62
1.3.6.3. Sacubitril/valsartán en el sistema cardiovascular 68
1.3.6.3.1. Sacubitril/valsartán y remodelado cardíaco 68
1.3.6.3.2. Sacubitril/valsartán, fibrosis e hipertrofia cardíaca 68
1.3.6.3.3. Sacubitril/valsartán y cardiotoxicidad producida por agentes quimioterapéuticos 69
1.3.6.3.4. Sacubitril/valsartán, estrés oxidativo, inflamación y apoptosis 69

1.3.6.3.5. Sacubitril/valsartán y metabolismo energético 70
2. OBJETIVOS 73
3. MATERIALES Y MÉTODOS 77
3.1. ÉTICA 77
3.1.1. Tratamiento *in vivo* con empagliflozina 77
3.1.2. Tratamiento *in vivo* con sacubitril/valsartán 77
3.1.3. Tratamiento *in vitro* con sacubitril/valsartán 77
3.2. ANIMALES 78
3.2.1. Ratas ZDF 78
3.2.2. Ratas ZSF1 78
3.2.3. Neonatos de rata Sprague-Dawley 79
3.3. CULTIVOS CELULARES 80
3.3.1. Línea celular HL-1: cardiomiocitos auriculares adultos de ratón 80
3.3.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata 80
3.4. TRATAMIENTOS CON LOS MEDICAMENTOS OBJETO DE ESTUDIO 82
3.4.1. Tratamiento *in vivo* con empagliflozina de ratas ZDF 82
3.4.2. Tratamiento *in vivo* con sacubitril/valsartán de ratas ZSF1 82
3.4.3. Tratamientos *in vitro* con sacubitril/valsartán (LBQ657 + valsartán). 82
3.5. SAL DE BROMURO DE 3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL]-2,5 DIFENIL TETRAZOLIO (MTT): ENSAYO DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL 83
3.6. ENSAYO DE CAPTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS (BODIPY®) 84
3.7. MICROSCOPÍA CONFOCAL 85
3.8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS 86
3.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 87
3.10. WESTERN BLOT 87
3.11. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO 89
3.12. TRANSCRIPCIÓN REVERSA 90
3.13. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL 90
3.14. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA Y DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LOS EXPERIMENTOS *IN VIVO* CON ANIMALES 92

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.15. ANÁLISIS ECOCARDIOGRÁFICO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 92

3.16. EVALUCIÓN DE LA TOLERANCIA AL EJERCICIO Y DEL METABOLISMO RESPIRATORIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 94

3.17. TEST DE FUERZA DE AGARRE DE LAS EXTREMIDADES ANTERIORES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 95

3.18. EVALUCIÓN DE PARÁMETROS METABÓLICOS DE LAS RATAS ZSF1 96

3.19. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS EN EL PLASMA Y SUERO DE LOS ANIMALES 96

3.20. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE LOS TEJIDOS DE LOS ANIMALES 97

3.21. EVALUACIÓN DE LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO MITOCONDRIAL EN TEJIDOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 99

3.22. ANÁLISIS METABOLÓMICOS EN TEJIDOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 103

3.22.1. Extracción de metabolitos 103

3.22.2. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas 105

3.22.3. Procesamiento previo de los datos del estudio metabolómico 109

3.22.4. Clasificación de los metabolitos 110

3.23. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 112

3.23.1. Análisis estadísticos utilizados en los experimentos *in vivo* e *in vitro* 112

3.23.2. Análisis estadístico de los ensayos de metabolómica y lipidómica 112

4. RESULTADOS 117

4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE EMPAGLIFLOZINA SOBRE EL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATAS ZDF 117

4.1.1. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre el control glucémico de las ratas ZDF 117

4.1.2. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios, antiinflamatorios y de macrófagos en el tejido adiposo de las ratas ZDF 118

4.1.3. El tratamiento con empagliflozina no modificó el área de adipocitos del tejido adiposo de las ratas ZDF 120

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.4. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre la expresión génica de marcadores profibróticos en el tejido adiposo de las ratas ZDF 120

4.1.5. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre la expresión de los componentes del complejo uniportador de calcio mitocondrial en el tejido adiposo de las ratas ZDF 122

4.1.6. Estudio del lipidoma del tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas ZDF tras el tratamiento con empagliflozina 122

4.1.7. El tratamiento con empagliflozina modificó el metabolismo lipídico en el tejido adiposo de las ratas ZDF 131

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL LBQ657 + VALSARTÁN *IN VITRO* 133

4.2.1. Efecto *in vitro* del LBQ657 + valsartán sobre la viabilidad cardiomiocitaria 133

4.2.2. Efecto del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la captación de ácidos grasos en la línea celular HL-1 133

4.2.3. Efecto del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la movilización del receptor de glucosa GLUT4 en cardiomiocitos neonatales de rata 134

4.2.4. Evaluación de los efectos del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la lipólisis en cardiomiocitos neonatales de rata 136

4.2.5. Efecto del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la regulación de la autofagia en cardiomiocitos neonatales de rata 136

4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SACUBITRIL/VALSARTÁN EN EL METABOLISMO CARDÍACO DE RATAS ZSF1 139

4.3.1. El tratamiento con sacubitril/valsartán no modificó los parámetros metabólicos de las ratas ZSF1 139

4.3.2. Características generales de las ratas ZSF1 tras el tratamiento con sacubitril/valsartán 143

4.3.3. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre la función diastólica de las ratas ZSF1 148

4.3.4. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre la tolerancia al ejercicio en ratas ZSF1 150

4.3.5. Test de fuerza de agarre de las extremidades anteriores de las ratas ZSF1 152

4.3.6. Sacubitril/valsartán disminuye la hipertrofia y la fibrosis del ventrículo izquierdo en ratas ZSF1 152

4.3.7. El tratamiento con sacubitril/valsartán mejora la esteatosis hepática en ratas ZSF1 154

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.8. Efecto del sacubitril/valsartán sobre la respiración mitocondrial del tejido cardíaco y hepático de las ratas ZSF1 155

4.3.9. Análisis del perfil metabólico del ventrículo izquierdo de las ratas ZSF1 tras el tratamiento con sacubitril/valsartán 159

5. DISCUSIÓN 167

5.1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON EMPAGLIFLOZINA EN UN MODELO ANIMAL DE OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS TIPO 2 167

5.1.1. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre los niveles circulantes de fructosamina y albúmina en ratas ZDF 167

5.1.2. Efecto del tratamiento de la empagliflozina sobre la fibrosis e hipertrofia en el tejido adiposo de las ratas ZDF 168

5.1.3. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre los niveles de biomarcadores de inflamación en el tejido adiposo de las ratas ZDF 168

5.1.4. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre el metabolismo energético del tejido adiposo en ratas ZDF 170

5.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON SACUBITRIL/VALSARTÁN EN UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDÍACA CON FRACCIÓN DE EYECCIÓN PRESERVADA Y EN CARDIOMIOCITOS EN CULTIVO 174

5.2.1. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre las características generales de las ratas ZSF1 174

5.2.2. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre la función cardíaca de las ratas ZSF1 177

5.2.3. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre el metabolismo de la glucosa en las ratas ZSF1 178

5.2.4.* Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre el metabolismo cardiomiocitario *in vitro 179

5.2.5. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre el metabolismo cardíaco de las ratas ZSF1 182

5.2.6. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán en el músculo esquelético de las ratas ZSF1 184

5.2.7. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán en el hígado de las ratas ZSF1 185

6. CONCLUSIONS 189

7. BIBLIOGRAFÍA 193

ANEXOS 273

USC DE COMPOSTELA

ANEXO I: CONFLICTO DE INTERESES 273

ANEXO II: LISTA DE PUBLICACIONES INCLUÍDAS EN ESTA TESIS PERMISOS 275

ANEXO III: PERMISOS 281

ANEXO IV: IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS 298

ANEXO V: CHECKLIST 300

ANEXO VI: FINANCIACIÓN 309

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

ΔRQ: variación en el coeficiente respiratorio

αSMA: actina alfa del músculo liso

12,13-diHOME: ácido 12,13-dihidroxi-9-octadecenoico

14,15-EET: ácido 14,15-epoxieicosatrienoico

20-HETE: ácido 20-hidroxieicosatetraenoico

2D: 2 dimensiones

A: onda de llenado ventricular durante la contracción auricular

AA: aminoácidos

AC: acil carnitinas

Ac: anticuerpo

ACC: *American College of Cardiology*

Acetil-CoA: acetil-coenzima A

Ácido carb: ácidos carboxílicos

ACN: acetonitrilo

ACS: acil-CoA sintetasa

ADA: *American Diabetes Association*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADP: adenosín difosfato

AGE: productos finales de glicación avanzada

AHA: *American Heart Association*

AI: aurícula izquierda

AKT: proteína quinasa B

ALT: alanina aminotransferasa

Ama: antimicina A

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AMPK: proteína kinasa activada por adenosín monofostato

Ang I: angiotensina I

Ang II: angiotensina II

Ang-(1-7): angiotensina 1-7

Ang-(1-9): angiotensina 1-9

ANP: péptido natriurético auricular

APS: persulfato amónico

AQP: acuagliceroporina

AR: receptores adrenérgicos

Ara C: arabinósido de citosina

ARA II: agonistas de los receptores de Ang II tipo 1

ARE: elemento de respuesta antioxidante

ARM: agonistas del receptor de mineralocorticoides

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: inhibidor del receptor de angiotensina-neprilisina

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARRIVE: *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*

As: ascorbato

AST: aspartato aminotransferasa

AT1R: receptor de Ang II tipo 1

AT2R: receptor de Ang II tipo 2

ATF4: factor de transcripción activador 4

Atg3: proteína 3 relacionada con la autofagia

Atg5: proteína 5 relacionada con la autofagia

Atg7: proteína 7 relacionada con la autofagia

ATGL: lipasa adipocítica de triglicéridos

ATP: adenosín trifosfato

ATPasa: adenosintrifosfatasa

AUC: área bajo la curva

Azd: azida

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B2R: receptor de bradiquinina tipo 2

BA: ácidos biliares

BAToquinas: *brown adipose tissue adipokines*

Beclin1: beclina 1

BIOPS: disolución de relajación y preservación de biopsias

BNP: péptido natriurético tipo B o péptido natriurético cerebral

BODIPY®: 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

BSA: seroalbúmina bovina

C6M: caminata de los 6 minutos

CACT: carnitina acilcarnitina translocasa

CC: control de calidad

CCCP: cianuro de carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CCR2: receptor de quimiocina CC-2

Cd36: clúster de diferenciación 36 o translocasa de ácidos grasos

CEBEGA: Centro de Biomedicina Experimental

Cer: ceramidas

CHO: derivados de carbohidratos

Cho: colesterol

ChoE: ésteres de colesterol

CiMUS: Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de Santiago de Compostela

Cit c: citocromo c

CNP: péptido natriurético tipo C

CO: gasto cardíaco

CoA: coenzima A

CoA deriv: derivados de la coenzima A

col1a1: cadena alfa 1 del colágeno tipo I

col3a1: cadena alfa 1 del colágeno tipo III

col6a3: cadena alfa 3 del colágeno tipo VI

USC DE COMPOSTELA

CPT1: carnitina palmitoiltransferasa I

CPT2: carnitina palmitoiltransferasa II

CRP: proteína C reactiva

CTE: cadena de transporte de electrones

CV: cardiovascular

DAPC: diacilglicerofosfatidilcolinas

DD: disfunción diastólica

DG: diglicéridos

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

DIT: Doppler de imagen tisular

DM: diabetes mellitus

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DMT1: diabetes mellitus tipo 1

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

DNP: péptido natriurético tipo D

DOP: Doppler de onda pulsada

DOXO: doxorubicina

DPP-4: dipeptidil peptidasa-4

Drp-1: proteína 1 relacionada con la dinamina

E: onda de llenado precoz del VI

e': pico de velocidad anular diastólica temprana

e^-: electrones

EASD: *European Association for the Study of Diabetes*

ECA: enzima convertidora de angiotensina

ECA2: enzima convertidora de angiotensina 2

ECV: enfermedad cardiovascular

EDTA: ácido etilenodiaminatetraacético

EE: gasto energético

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

EIM: espacio intermembrana mitocondrial

EMA: *European Medicines Agency*

EMPA: empagliflozina

ERC: enfermedad renal crónica

EROs: especies reactivas de oxígeno

ESC: *European Society of Cardiology*

F: fuerza

FA: ácidos grasos

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorter*

FAD: dinucleótido de flavina y adenina

$FADH_2$: forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina

FBS: suero bovino fetal

FC: frecuencia cardíaca

FDA: *Food and Drug Administration*

FE: fracción de eyección

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos 2

FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21

FMUP: Facultad de Medicina de la Universidad de Oporto

G: glutamato

G3P: glicerol-3-fosfato

G3PP: glicerol-3-fosfato fosfatasa

Gal-3: galectina-3

GC-A: receptor de guanilil ciclasa A

GC-B: receptor de guanilil ciclasa B

GCs: guanilato ciclasa soluble

GDF15: factor de diferenciación del crecimiento 15

GHD: glutamato deshidrogenasa

GIP: polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GLP-1: péptido similar al glucagon-1

GLP-1R: receptor del péptido similar al glucagon-1

GLS1: glutaminasa-1

GLUT: transportador de glucosa

GLUT1: transportador de glucosa tipo 1

GLUT2: transportador de glucosa tipo 2

GLUT4: transportador de glucosa tipo 4

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GPDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

GPR55: receptor 55 acoplado a proteína G

GSK-3 β: glucógeno sintasa quinasa-3β

H^+: protones

H_2Od: agua destilada

HbA1c: hemoglobina glucosilada

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HE: hematoxilina eosina

HFA: *Heart Failure Association*

HIF1α: factor 1-alfa inducible por hipoxia

HSL: lipasa sensible a hormonas

HTA: hipertensión arterial

IC: insuficiencia cardíaca

ICAM: molécula de adhesión intracelular

ICFElr: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección ligeramente reducida

ICFEp: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada

ICFEr: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida

IDF: *International Diabetes Federation*

IDIS: Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago

iECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IHI: *International Heart Institute*

IL-1β: interleuquina-1 beta

IL-10: interleuquina-10

IL-5: interleuquina-5

IL-6: interleuquina-6

ILCNC: *Lipid Classification and Nomenclature Committee*

IM: infarto de miocardio

IMC: índice de masa corporal

Índice Tei: índice de rendimiento miocárdico

iSGLT2: inhibidores de los cotransportadores de sodio-glucosa tipo 2

i.v.: intravenosos

IVCT: tiempo de contracción isovolumétrica

IVRT: tiempo de relajación isovolumétrica

JNK: quinasa c-Jun N-terminal

K_{ATP}: canal de potasio activado por adenosín trifosfato

KCCQ: *Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire*

LBQ657: sacubitrilato

LC: cromatografía líquida

LC3: proteína 1 de cadena ligera 3 asociada al microtúbulo

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LEAK: estado no fosforilativo

Lipe: lipasa E

LIPID MAPS: *LIPID Metabolites And Pathways Strategy*

LPC: lisofosfatidilcolinas

LPE: lisofosfatidiletanolaminas

LPG: lisofosfatidilgliceroles

LPI: lisofosfatidilinositoles

LPS: lipopolisacárido

LT: longitud de la tibia

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LVAW: grosor de la pared anterior del ventrículo izquierdo

LVAWd: grosor de la pared anterior del ventrículo izquierdo durante la diástole

LVEDA: valor final del área del ventrículo izquierdo en diástole

LVEDL: valor final de la longitud del ventrículo izquierdo en diástole

LVEDV: volumen diastólico final del ventrículo izquierdo

LVESA: valor final del área del ventrículo izquierdo en sístole

LVESL: valor final de la longitud del ventrículo izquierdo en sístole

LVESV: volumen sistólico final del ventrículo izquierdo

LVID: diámetro interno del ventrículo izquierdo

LVIDd: diámetro interno del ventrículo izquierdo durante la diástole

LVIDs: diámetro interno del ventrículo izquierdo durante la sístole

LVPW: grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo

LVPWd: grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo durante la diástole

M: malato

M199: *Medium 199*

MAPC: 1 o 2 monoacilglicerofosfatidilcolinas

MAPE: 1 o 2 monoacilglicerofosfatidiletanolaminas

MAPI: monoacilglicerofosfoinositol

MASLD: enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica

MasR: receptor Mas

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MCU: uniportador de Ca^{2+} mitocondrial

MCUR1: regulador 1 del uniportador de calcio mitocondrial

MDH: malato deshidrogenasa

ME: mezcla enzimática

MEC: matriz extracelular

MEMAPC: 1-acil,2-eterglicerofosfatidilcolinas

MEPC: monoeterglicerofosfatidilcolinas

MEPE: monoeterglicerofosfatidiletanolaminas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MG: monoglicéridos

MGL: monoglicérido lipasa

MICU1: *mitochondrial calcium uptake 1*

MICU2: *mitochondrial calcium uptake 2*

Misc: varios

MLHFQ: *Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*

MM: matriz mitocondrial

MMI: membrana mitocondrial interna

MMP-2: metaloproteinasa de matriz 2

MMP-9: metaloproteinasa de matriz 9

MnSOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso

Modo B: modo brillo

Modo M: modo tiempo-movimiento

MPC: transportador de piruvato mitocondrial

MS: espectrometría de masas

mt: mitocondria

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados

m/z: masa/carga

N: molécula de nitrógeno

Na^+-K^+-ATPasa: adenosintrifosfatasa de Na^+ y K^+

NAD^+: dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADH: forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina

NAE: N-acil etanolaminas

NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico

NCS: suero de ternero recién nacido

NEP: neprilisina

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

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NHE-1: intercambiador de sodio-hidrógeno 1

NIH: *National Institute of Health*

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

NPR-A: receptor de péptido natriurético A

NPR-B: receptor de péptido natriurético B

NPR-C: receptor de péptido natriurético C

NRC: *National Research Council*

Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2

Ns: nucleósidos

Nt: nucleótidos

NTC: *No Template Control*

NT-proANP: fracción aminoterminal del propéptido natriurético tipo A

NT-proBNP: Fracción aminoterminal del propéptido natriurético tipo B

NT-proCNP: fracción aminoterminal del propéptido natriurético tipo C

NYHA: *New York Heart Association*

O: molécula de oxígeno

Oct: octanoilcarnitina

OMS: Organización Mundial de la Salud

oxFA: ácidos grasos oxidados

OXPHOS: fosforilación oxidativa

P: piruvato

p62: proteína adaptadora p62

PA: presión arterial

PBS: búffer fosfato salino

PC: fosfatidilcolinas

PCA: análisis no supervisado de componentes principales

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDH: piruvato deshidrogenasa

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PE: fosfatidiletanolaminas

PERK: *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*

pfi: fibras permeabilizadas

PG: fosfatidilgliceroles

PGC-1alfa: coactivador 1α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma

PI: fosfatidilinositoles

Pi: fosfato inorgánico

PI3K: fosfatidilinositol-3–quinasa

PIIINP: propéptido N-terminal del procolágeno tipo III

PINP: propéptido N-terminal del procolágeno tipo I

PKG: proteína quinasa guanosín dependiente de monofosfato cíclico

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PN: péptido natriurético

Pnpla2: *patatin-like phospholipase domain containing 2*

POMC: proopiomelanocortina

PPARγ: receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma

ppm: partes por millón

PRO-C3: fragmento N-terminal de colágeno tipo III

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

PVDF: fluoruro de polivinilideno

Q: coenzima Q

RAGE: receptor de los productos finales de glicación avanzada

RE: retículo endoplasmático

RI: resistencia a la insulina

RIC: rango intercuartílico

RM: receptor de mineralocorticoides

RN18s: ácido ribonucleico ribosomal 18S

RNasas: ribonucleasas

Rot: rotenona

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rpm: revoluciones por minuto

RQ: coeficiente respiratorio

RSK: quinasa ribosomal s6

Rt: tiempos de retención

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

S: succinato

SAC/VAL: sacubitril/valsartán

Sat: saturado

SDH: succinato deshidrogenasa

SDS: dodecilsulfato sódico

SEM: error estándar de la media

SFA: ácidos grasos saturados

SGLT: cotransportador sodio-glucosa

SGLT1: cotransportador sodio-glucosa tipo 1

SGLT2: cotransportador sodio-glucosa tipo 2

SHHF: hipertensión espontánea e IC

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

Sirt1: sirtuina 1

Sirt3: sirtuina 3 desacetilasa dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina

SLC: transportador ligado a soluto

SM: esfingomielina

SMet: síndrome metabólico

SNS: sistema nervioso simpático

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

sST2: ST2 soluble

STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3

STZ: estreptozotocina

SUIT: titulación sustrato-desacoplador-inhibidor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SV: volumen sistólico del ventrículo izquierdo

TA: tejido adiposo

t.a.: temperatura ambiente

TAB: tejido adiposo blanco

TAE: tejido adiposo epicárdico

TAM: tejido adiposo marrón

TAS: tejido adiposo subcutáneo

TAV: tejido adiposo visceral

TE: tolerancia al ejercicio

TEMED: tetrametiletilendiamina

TFGe: tasa de filtración glomerular estimada

TG: triglicéridos

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta

Tgfb1: factor de crecimiento transformante beta 1

TIMP-1: inhibidor tisular de las metaloproteinasas de matriz

TLR4: receptor tipo Toll 4

TMPD: N,N,N′,N′-Tetrametil-p-fenilendiamina

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFα: factor de necrosis tumoral alfa

TOG: tolerancia oral a la glucosa

TZD: tiazolidinadionas

u.a.: unidades arbitrarias

u.a.a.: unidades arbitrarias de absorbancia

u.a.f.: unidades arbitrarias de fluorescencia

UCP1: proteína desacoplante 1

UHPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

U.I.: unidades Internacionales

Unsat: insaturado

USC DE COMPOSTELA

URO: urodilatina

USC: Universidad de Santiago de Compostela

USD: dólares estadounidenses

VAL: valsartán

VCAM: moléculas de adhesión de células vasculares

VCO_2max: producción máxima de CO_2

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VEGF-A165b: isoforma antiangiogénica del VEGF

VI: ventrículo izquierdo

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

Vit: vitaminas

VO_2max: consumo máximo de O_2

ZDF: Zucker diabéticas y obesas

ZSF1: Zucker obesas y espontáneamente hipertensas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SUMMARY

Although mortality from cardiovascular diseases has reduced by half in the last three decades, it still remains very high and, for this reason, prevention is essential. Most cardiovascular risk factors (obesity, diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension, physical inactivity, inadequate diet, and alcohol and tobacco consumption), with the exception of age and gender, could be prevented and/or reduced; therefore, their diagnosis and detection are crucial. The combination of disorders such as obesity, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and hyperlipidemia are known as metabolic syndrome, and collectively increases the individual risk of cardiovascular disease.

Obesity is characterized by a disproportionate increase in the size of adipose tissue as a response to excessive caloric intake which, in addition to a worsening in the quality of life of individuals, also causes metabolic, cardiac, neurohormonal, hemodynamic, and immune system alterations, supporting the development of diseases such as type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease, arterial hypertension, heart failure, etc. In the last five decades, the prevalence of obesity has increased dramatically, and it is now considered a global pandemic. The body mass index is currently used for the diagnosis of obesity (body mass index $\geq$ 30.0 kg/m^2); however, since it is not a direct measure of body fat, it must be accompanied by other anthropometric measures. Adipose tissue is an endocrine organ consisting of white adipose tissue (95% of the adipose mass), constituted by white adipocytes which, in addition to storing and releasing lipids, produces and secretes factors with endocrine, paracrine and autocrine activity (adipokines, cytokines, and chemokines), which are tightly involved in the regulation of metabolism and cardiovascular function. Brown adipose tissue, formed by brown adipocytes (1-2% of the adipose mass), secretes factors called BATokines (from brown adipose tissue adipokines) that also participate in the regulation of different metabolic, thermogenic, inflammatory and tissue repair processes; while beige adipose tissue (3-4% of the adipose mass), formed by beige adipocytes, turn into brown adipocytes under specific stimuli usually related to catabolic responses. A prolonged and excessive increase of white adipose tissue, as occurs in obesity, leads to decreased vascularization and adipogenesis, increased fibrosis and adipocyte hypertrophy, a state of chronic low-grade inflammation, increased oxidative stress, insulin resistance and lipotoxicity, as well as a dysfunctional production and secretion of BATokines and reduced thermogenesis in brown adipose tissue. All these alterations in the adipose tissue during obesity lead to the development of cardiometabolic diseases, and for this reason, it is crucial to reduce their development and/or progression by adopting a healthy lifestyle (combination of hypocaloric diet and physical exercise) and, when needed, with the help of pharmacological treatment, or even bariatric surgery in the case of severely obese patients, in which pharmacological therapy is not sufficient.

Type 2 diabetes mellitus is a chronic, heterogeneous, metabolic disease characterized by elevated blood glucose levels due to dysfunctional tissue response to insulin (insulin resistance), resulting in increased insulin secretion by β-pancreatic cells

USC

in an attempt to maintain, although in an unsatisfactory manner, glucose homeostasis. Although the early stages of the development of type 2 diabetes mellitus are usually asymptomatic, symptoms such as excessive thirst and appetite, weight loss, excessive urination, tiredness, blurred vision, numbness of the extremities, and slow healing, appear when the disease is at an advanced stage. The main risk factors for the development of type 2 diabetes mellitus are obesity, age, gender, ethnicity, high blood pressure, dyslipidemia, non-alcoholic fatty liver disease, physical inactivity, family history of diabetes, etc. Although the prevalence of type 2 diabetes mellitus is expected to continue to increase, its incidence seems to have stabilized due to improved early diagnosis and pharmacological therapies. Together with a healthy lifestyle, pharmacological treatment of type 2 diabetes mellitus can control blood glucose levels and reverse the damage caused by the disease to organs such as the heart and kidneys. A wide variety of pharmacological options are currently available for type 2 diabetes mellitus, such as insulin therapy, biguanides, glucose-like peptide 1 receptor agonists, thiazolidinediones, sulphonylureas, dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and, specially, sodium-glucose co-transporters type 2 (SGLT2) inhibitors.

SGLT2 are mainly expressed in S1 segment of the renal proximal tubule, and they are responsible for the reabsorption of 97% of glucose from the glomerular filtrate, co-transporting it, together with 2 molecules of Na^+, to the cell cytoplasm, where it will be transported back to the blood flow via glucose transporters (GLUT). Patients with type 2 diabetes mellitus have increased maximal renal glucose reabsorption capacity, threshold level for glucosuria, and SGLT2 expression, resulting in increased renal glucose and Na^+ reabsorption. For these reasons, inhibition of SGLT2 has been proposed as a potential therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes mellitus. SGLT2 inhibitors, or gliflozins, are a family of drugs that, by binding to SGLT2, prevent the reabsorption of glucose in the kidneys, increasing its elimination in the urine, as well as reducing plasma levels of glycosylated hemoglobin. Importantly, inhibitors of SGLT2 have also demonstrated beneficial effects on cardiovascular and renal function. Among all the gliflozins, it is important to highlight the role of empagliflozin (EMPA), one of the subjects of this doctoral thesis, a rapidly absorbed oral antidiabetic drug that was approved for the treatment of patients with T2DM by the European Medicines Agency (EMA) and the Food and Drug Administration (FDA). The clinical trials conducted not only showed the beneficial effects of EMPA in patients with type 2 and type 1 diabetes mellitus, but also proved its cardiovascular benefits in patients with type 2 diabetes mellitus in the EMPA-REG OUTCOME clinical trial. Following this clinical trial, the effects of EMPA in patients with heart failure with reduced (EMPEROR Reduced clinical trial) and preserved (EMPEROR Preserved clinical trial) ejection fraction was evaluated regardless of the presence of type 2 diabetes mellitus. The results obtained in those clinical trials demonstrated the promising effects of EMPA treatment in reducing adverse cardiovascular events in patients with heart failure, and its use has been approved by the FDA for the treatment of adult patients with heart failure. In addition, numerous *in vivo* and *in vitro* studies were also conducted to try to elucidate the possible mechanisms involved in the cardiovascular protection induced by EMPA. Data collected in the scientific literature suggest the anti-hypertrophic, anti-fibrotic, and anti-

inflammatory effects of EMPA, its ability to reduce apoptosis and oxidative stress, its cardioprotective effect against cardiotoxicity induced by a variety of chemotherapeutic agents, and its ability to regulate energy metabolism.

Heart failure is a clinical syndrome characterized by the presence of symptoms and signs due to alterations in cardiac structure, function, and metabolism, leading to insufficient blood pumping by the heart to supply O_2 and nutrients to the whole body. Nowadays, heart failure is one of the leading causes of morbidity and mortality at global level. The most common risk factors for the development of heart failure are high blood pressure, type 2 diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, metabolic syndrome, aging, smoking, sedentary and physically inactive lifestyle, alcohol consumption and other drug use, etc. Diagnosis of heart failure requires the presence of symptoms and signs (dyspnea, edema, fatigue, tiredness, elevated heart rate, etc.), measurement of blood levels of the biomarkers brain natriuretic peptide (BNP), or the amino-terminal fraction of proBNP (NT-proBNP), and assessment of the left ventricular ejection fraction, a measurement of the volume of blood pumped during systole. Heart failure is classified according to the left ventricular ejection fraction, distinguishing between heart failure with reduced (less than 40%), and preserved (greater than 50%) ejection fraction. Heart failure with preserved ejection fraction is considered a multi-pathological syndrome with systemic effects, closely related to obesity, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and metabolic syndrome. This syndrome currently affects approximately 50% of the heart failure population, and its prevalence, morbidity, and mortality, continue to increase, since its diagnosis is very complicated due to the heterogeneous phenotypes of the disease. The therapeutic options for heart failure with preserved ejection fraction are very limited and, at present, most of them are only able to partially reduce symptoms and signs and improve the patient's quality of life. Its pathophysiology is very complex and involves multiple organs and systems, as well as different metabolic and inflammatory processes. In addition to left ventricular diastolic dysfunction, one of the main disorders that lead to the development of this syndrome, there are also alterations of neurohormonal systems, such as the sympathetic nervous system, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the natriuretic peptide system, with also the presence of an increase of hypertrophic, profibrotic and inflammatory processes at the cardiac level, and disturbances of cardiac energy metabolism, either due to inadequate use of the energy substrates, or to main disturbances of mitochondrial function. In addition to a healthy lifestyle, pharmacological therapy is essential to alleviate the symptoms of heart failure and to prevent or reduce hospital admissions and mortality. Some of the different treatments available include loop diuretics, β-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II type 1 receptor antagonists, mineralocorticoid receptor antagonists, SGLT2 inhibitors, soluble guanylate cyclase stimulators and the dual angiotensin II and neprilysin AT1 receptor inhibitor (ARNi). The first ARNi formulated was sacubitril/valsartan (SAC/VAL), an equimolar combination of sacubitril, a prodrug that is hydrolyzed at hepatic level into its active metabolite sacubitrilate (LBQ657), which inhibits the enzyme neprilysin, and valsartan (VAL), an angiotensin type II type 1 receptor blocker widely used in the treatment of cardiovascular diseases. Numerous clinical trials have evaluated the effects of

SAC/VAL treatment in heart failure patients with reduced (PARADIGM-HF, TRANSITION, PIONEER-HF, etc.) and preserved (PARAMOUNT, PARAGON-HF, PARALLAX, etc.) ejection fraction. Due to the beneficial results obtained in the PARADIGM-HF clinical trial, SAC/VAL was approved by the FDA as a first-line drug for the treatment of heart failure with reduced ejection fraction. Subsequently, although the results obtained in clinical trials with patients with heart failure with preserved ejection fraction were not as beneficial as the obtained in patients with reduced ejection fraction, and especially due to the absence of effective drugs for this syndrome, the FDA extended the indication of SAC/VAL for patients with heart failure with preserved ejection fraction. In addition, the evaluation of the effects of SAC/VAL on the cardiovascular system *in vitro* and *in vivo*, proposed its possible ability to reduce cardiac fibrosis, hypertrophy, inflammation, oxidative stress, and apoptosis, to regulate glucose metabolism, and to protect against cardiotoxicity induced by chemotherapeutic agents. The study of additional beneficial effects of SAC/VAL will be likewise other of the main subjects of study of this doctoral thesis,

The principal objectives of this work are 1) the study of the cardiometabolic effects of EMPA treatment *in vivo* in an animal model of obesity and type 2 diabetes mellitus, the Zucker diabetic and obese (ZDF) rats; 2) the study of the cardiometabolic effects of SAC/VAL treatment *in vitro*, using the murine HL-1 cell line of atrial cardiomyocytes and primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes; and 3) the evaluation of the effects of SAC/VAL treatment *in vivo*, in an animal model of metabolic syndrome associated with heart failure with preserved ejection fraction, the obese and spontaneously hypertensive Zucker (ZSF1) rats.

For the development of the objective one of this work, visceral and subcutaneous adipose tissue was obtained from an experimental procedure previously performed in our laboratory in adult male ZDF rats. Seven-week-old male ZDF rats weighing 200-250 g were housed individually, with continuous access to the special Formulab 5008 rodent diet that allows the development of type 2 diabetes mellitus. At twelve weeks of age, when the animals reached fasting blood glucose levels of 350.75 ± 18.59 mg/dL, the rats were randomly divided into the EMPA group (30 mg/kg/day/day/p.o. of EMPA dissolved in the drinking water, n = 17), and the control group (mineral drinking water, n = 17). After six weeks of treatment with EMPA, the animals were euthanized by decapitation, and plasma and adipose tissue were stored at -80 °C. For the analysis of the glycemic control by the drug, biochemical analysis of the plasma of all the animals was performed, being observed that EMPA treatment was able to significantly reduce the plasma fructosamine levels, as well as the percentage of glycated albumin of the treated animals, in comparison with the control group. For histological analysis, visceral and subcutaneous adipose tissue of ZDF rats was stained with hematoxylin and eosin (HE), showing no differences in the adipocyte areas between both groups of animals. In addition, histological images showed no macrophage infiltration in the adipose tissue of any of the ZDF rats. The impact of EMPA treatment on the complete lipidome of visceral and subcutaneous adipose tissue was analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS). The results obtained

USC DE COMPOSTELA

showed that EMPA produced a significant reduction in the levels of several lysophospholipids, and an increase of 2 phosphatidylcholines, in subcutaneous adipose tissue while, in visceral adipose tissue, an accumulation of oxidized fatty acids and diglycerides was observed. Furthermore, we decided to evaluate gene expression of biomarkers of inflammation, fibrosis, mitochondrial function, and lipid metabolism by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Our data showed that EMPA induced a strong anti-inflammatory effect in visceral adipose tissue, by significantly reducing the mRNA levels of the cytokines interleukin (Il)-1β, Il-6, tumor necrosis factor-alpha (Tnfα), monocyte-chemotactic protein-1 (Mcp-1), Il-10, the macrophage markers M1 and M2 Cd86 and Cd163 in visceral adipose tissue. Il-1β mRNA expression levels were also decreased in the subcutaneous tissue of EMPA-treated rats. Furthermore, treatment of ZDF rats with EMPA for six weeks was able to regulate lipolytic processes by increasing the gene expression of patatin-like phospholipase domain containing 2 (Pnpla2) in visceral adipose tissue, and of lipase E (Lipe) in both adipose tissues, while reducing the expression levels of the FA transporter cluster of differentiation 36 (Cd36). EMPA treatment also inhibited the expression of the fibrosis biomarkers collagen type I alpha 1 chain (col1a1) and collagen type VI alpha 3 chain (col6a3) in the visceral adipose tissue. In addition, in the visceral adipose tissue of EMPA-treated ZDF rats, reduced gene expression of mitochondrial calcium uniporter (Mcu) and mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (Mcur1), two of the subunits that make up the mitochondrial uniporter complex, the master regulator of mitochondrial calcium uptake, was also observed.

For the achievement of the second objective of this thesis, the HL-1 cell line and/or the primary cultured neonatal rat cardiomyocytes were treated with 10 and 20 µM LBQ657 (the metabolite of sacubitril) combined with valsartan (VAL) or its corresponding vehicle (dimethyl sulfoxide (DMSO)). We first checked that treatment with 10 and 20 µM LBQ657 + VAL did not have any harmful effects on cardiomyocyte viability by performing a cell viability assay (the MTT test). To assess the *in vitro* metabolic effects of the treatment, fatty acid uptake, and glucose receptor (GLUT4) mobilization assays were carried out. Moreover, the expression of genes implicated in lipolysis (Lipe and Cd36) was assessed by RT-PCR, and the expression of the protein levels involved in autophagic processes was determined by Western Blot. However, *in vitro* treatment of cardiomyocytes with both doses of LBQ657 + VAL did not modify fatty acid uptake, GLUT4 mobilization, lipolysis, or autophagy in these cell cultures.

Finally, in order to achieve the third objective previously described, obese ZSF1 rats were used to evaluate the *in vivo* effects of SAC/VAL. Nine-week-old male ZSF1 rats weighing 200-550 g were housed in groups of two, with continuous access to the special Formulab 5008 rodent diet that allows the development of type 2 diabetes mellitus. The animals' weight, and food and water intake were assessed weekly. At fourteen weeks of age, the ZSF1 rats were randomly divided into the obese SAC/VAL group (68 mg/kg/day/p.o. of SAC/VAL dissolved in drinking water, n = 10), the obese control group (vehicle, mineral drinking water, n = 10), and the non-obese control group (vehicle, mineral drinking water, n = 10). After nine weeks of treatment, the animals

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

were euthanized by exsanguination, and the organs and blood were preserved at -80 °C. Echocardiographic analyses performed throughout the experimental procedure showed a reduction of diastolic dysfunction in SAC/VAL-treated ZSF1 rats, compared to the obese control group, by improving parameters such as isovolumic relaxation time (IVRT), Tei index, and left ventricular mass. Rats were also subjected to stress tolerance tests, and an improvement of the respiratory coefficient was observed in the obese SAC/VAL group at twenty-two weeks of age during physical exercise. During the treatment period, different tests were also performed to evaluate the possible effects of SAC/VAL on glucose metabolism (oral glucose tolerance and insulin resistance tests), but no differences were observed between the two groups of obese animals. Biochemical analyses of serum from ZSF1 rats showed that SAC/VAL treatment for nine weeks resulted in a reduction of total cholesterol and sodium levels, but also in increased levels of liver transaminases (aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase) and creatinine. Morphometric analyses reported a decrease in heart, liver, spleen, and perigonadal fat weight, normalized by tibia length, in obese ZSF1 rats treated with SAC/VAL. In addition, histological analyses performed on cardiac and liver tissue demonstrated the ability of SAC/VAL to reduce cardiac hypertrophy and fibrosis, as well as hepatic lipid infiltration (or steatosis). The mitochondrial respiration rate of cardiac and liver tissue was assessed using a high-resolution FluoRespirometer O2k and, although slight improvements appear to be observed in both tissues of SAC/VAL-treated animals, these changes were not statistically significant. Finally, a whole metabolome analysis of the left ventricle of ZSF1 rats was performed by UHPLC-MS and showed a reduction in cardiac levels of cholesterol, cholesterol esters and glycerophospholipids in the obese SAC/VAL group, although there was also an accumulation of triglycerides in the cardiac tissue of these animals.

In conclusion, EMPA is a drug that, in addition to providing glycemic control, has promising anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in the context of obesity and diabetes. Furthermore, the data obtained in our study have demonstrated the ability of EMPA to regulate lipolytic processes in adipose tissue and to differently modify the lipidome of visceral and subcutaneous adipose tissue in ZDF rats, suggesting that both depots have differences in their metabolism. On the other hand, no effects on cardiomyocyte metabolism were observed after 10 and 20 µM LBQ657 + VAL treatment of the HL-1 cardiomyocyte cell line or the neonatal rat cardiomyocytes. Finally, SAC/VAL treatment of obese ZSF1 rats, an animal model of heart failure with preserved ejection fraction, besides improving exercise tolerance, diastolic dysfunction, and cardiac hypertrophy and fibrosis, was able to reduce liver weight and hepatic steatosis, and modified serum biochemical parameters such as total cholesterol and sodium. In addition, SAC/VAL also modified the left ventricular metabolome of ZSF1 rats, mainly reducing the accumulation of glycerophospholipids, whose accumulation in cardiac tissue appears to be associated with diastolic dysfunction.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) se definen como un conjunto de trastornos crónicos, que afectan tanto al corazón como al sistema circulatorio y que, actualmente, son la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel global, provocando más de 18.9 millones de muertes durante el año 2019 [1–3]. El número de muertes prematuras (personas menores de 70 años) debido a ECVs en Europa es alarmante, pues se estima una pérdida anual de más de 60 millones de años potenciales de vida [1]. En los últimos 30 años, gracias a diversas estrategias preventivas y a los avances terapéuticos, se logró una reducción prácticamente a la mitad en la tasa de mortalidad debida a ECVs en países desarrollados [4,5]. Sin embargo, a pesar de todos los avances que se han logrado, la prevalencia mundial de las ECVs continúa siendo muy elevada, y se espera que para el año 2030 se alcancen los 24 millones de muertes debido a ECVs, por lo que su prevención resulta crucial [5,6]. Para ello, además del uso de la terapia farmacológica habitual, se han desarrollado aplicaciones que, a través de la inteligencia artificial, permiten una detección más eficaz de las enfermedades y el desarrollo de un tratamiento de precisión [7].

1.1.1. Factores de riesgo cardiovascular

En la mayoría de los casos, el establecimiento de los factores de riesgo cardiovascular (CV) que las preceden y el posterior desarrollo de las ECVs podrían prevenirse adoptando un estilo de vida saludable (prevención primordial) [5,8,9]. La modificación y reducción de los factores de riesgo CV antes de que aparezcan las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad también es posible, (prevención primaria), por lo que su conocimiento y detección son fundamentales [5,10,11]. Finalmente, en el caso de que llegue a producirse un evento clínico, el objetivo es revertir las ECVs existentes para prevenir la enfermedad recurrente (prevención secundaria) [11].

Los estudios epidemiológicos han sido cruciales para dilucidar cuáles son los factores de riesgo que preceden el desarrollo de las ECVs y ser capaces de prevenirlos [12]. Uno de los estudios más importantes que ha permitido la identificación de los principales factores de riesgo CV en la población y, con ello, el manejo de la epidemia de las EVCs en los países desarrollados es el estudio de Framingham, iniciado a finales de los años 40 en Estados Unidos y que todavía continúa activo [10,12–14]. Los estudios INTERHEART e INTERSTROKE, llevados a cabo en países en vías de desarrollo, han demostrado que los factores de riesgo CV son comunes a los de los países desarrollados [15,16]. El riesgo CV se define como la probabilidad que presenta cada individuo de desarrollar una ECV, la cual viene dada por la presencia de factores modificables como la diabetes mellitus (DM), la dislipemia, la hipertensión arterial (HTA), el sedentarismo, la dieta, el tabaquismo y el consumo de alcohol, y factores no modificables como el sexo y la edad (Fig. 1.1.) [5,10,17,18].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

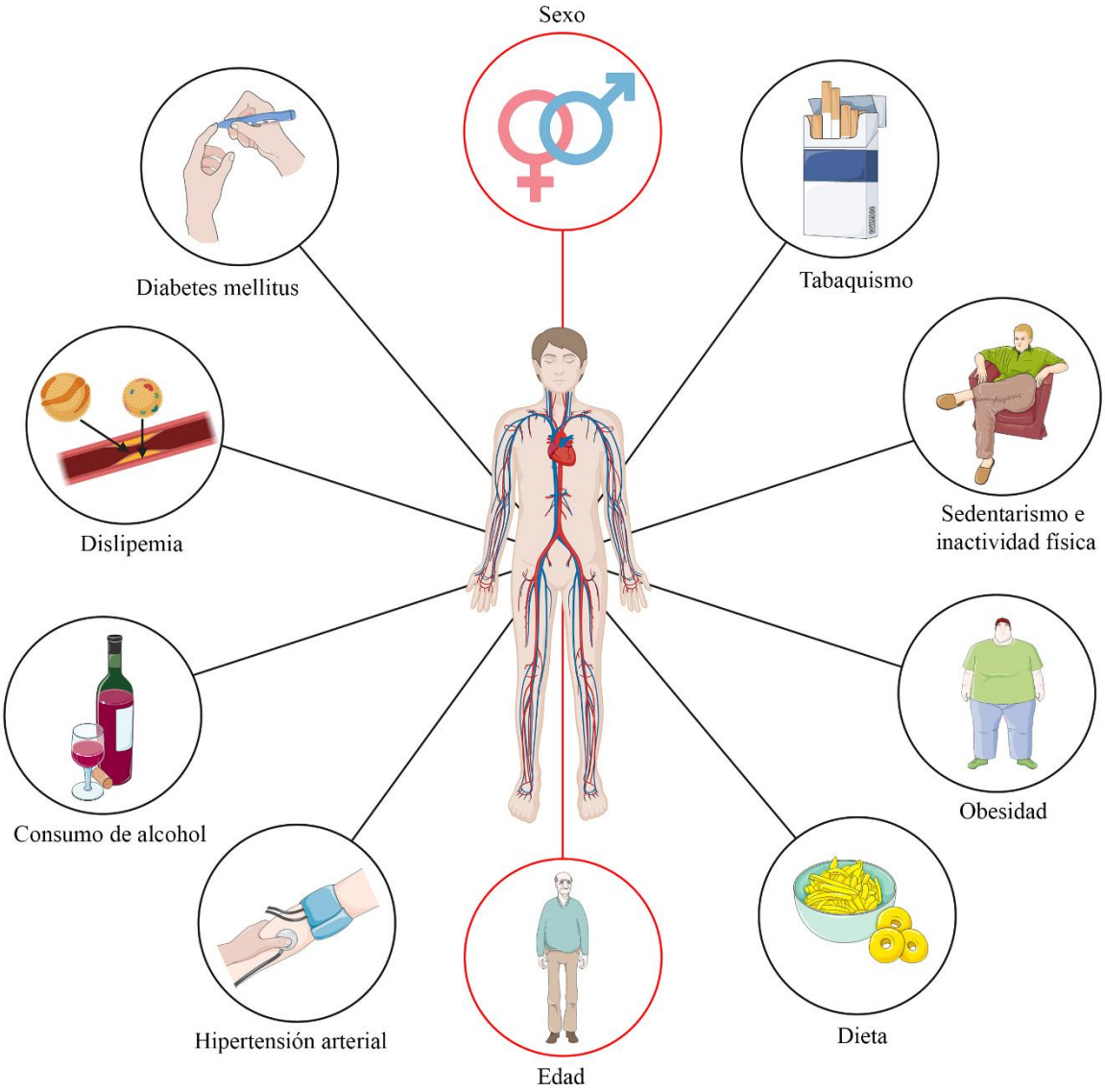


Figura 1.1.: Factores de riesgo CV. En negro se muestran los factores que pueden revertirse como el tabaquismo, el sedentarismo e inactividad física, la obesidad, la dieta, la HTA, el consumo de alcohol, la dislipemia y la DM. En rojo se representan los factores inalterables como el sexo y la edad. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com y Smart Servier Medical Art bajo una licencia ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL (http://smart.servier.com/, 13 de junio de 2024).

1.1.1.1. Factores de riesgo modificables

Obesidad: en los últimos años, los esfuerzos de la comunidad científica se han centrado en el estudio de la obesidad y del acúmulo de tejido adiposo (TA), tratando de encontrar posibles dianas terapéuticas para la prevención o el tratamiento de las ECVs [19]. La existencia de una amplia variedad de fenotipos de obesidad ha dificultado bastante esta tarea [20,21]. Desde finales de los años 70, la prevalencia de la obesidad continúa en aumento a nivel mundial, siendo responsable de más de 40 millones de muertes, de las cuales 2/3 son por causas CVs [22,23]. La relevancia de la obesidad en la fisiopatología de la ECVs se explica con más detalle en el apartado 1.2.1.

DM: los cambios demográficos, junto con el aumento de los factores de riesgo para el desarrollo de la DM, como por ejemplo la obesidad, son los principales responsables del incremento global de la mortalidad y la morbilidad por DM [22,24], cuya presencia en adultos se asocia a un incremento de eventos CVs [22,25,26]. En España se calcula que casi un 14% de los adultos presentan DM, siendo más común entre la población masculina [27]. Los datos recogidos en los últimos años han permitido estimar que, para el año 2045, la DM afectará a más de 700 millones de personas [25,27–29]. La relevancia de este factor de riesgo CV se explica con más detalle en el apartado 1.2.2.

Dislipemia: la dislipemia se caracteriza por un incremento de los niveles plasmáticos de colesterol (Cho, *cholesterol*) total, Cho unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low-Density Lipoprotein*) y/o triglicéridos (TG), o bien por una disminución de los niveles plasmáticos de Cho unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High-Density Lipoprotein*); y se relaciona estrechamente con un incremento de los eventos CVs, cardiopatía isquémica y ECV aterosclerótica [6,30–33]. En los últimos años, el incremento del uso de las estatinas en países desarrollados dio lugar a importantes reducciones en los niveles plasmáticos de Cho total y, con ello, una reducción de la mortalidad por ECVs [33].

HTA: la HTA se define como valores de presión arterial (PA) sistólica ≥ 130 mm Hg y PA diastólica ≥ 80 mm Hg, y su mantenimiento a largo plazo puede llegar a provocar alteraciones estructurales cardíacas (hipertrofia, fibrosis) que conducen al desarrollo de arritmias, enfermedad coronaria isquémica o insuficiencia cardíaca (IC), siendo además un factor de riesgo para la enfermedad cerebrovascular [34–38]. La prevalencia de la HTA continua en aumento y, en la actualidad, afecta a más de 1000 millones de personas adultas [39].

Inactividad física y sedentarismo: el sedentarismo junto con la inactividad física son los principales factores de riesgo modificables, no solo de EVCs, sino también de muerte por cualquier causa, a nivel mundial [40]. Se ha establecido que 150 minutos de actividad física semanal moderada, o 75 minutos de actividad física intensa a la semana son suficientes para obtener beneficios CVs [41]. Sin embargo, a pesar de que los efectos saludables del ejercicio físico están bien establecidos (reducción de la obesidad y la HTA, mejora del metabolismo de la glucosa, etc.), aproximadamente el 27% de la población mundial adulta no cumple con los requerimientos mínimos de actividad física recomendados [42].

Dieta: el incremento en los últimos años a nivel mundial del consumo de sodio, de comida rápida, de alimentos ultraprocesados, y de bebidas altamente azucaradas, se asocia con un aumento de la incidencia de la HTA, la obesidad, la dislipemia y los estados proinflamatorios y, por lo tanto, con un mayor desarrollo de ECVs [5,43]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda limitar el consumo de grasas saturadas, sal y azúcar, y promueve la ingesta de frutas, verduras y legumbres para conseguir una buena calidad de vida y salud CV [22,44]. Es importante destacar los beneficios CVs que presenta la dieta Mediterránea, que se ha relacionado

USC DE COMPOSTELA

con una reducción de los procesos inflamatorios, la dislipemia, la HTA y del riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) u otras ECVs; y la dieta Atlántica, que se ha se ha asociado con una mejora de la salud metabólica y una reducción de la mortalidad debido a cardiopatía isquémica [27,28,45].

Consumo de alcohol: en la actualidad existe cierta controversia acerca de los efectos de la relación entre el consumo de bebidas alcohólicas y el desarrollo de ECVs [46]. Mientras que hay un consenso acerca de los múltiples problemas de salud asociados al consumo excesivo de alcohol, los resultados de ciertos estudios observacionales muestran resultados discrepantes entre la relación de la ingesta moderada de bebidas alcohólicas de baja graduación y el riesgo de desarrollar ECVs y, de hecho, el límite de lo que se considera un consumo seguro de alcohol todavía está por determinar [46–49].

Tabaquismo: los efectos del tabaquismo en la morbilidad y mortalidad dependen de la cantidad de cigarrillos consumidos al día, de la edad de la persona y del tiempo que lleva siendo fumadora [50–52]. La prevalencia del tabaquismo en Europa, en sus diferentes formas, durante el período 2000-2020, alcanzó niveles preocupantes [53]. Por lo general, tanto el consumo activo como pasivo de tabaco se relaciona con el incremento de la frecuencia cardíaca (FC), de los procesos inflamatorios, de la formación de trombos y de los niveles plasmáticos de TG, así como con la reducción de la sensibilidad a la insulina y de los niveles séricos del Cho unido a HDL, lo que puede traducirse en un mayor riesgo de disfunción endotelial, trombosis, DMT2, aterosclerosis e infarto de miocardio (IM) [22,51,54–56].

1.1.1.2. Factores de riesgo no modificables

Edad: el riesgo de padecer ECVs y otras enfermedades no transmisibles, como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, aumenta significativamente con la edad [57]. El envejecimiento, el principal factor de riesgo CV no modificable, está relacionado con la pérdida de la homeostasis a nivel cardíaco y vascular, con un incremento de la fibrosis cardíaca, con la rigidez en las arterias y en la microvasculatura, con el estrés oxidativo y con la inflamación crónica de bajo grado, así como con una disminución de la autofagia, todos ellos procesos que preceden al desarrollo de ECVs [58–60].

Sexo: en la década de los 90 comenzó el estudio de cómo las diferencias basadas en el sexo afectaban a la salud de las personas [61]. A pesar de que las mujeres tienen una esperanza de vida superior a la de los hombres, las muertes por ECVs afectan más a las mujeres y, aunque los mecanismos responsables de estas desigualdades no están completamente establecidos, se cree que la epidemiología, etiología, fisiopatología y respuesta al tratamiento de las ECVs presentan importantes diferencias entre sexos, siendo su comprensión esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con mejores resultados en ambos sexos biológicos [59,62–64].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2. SÍNDROME CARDIOMETABÓLICO Y RIESGO CARDIOVASCULAR

El síndrome metabólico (SMet) es una patología que afecta a un elevado porcentaje de la población mundial e incluye trastornos, esencialmente de origen metabólico, muy comunes como son la DMT2, la HTA, la hiperlipidemia y la obesidad, que comparten vías biológicas comunes [65–68]. Esta situación metabólico-patológica aumenta colectivamente el riesgo individual de padecer ECVs, incluidas la enfermedad coronaria y la IC [65–68].

Debido a que esta tesis se va a centrar en el estudio de los efectos de 2 medicamentos utilizados prevalentemente para el tratamiento de la DMT2 y la IC, realizaremos a continuación una breve revisión de varias condiciones fisiopatológicas concretas estrechamente relacionadas con estas enfermedades.

1.2.1. Obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación excesiva de grasa corporal, normalmente debido a una ingesta calórica excesiva, que está estrechamente relacionada con el desarrollo de enfermedades como la DMT2 y la IC [69–71].

La obesidad no solo empeora la calidad de vida de las personas que la padecen, sino que también provoca una serie de alteraciones metabólicas, cardíacas, neurohormonales, hemodinámicas y del sistema inmune, que favorecen el desarrollo de enfermedades como por ejemplo la DMT2, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, *nonalcoholic fatty liver disease*), actualmente denominada enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica, (MASLD, *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*), la HTA, el IM, la fibrilación auricular, la IC y diferentes tipos de cáncer [20,72–74]. Actualmente, diferentes organizaciones como la Federación Mundial de la Obesidad (*World Obesity Federation*) y la OMS han definido la obesidad como una enfermedad crónica y progresiva, que es además un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples patologías [70,72,75].

1.2.1.1. Epidemiología de la obesidad

En las últimas 5 décadas la prevalencia de la obesidad se ha incrementado drásticamente, siendo considerada actualmente una pandemia a nivel global [72,76]. Se ha estimado que en el mundo padecen obesidad más de 600 millones de personas, de las cuales aproximadamente un 16% tienen un índice de masa corporal (IMC) superior a 40 kg/m^2 (obesidad tipo III o mórbida) [77]. Los datos recogidos por el Observatorio Mundial de la Salud de la OMS en 2016 mostraron que la prevalencia de la obesidad en adultos europeos, especialmente en los países Mediterráneos y de Europa del Este, solo fue superada por el continente americano [78,79]. La prevalencia de la obesidad en España evaluada el año 2020 era del 7.3%, siendo las comunidades autónomas de Galicia, Principado de Asturias, Castilla y León, Murcia, y Canarias las que presentaron niveles mayores de prevalencia [80].

1.2.1.2. Diagnóstico y clasificación de la obesidad

Habitualmente, el diagnóstico de la obesidad se realiza en función del IMC, que expresa la relación entre el peso corporal y la altura en kg/m^2 [76,81,82]. El IMC ha sido utilizado por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (*Centers*

for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services from de EEUU) para realizar la siguiente clasificación de los niveles de obesidad (Tabla 1.1.) [76,81–83]:

Tabla 1.1.: Clasificación en función del índice IMC [76,81–83].

	IMC
Peso Insuficiente	< 18.5 kg/m^2
Normopeso	18.5 – 24.9 kg/m^2
Sobrepeso grado I	25.0 – 26.9 kg/m^2
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27.0 – 29.9 kg/m^2
Obesidad tipo I	30.0 – 34.9 kg/m^2
Obesidad tipo II	35.0 – 39.9 kg/m^2
Obesidad tipo III (mórbida)	40.0 – 49.9 kg/m^2
Obesidad tipo IV (extrema)	≥ 50 kg/m^2

El IMC no es una medida directa de la grasa corporal, ni tiene en cuenta factores importantes como la localización de los depósitos de grasa, la etnia, la edad y la presencia de factores de riesgo y comorbilidades, por lo que a veces es necesario acompañarlo de otras medidas antropométricas [20,84]. Debido a la relación existente entre la presencia de grasa abdominal (grasa visceral) y el incremento del riesgo de padecer ECVs, se ha establecido el uso de diferentes medidas del tamaño de la cintura (circunferencia de la cintura, la relación cintura-cadera y la relación cintura-altura) para complementar el IMC [20,85]. Sin embargo, estas medidas corporales tampoco aportan una información precisa de la composición corporal, por lo que recientemente se han combinado con técnicas que permiten determinar la masa y el volumen de los diferentes depósitos de TA existentes, como la impedancia bioeléctrica, la absorciometría con rayos X de doble energía, la tomografía computarizada, la resonancia magnética y la espectroscopia de resonancia magnética [81,86].

1.2.1.3. Fisiopatología de la obesidad

El TA se clasifica en función del tipo de adipocitos que lo conforman, los cuales difieren en morfología y función [87]. El TA blanco (TAB) está constituido por los adipocitos blancos (95% de la masa adiposa) formados por una gran gota lipídica y pocas mitocondrias (mts) [87–90]. Se trata de un órgano endocrino, dinámico y flexible que, además de almacenar y liberar lípidos, se encarga de producir y secretar adipoquinas (leptina, adiponectina, resistina, quimerina, etc.), citoquinas (interleuquinas, factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), etc.) y quimioquinas (proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*)), factores con actividad endocrina, paracrina y autocrina, encargados de regular importantes procesos fisiológicos (metabolismo, función CV, regulación inmunológica, reproducción, etc.) [21,91–93]. El TA marrón (TAM) es un órgano endocrino formado por adipocitos marrones (1-2% de la masa adiposa) que presentan gotas lipídicas de pequeño tamaño y un elevado número de mts, y cuyos niveles se reducen al envejecer y con el desarrollo de la obesidad [87,89,94]. El TAM

USC DE COMPOSTELA

además de participar en la regulación de la termogénesis adaptativa, es decir, la generación de calor a partir de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*) mitocondrial, contribuyendo a la homeostasis metabólica, secreta unos factores con función autocrina, paracrina y endocrina llamados BAToquinas, (del inglés *brown adipose tissue adipokines*) que participan en la regulación de diferentes procesos metabólicos, termogénicos, inflamatorios y de reparación tisular [87,95]. Existe un tercer tipo de TA conocido como TA beige (3-4% de la masa adiposa) el cual se encuentra disperso entre el TAB y está formado por adipocitos beige, los cuales se caracterizan por contener gotas lipídicas pequeñas y una elevada densidad mitocondrial y que, en respuesta a ciertos estímulos como, por ejemplo, el frío, se convierten en adipocitos marrones [87,89].

Recientemente se han descrito los efectos cardioprotectores de algunas de las BAToquinas secretadas por el TAM como, por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21, *fibroblast growth factor 21*) y el ácido 12,13-dihidroxi-9-octadecenoico (12,13-diHOME, *12,13-dihydroxy-9-octadecenoic acid*), que actúan directamente en el corazón y en última instancia producen una reducción del riesgo de desarrollar HTA, fibrilación auricular e IC [87].

La expansión del TAB es un proceso fisiológico en respuesta a un incremento de la ingesta de alimentos; sin embargo, un incremento excesivo y prolongado en el tiempo, como el que se produce en la obesidad, provoca la disminución de la vascularización y de la adipogénesis, un incremento de la fibrosis e hipertrofia de los adipocitos, un estado de inflamación crónica de bajo grado y resistencia a la insulina (RI) [88,90,96]. Además, recientemente se ha descrito una secreción de BAToquinas disfuncional y una termogénesis reducida en el TAM durante la obesidad [87]. Todas estas alteraciones producidas en el TA durante la obesidad conducen al desarrollo de enfermedades cardiometabólicas como, por ejemplo, la DMT2 [87].

La secreción alterada de adipoquinas y BAToquinas no solo presenta efectos negativos a nivel del TA, sino que también afecta a órganos como el corazón, provocando alteraciones en la función del ventrículo izquierdo (VI) y en el almacenamiento de lípidos, y el hígado, incrementando la esteatosis (acumulación hepática de lípidos) y produciendo alteraciones en la gluconeogénesis y en la sensibilidad a la insulina [87,95,97].

1.2.1.3.1. Hiperplasia e hipertrofia

La expansión del TAB implica el incremento del número (hiperplasia) y/o tamaño (hipertrofia) de los adipocitos [98,99]. La hiperplasia tiene lugar a partir a la proliferación y diferenciación de los preadipocitos y se ha relacionado con el fenotipo de obesidad metabólicamente saludable [93]; mientras que en la hipertrofia se produce una expansión disfuncional de los adipocitos que se asocia a un mayor almacenamiento de lípidos, a una desregulación de las células del sistema inmune, y a alteraciones en la secreción de quimioquinas, lo que conlleva a una situación de inflamación crónica, hipoxia, fibrosis, RI y disfunción metabólica [88,100].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.1.3.2. Angiogénesis e hipoxia

El proceso de generación de nuevos adipocitos, a partir de la diferenciación de los preadipocitos, se denomina adipogénesis y está acompañado de un incremento de la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) y de la biogénesis mitocondrial, procesos fundamentales para mantener un suministro de O_2 y nutrientes, y un metabolismo energético adecuado en el TAB [96,101,102]. Los adipocitos estimulan la angiogénesis a través de la secreción de diversos factores angiogénicos como angiopoyetinas, heparina, leptina, adiponectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2, *fibroblast growth factor 2*), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, *insulin-like growth factor*), etc. [102,103].

Sin embargo, la expansión hipertrófica de los adipocitos ante un consumo energético excesivo provoca una disminución de la densidad de los capilares y de los vasos sanguíneos del TAB, proceso en el que están implicados diferentes mecanismos como, por ejemplo, la secreción de la isoforma antiangiogénica del VEGF (conocida como VEGF-A165b), o la activación de la vía de señalización TWIST-SLIT2, estableciendo un estado hipóxico y disfuncional [102,104,105]. La hipoxia del TAB, debido a un aporte de O_2 insuficiente, estimula la expresión del factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1α, *hypoxia-inducible factor 1-alpha*), provocando disfunción de los adipocitos y el endotelio, necrosis, inflamación y fibrosis [106,107].

1.2.1.3.3. Distribución corporal del tejido adiposo

El TAB se distribuye por todo el organismo en diferentes depósitos de grasa cuya localización resulta ser un factor determinante crítico del riesgo CV [92,108,109]. El 80% del TAB se distribuye por debajo de la piel (TA subcutáneo, TAS), mientras que el TAB restante se localiza en la cavidad abdominal, las gónadas y el corazón (TA visceral, TAV), y se relaciona con un incremento de la inflamación, la vasoconstricción y del riesgo de desarrollar enfermedades cardiometabólicas [90,92,99,108,109]. Además, y en contacto directo con el miocardio, se encuentra el TA epicárdico (TAE), el cual secreta una serie de adipoquinas que ejercen sus efectos directamente sobre el corazón [110]. En condiciones normales, el TAE presenta una actividad termogénica dinámica similar al TAM, y proporciona ácidos grasos (FA, *fatty acids*) libres al miocardio para ser utilizados en la obtención de energía; sin embargo, su expansión debido a una ingesta calórica excesiva se relaciona con un aumento de la inflamación, de la infiltración de adipocitos en el miocardio, y de la lipotoxicidad, procesos que favorecen el desarrollo de la disfunción cardíaca [87,110].

La mayoría de las personas obesas presentan un fenotipo metabólico no saludable, con grandes depósitos de TAV compuesto por adipocitos hipertróficos, vascularización insuficiente que provoca un estado de hipoxia, fibrosis, inflamación y disfunción metabólica [87,99,111]. Aquellas personas obesas que presentan un fenotipo metabólicamente saludable tienen un porcentaje bajo de TAV, compuesto de adipocitos de pequeño tamaño y muy vascularizado, poca inflamación sistémica, buena respuesta a la insulina, y ausencia de enfermedades metabólicas y CVs [99,111].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.1.3.4. Fibrosis

El soporte, la diferenciación, la proliferación y la comunicación de los adipocitos en el TA está regulado por una red tridimensional de proteínas (colágeno, elastina, fibronectina, laminina, nidógenos y proteoglucanos) que constituyen la matriz extracelular (MEC) [112–114]. La excesiva expansión de los adipocitos en la obesidad provoca la remodelación de la MEC y la reducción de la vascularización del TA lo que, como se explicó en el apartado anterior, se traduce en un menor suministro de O_2 al tejido [105,112,114,115]. El estado hipóxico prolongado del TA activa la expresión de HIF1α, que a su vez estimula el reclutamiento de células inflamatorias (macrófagos M1 y mastocitos) y la síntesis de componentes de la MEC (Fig. 1.2.) [93,98,100,114,116]. La acumulación de colágeno alrededor de los adipocitos (fibrosis pericelular), o en el espacio intersticial, provoca estrés mecánico y pérdida de la flexibilidad del TA, provocando necrosis, inflamación local, lipotoxicidad sistémica y RI (Fig. 1.2.) [98,114,115,117].

1.2.1.3.5. Inflamación

Además de los adipocitos, en el TAB se encuentra fibroblastos, células endoteliales vasculares y una gran variedad de células del sistema inmune, como leucocitos, macrófagos M2, células dendríticas, neutrófilos, etc., que regulan su homeostasis y su función [118,119]. Sin embargo, el crecimiento disfuncional del tejido, y las condiciones hipóxicas que tienen lugar en la obesidad, generan lipotoxicidad debido al acúmulo excesivo de lípidos, a la necrosis de los adipocitos y a un incremento de la secreción de MCP-1 que, mediante su unión al receptor de quimioquina CC-2 (CCR2), induce el reclutamiento de macrófagos, linfocitos y células dendríticas (Fig. 1.2.) [91,93,100,120].

Los macrófagos M2 se polarizan en macrófagos M1 proinflamatorios encargados de fagocitar a los adipocitos apoptóticos que, junto con el resto de las células del sistema inmune, estimulan la secreción de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias (leptina, interleuquina 1β (IL-1β), interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα, *tumor necrosis factor α*), etc.) y reducen la producción de factores antiinflamatorios (adiponectina, interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-10 (IL-10), etc.) [91,118,121]. Este estado de inflamación crónica tiene efectos metabólicos relevantes (RI, acumulación de grasa ectópica, dislipemia, reducción de la adipogénesis…) además de incrementar el estrés oxidativo y la fibrosis [91,93].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

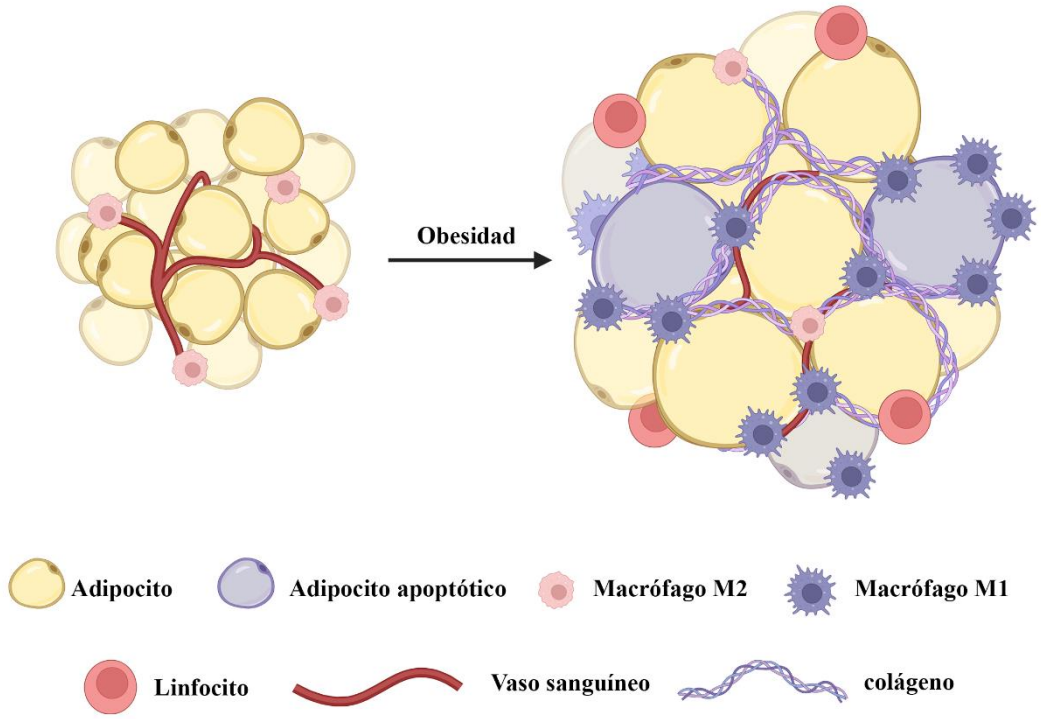


Figura 1.2.: Procesos proinflamatorios y profibróticos en el TA durante el desarrollo de la obesidad. En condiciones fisiológicas normales el TAB, formado por adipocitos pequeños y células del sistema inmune como los macrófagos M2 y linfocitos, presenta una elevada densidad de vasos sanguíneos que permiten suplir las necesidades de nutrientes y O_2 del tejido. La expansión patológica y la reducción de la vascularización del TAB en la obesidad producen un incremento de la lipotoxicidad, la necrosis y la hipoxia, estimulando la síntesis de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, y el reclutamiento de macrófagos M1 proinflamatorios. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

1.2.1.3.6. Estrés oxidativo

El aumento del estrés oxidativo en la obesidad no depende únicamente de la secreción de citoquinas proinflamatorias, sino que también está provocado por la acumulación excesiva de lípidos y la disfunción mitocondrial [122]. Se ha demostrado que en las personas obesas se producen alteraciones de la biogénesis, la morfología y la función mitocondrial que, junto con un exceso de sustrato energético, provocan un incremento de la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE) y, por lo tanto, una producción mitocondrial excesiva de superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y productos de la peroxidación lipídica [122,123]. A pesar de la existencia de mecanismos antioxidantes de protección, una exposición continua a concentraciones excesivas de especies reactivas de oxígeno (EROs) afecta negativamente a la homeostasis y función endocrina del TAB [124,125].

1.2.1.3.7. Resistencia a la insulina y lipotoxicidad

En condiciones normales, el metabolismo lipídico del TAB es un proceso metabólico altamente regulado: tras la ingesta de alimentos (fase postprandial), la insulina estimula el almacenamiento de TG en los adipocitos, mientras que en situaciones dónde se necesita un mayor aporte energético se estimula la lipólisis, proceso

enzimático en el que los TG se descomponen en FA y glicerol por acción de las enzimas lipolíticas lipasa adipocítica de TG (ATGL, *adipose triglyceride lipase*) y lipasa sensible a hormonas (HSL, *hormone-sensitive lipase*) [92,93,126]. Las alteraciones producidas en la señalización de la insulina durante la obesidad provocan una desregulación de la lipólisis y, con ello, un incremento de los niveles circulantes de FA, que se acumulan de forma ectópica en diferentes tejidos metabólicos (hígado, músculo esquelético, corazón, páncreas…), induciendo lipotoxicidad [127,128].

1.2.1.4. Tratamiento de la obesidad

Debido al papel fundamental que juega la obesidad en el desarrollo de otras enfermedades, uno de los objetivos del "Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020" de la OMS se centró en reducir la prevalencia de la obesidad [72,129]. Actualmente existen diferentes opciones terapéuticas para intentar controlar el desarrollo y /o avance de la obesidad:

Tratamiento no farmacológico: la terapia de primera línea de los pacientes con obesidad en Estados Unidos y Europa se centra en una dieta saludable hipocalórica (una reducción de 500 kcal con respecto a los requisitos energéticos diarios) y en un incremento de la actividad física (superar los 150 minutos de ejercicio físico semanal) [130,131]. Con estas modificaciones no solo se consigue una disminución de peso corporal, sino que también se preserva o incrementa la masa muscular [131].

Tratamiento farmacológico: la semaglutida y la liraglutida, 2 antagonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide-1*), utilizados en el tratamiento de la DMT2 (ver apartado 1.2.2.4.1.3 introducción), fueron aprobados recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) como alternativa terapéutica en obesidad, debido a su capacidad para reducir de manera significativa el peso corporal de los pacientes obesos en comparación con el placebo [132–134]. Otras opciones farmacológicas, aunque menos utilizadas, con capacidad para reducir el peso en pacientes con obesidad son el orlistat, un inhibidor reversible de las lipasas intestinales y pancreáticas; y la combinación de naltroxona, un fármaco antagonista del receptor de opioides μ, con el antidepresivo bupropion, que actúa inhibiendo la liberación de dopamina y norepinefrina, y como antagonista débil de los receptores de acetilcolina [135–139].

Tratamiento quirúrgico: en pacientes con obesidad severa (tipo III o tipo II con comorbilidades asociadas), en los que la terapia farmacológica ha fracasado, se recurre a la cirugía bariátrica [140]. Estudios recientes han demostrado que, además de la pérdida de peso fácil y sostenible en el tiempo permite, la cirugía bariátrica también presenta efectos beneficiosos en el manejo de comorbilidades como enfermedades respiratorias, musculoesqueléticas, CVs, etc. [141].

1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 es una enfermedad metabólica, crónica y heterogénea caracterizada por niveles elevado de glucosa en sangre debido a una acción ineficaz de la insulina, lo que se conoce como RI [142–144]. Para intentar mantener la homeostasis de la glucosa,

las células β-pancreáticas incrementan la secreción de insulina cuando es necesario, pero esta producción excesiva no puede mantenerse en el tiempo, y acaba decayendo [144,145]. La DMT2 se relaciona con complicaciones graves que afectan a la calidad de vida de los pacientes, y que pueden ser macrovasculares (ECVs como la enfermedad de las arterias coronarias, IC, accidente cerebrovascular, etc.) o microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) [146].

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DMT2 son la obesidad, la edad, el sexo, la etnia, la HTA, la dislipemia, la MASLD, la inactividad física, antecedentes familiares de diabetes, síndrome del ovario poliquístico y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [147–150].

1.2.2.1. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2

Los datos recogidos en el Atlas de diabetes de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*) estiman que, en el año 2021, la DMT2 afectaba a 537 millones de personas a nivel mundial, siendo la prevalencia de la DMT2 en la población comprendida entre los 20 y los 79 años del 10.5 % (Fig. 1.3.) [151]. Se espera que la prevalencia de la DMT2 continúe en aumento, pudiendo llegar a afectar a 783 millones de personas (12.2%) para el año 2045 [151]. Sin embargo, la incidencia de la DMT2 parecería haberse estabilizado o incluso reducido en los países en vías de desarrollo, debido a la mejora en el diagnóstico temprano y en las terapias farmacológicas [151]. En el mismo Atlas también aparecen recogidos los datos sobre la prevalencia de la DM en Europa que, en 2021, afectó a 61 millones de adultos, y fue la causante de 1.1 millones de muertes, lo que supuso un gasto de 189 mil millones USD (dólares estadounidenses, *United States dollar*) [151].

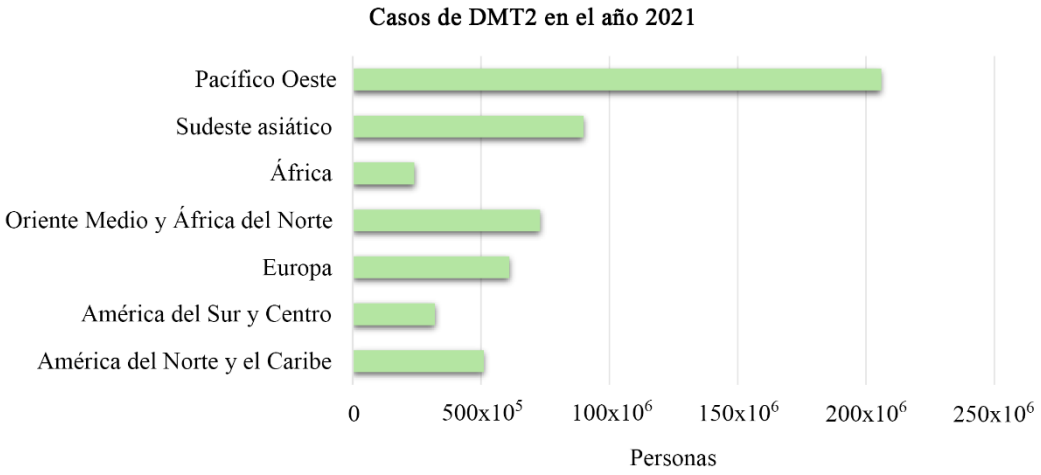


Figura 1.3.: Representación gráfica del número de pacientes con DMT2 y su distribución geográfica según los datos proporcionados por el Atlas de diabetes, publicado en el año 2021 por la Federación Internacional de la Diabetes [151]. Figura de autoría propia.

En el año 2014, en España, se llevó a cabo un estudio nacional, transversal y multicéntrico, cuyos resultados demostraron que la prevalencia de la DMT2 en la población española con sobrepeso u obesidad era del 23.6 % [152].

1.2.2.2. Síntomas y diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2

El desarrollo de la hiperglucemia en la DMT2 es un proceso muy gradual, por lo que las fases iniciales de la DMT2 son prácticamente asintomáticas, dificultando el diagnóstico temprano [149,153,154]. En fases más avanzadas los principales síntomas son sed desmesurada, aumento del apetito acompañado de pérdida de peso, micción excesiva, cansancio, visión borrosa, entumecimiento de las extremidades y cicatrización lenta [155]. Cuando los niveles de glucosa en sangre alcanzan niveles peligrosamente elevados aparecen náuseas, vómitos, dolor abdominal, somnolencia, confusión, desorientación y convulsiones pudiendo llegar al estado de coma [155].

Un estudio de la IDF realizado a nivel global reveló que un 72% de las personas con DM fueron diagnosticadas tras la aparición de las complicaciones relacionadas con la enfermedad [156]. Además, se estima que en el año 2021 el 50% de las personas con DMT2 no fueron diagnosticadas [149]. Por este motivo, y con el fin de prevenir y/o retrasar la aparición de complicaciones, se recomienda la realización de prueba rutinarias para la detección de la DMT2 en los centros de atención primaria, a personas que presenten algunos de los síntomas característicos o que presenten factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad [149,152,157].

Actualmente se utilizan 3 pruebas diferentes para el diagnóstico de la DMT2:

Prueba de la hemoglobina glucosilada (HbA1c): es una medida indirecta de los valores promedios de glucosa en sangre en los últimos 3 meses [149,154]. No requiere de ayuno [155]. El diagnóstico de la DM se realiza cuando los valores de HbA1c son iguales o superiores a 6.5%, mientras que valores comprendidos entre 5.7 % y 6.4 % indican la presencia de prediabetes (Tabla 1.2.) [150,155,157]. Si los valores de HbA1c son inferiores a 5.7 % se consideran normales (Tabla 1.2.) [157].

Prueba de glucosa plasmática en ayunas: es una medida directa de la concentración de glucosa en sangre. Como su propio nombre indica, requiere un ayuno previo de 8 horas, durante las cuales solamente está permitida la ingesta de agua [150,155,157]. Niveles de glucosa inferiores a 100 mg/dL se considera normales (Tabla 1.2.) [155,157]. Si los niveles de glucosa se encuentran en el rango de 100 a 125 mg/dL, el paciente se encuentra en situación de prediabetes o presenta la glucosa alterada en ayunas, si estos valores aumentan llegando a superar los 126 mg/dL el paciente padece DM (Tabla 1.2.) [150,155,157].

Prueba de la tolerancia oral a la glucosa (TOG): este test permite evaluar como gestiona el organismo una dosis estándar de glucosa [155,157]. En este caso también se realizará un ayuno de 8 horas como mínimo [155,157]. Tras tomar una muestra de sangre basal, el paciente debe ingerir una disolución de glucosa y, posteriormente, se toman muestras sanguíneas a diferentes tiempos [155,157]. Niveles de glucosa inferiores a 140 mg/dL se considera normales, mientras que valores comprendidos entre 140 y 199 mg/dL indican la presencia de prediabetes (Tabla 1.2.) [155,157]. Si los niveles de glucosa en sangre superan los 200 mg/dL el paciente padece DMT2 (Tabla 1.2.) [150, 155,157].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.2.: Valores plasmáticos de HbA1c y glucosa para el diagnóstico de prediabetes o DM [150, 155,157].

	Normal	Prediabetes	Diabetes Mellitus
Prueba de la HbA1c	< 5.7 %	5.7 % - 6.4 %	> 6.5 %
Prueba de glucosa plasmática en ayunas	< 100 mg/dL	100 mg/dL – 125 mg/dL	> 125 mg/dL
Prueba de la tolerancia oral a la glucosa	< 140 mg/dL	140 mg/dL – 199 mg/dL	> 200 mg/dL

1.2.2.3. Fisopatología diabetes mellitus tipo 2

Los islotes de Langerhans se localizan en el páncreas y están formados por un 50 % de células β, encargadas de la secreción de insulina y del polipéptido amiloide de los islotes, un 35-40 % de células α, productoras de glucagón, y un 10-15 % de células δ, encargadas de la secreción de la somastatina [158,159]. Tras la ingesta de alimentos, los niveles plasmáticos de glucosa aumentan y son detectados por las células β, las cuales secretan la cantidad necesaria de insulina que, mediante la unión a su receptor localizado en la membrana plasmática de las células diana, estimula la traslocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática, permitiendo la absorción de la glucosa para ser utilizada como sustrato energético en el músculo esquelético y el TA, y promover su almacenamiento como glucógeno en el hígado y el músculo esquelético [159–162].

Cuando la ingesta calórica es excesiva, como por ejemplo en los individuos obesos, se produce una respuesta disfuncional de los tejidos a la insulina conocida como RI, que conlleva a una captación insuficiente de la glucosa circulante y a una inhibición de la gluconeogénesis disfuncional, por lo que las células β-pancreáticas incrementan la secreción de insulina para intentar mantener, aunque de forma insatisfactoria, una correcta homeostasis de la glucosa [122,160,162]. Se ha demostrado que las personas con RI presentan un mayor riesgo de desarrollar ECVs como el IM o la IC [163].

1.2.2.3.1. Disfunción de las células β-pancreáticas

La sobreestimulación de las células β-pancreáticas en la RI conduce al desarrollo de hiperinsulinemia que, en combinación con una elevación crónica de los niveles plasmáticos de glucosa y lípidos (ambiente glucolipotóxico), provoca la disfunción y pérdida de las células β-pancreáticas, la producción de niveles insuficientes de insulina y, finalmente, el desarrollo de la DMT2 [162,164]. Análisis histológicos de los islotes de Langerhans han demostrado una reducción del porcentaje de masa de las células β-pancreáticas próxima al 40 % en pacientes con DMT2, lo cual se relaciona con un incremento de los procesos apoptóticos [165]. Además, durante la DMT2 se produce un aumento de la inflamación e infiltración de células del sistema inmune, como por ejemplo los macrófagos, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en los islotes de Langerhans, proceso conocido como insulinitis [166–168].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2.3.2. Alteraciones de la gluconeogénesis

Durante el ayuno o en situaciones de elevada demanda energética, el hígado degrada el glucógeno almacenado para sintetizar glucosa (gluconeogénesis) y secretarla al torrente sanguíneo, manteniendo la homeostasis de la glucosa y el metabolismo energético en diferentes tejidos; mientras que, tras la ingesta de alimentos, la secreción de insulina inhibe la producción hepática de glucosa y estimula su almacenamiento [162,169]. Sin embargo, debido a la RI característica de la DMT2, en individuos con esta patología no se produce la inhibición de la gluconeogénesis hepática, estimulándose la síntesis de lípidos, lo que conduce a una situación de hiperglucemia e hipertrigliceridemia, incluso en ayunas [170,171].

1.2.2.4. Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

Debido a las complicaciones que presenta la DMT2 y a su implicación en el desarrollo de ECVs, en los últimos años la comunidad científica y médica se ha centrado en intentar prevenir o frenar su avance [172]. Para ello, además de llevar un estilo de vida saludable (pérdida de peso, dieta, ejercicio físico, etc.), el tratamiento de la DMT2 suele ir acompañado de una terapia farmacológica [173–175]. Inicialmente, los esfuerzos para tratar la DMT2 se centraron en el control glucémico de los pacientes [173,175]. Asociaciones como la Asociación Estadounidense del Corazón (AHA, *American Heart Association*), la Asociación Americana de Diabetes (ADA, *American Diabetes Association*), la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD, *European Association for the Study of Diabetes*) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC, *European Society of Cardiology*) propusieron como objetivo niveles de HbA1c < 7%, aunque estos valores pueden variar dependiendo de la edad y la presencia o no de ECV aterosclerótica [176]. Sin embargo, desde el año 2008, además de la reducción de los niveles de glucosa en sangre, también se busca revertir el daño provocado por la DMT2 en órganos como el corazón y los riñones [175]. En la actualidad existen diversas opciones terapéuticas, las cuales se elegirán en función del peso del paciente y del riesgo que presente a sufrir ECVs o hipoglucemia [173].

1.2.2.4.1. Tratamiento farmacológico

1.2.2.4.1.1. Insulina

La fisiopatología de la DMT2 se caracteriza por la secreción deficiente de insulina en presencia de RI, por lo que la terapia con insulina solo se plantea cuando el tratamiento con otros fármacos no ha sido capaz de reducir los niveles plasmáticos de glucosa o cuando estén contraindicados [177,178]. La terapia con insulina (insulina basal sola o premezclada en terapia basal y de bolo o de infusión continua subcutánea) busca revertir los daños producidos por la hiperglucemia en la vasculatura [177]; sin embargo, debido a la heterogeneidad de la DMT2, es difícil establecer cuál es la forma más adecuada para la administración de la terapia con insulina [179].

1.2.2.4.1.2. Biguanidas

Son una familia de compuestos químicos básicos, cuya estructura está conformada por la unión de 2 moléculas de guanidina a través de un átomo de nitrógeno, y que se caracterizan por su capacidad para reducir la producción hepática de glucosa y mejorar la respuesta a la insulina [173,180–182].

En 1922 se sintetizó la metformina (1,1-dimetilbiguanida), una biguanida con acción antihiperglucémica que además presenta efectos beneficiosos a nivel CV, y que destaca por su seguridad, tolerabilidad y coste relativamente bajo, por lo que en 1994 fue aprobada por la FDA para el tratamiento de la DMT2 [173,181,183,184]. En la actualidad la metformina aparece recogida en las guías de uso clínico como terapia de primera línea en el tratamiento de la DMT2 [183–185]. Diferentes estudios han demostrado que la metformina bloquea una lanzadera redox mitocondrial, inhibiendo la gluconeogénesis hepática, e inhibe la absorción intestinal de la glucosa procedente de la dieta [183,185]. Sin embargo, se cree que se trata de un fármaco con múltiples modos de acción, muchos de los cuales están todavía por esclarecer [175,185,186].

Uno de los aspectos negativos del tratamiento con metformina es la gran variedad de efectos secundarios que provoca, lo que reduce la adherencia y el cumplimiento de la pauta terapéutica [187]. Por este motivo, si tras 3 meses de monoterapia con metformina, los niveles de HbA1c continúan siendo superiores al 7.0%, debería de utilizarse una terapia combinada empleando fármacos que presenten diferentes mecanismos de acción [173,187].

1.2.2.4.1.3. Agonistas del receptor del péptido 1 similar a la glucosa

El GLP-1 es una hormona producida y liberada en el intestino en respuesta a la ingesta de nutrientes, principalmente glucosa y grasas [188–190]. La unión del GLP-1 a su receptor (GLP-1R, *glucagon-like peptide-1 receptor*) estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa por las células β-pancreáticas, reduce la producción de glucagón por parte de las células α e inhibe la apoptosis [188,189]. Además, el GLP-1 también ejerce su efecto en otros órganos como el hipotálamo, el estómago, el TA, el músculo esquelético y el corazón, provocando un incremento de la sensación de saciedad, el retraso en el vaciado gástrico, y la reducción del peso corporal [189,191,192]. Debido al papel que juega la GLP-1 en el metabolismo de la glucosa, se han diseñado diferentes agonistas del GLP-1R (exenatida, dulaglutida, liraglutida, lixisenatida y semaglutida), los cuales son menos susceptibles a la degradación proteolítica, para el tratamiento de la DMT2 y la obesidad [191–193]. Además, se ha demostrado que los agonistas del GLP-1R reducen significativamente el riesgo de eventos CV mayores [194].

Los agonistas del GLP-1R se clasifican en agonistas de acción corta (exenatida, lixisenatida), los cuales se caracterizan por provocar una desaceleración más pronunciada del vaciado gástrico, y los agonistas de acción prolongada (liraglutida, exenatida y dulaglutida, semaglutida), cuyo efecto se centra en el incremento de la secreción de insulina, y la disminución de la liberación de glucagón [189,191]. La administración de estos agonistas se realiza mediante inyecciones subcutáneas a excepción de la semaglutida, el cual también está disponible para administración por vía oral, favoreciendo la adherencia de los pacientes al tratamiento [188,191,192].

1.2.2.4.1.4. Tiazolidinadionas (TZD)

La activación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (PPARγ, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), expresado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

principalmente en el TA blanco, juega un papel importante en la adipogénesis al estimular la absorción de FA, la formación de TG y la acumulación de lípidos [173,195–197]. Además, PPARγ participa en la regulación del metabolismo de la glucosa al mejorar la sensibilidad a la insulina, estimular el consumo de la glucosa en el músculo e inhibir la gluconeogénesis hepática [195]. Por este motivo se ha propuesto la activación de PPARγ como una diana terapéutica para el tratamiento de la DM [198].

Las TZD o glitazonas (pioglitazona, troglitazona y la rosiglitazona) son una clase de fármacos para el tratamiento de la DMT2 descubiertos a finales de la década de los 90 que, mediante la activación de PPAR-γ, incrementando la sensibilidad de tejidos diana de la insulina, además de participar en procesos implicados en la angiogénesis y la inflamación [173,197,199,200]. Otros de los efectos beneficiosos de las TZD son la vasodilatación junto con la reducción de la PA [196]. A diferencia de la terapia con insulina o con sulfonilureas, el tratamiento de pacientes diabéticos con TZD no causa hipoglucemia [196]. Sin embargo, su uso para el tratamiento de la DMT2 se ha relacionado con la aparición de diversos efectos adversos graves como incremento de peso, edema, retención de líquidos, cardiotoxicidad e IC por lo que, a excepción de la pioglitazona, el resto de TZD han sido retiradas del mercado [173,196,197].

1.2.2.4.1.5. Sulfonilureas

En 1942 se descubrió la capacidad de las sulfonilureas para reducir los niveles de glucosa en sangre, por lo que durante 60 años las sulfonilureas fueron los fármacos de primera línea para el tratamiento de la DMT2, hasta que a finales de la década de los 90 fueron remplazadas por la metformina y quedaron relegadas como terapia de segunda línea para el tratamiento de la DMT2 [201,202]. La regulación del metabolismo de la glucosa por parte de las sulfonilureas se produce mediante su unión a una de las subunidades del canal de potasio activado por adenosín trifosfato (ATP) (K_{ATP}) de las células β-pancreáticas, lo que provoca su despolarización y la liberación de insulina [203–205].

En la actualidad, a pesar de los grandes avances realizados en las terapias farmacológicas para el tratamiento de la DMT2, las sulfonilureas siguen siendo los antidiabéticos orales más comúnmente recetados en el caso de que tenga lugar alguna intolerancia a la metformina [206]. Sin embargo, debido a los efectos adversos que presenta la terapia con sulfonilureas (hipoglucemia, aumento de peso, una mayor incidencia de accidente cerebrovascular isquémico, mortalidad CV, etc.), existen diversos debates sobre si deben seguir usándose como terapia de segunda línea [204].

1.2.2.4.1.6. Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)

En 1966 se descubrió la DPP-4, una glucoproteína expresada en la superficie de todas las células humanas y que presenta actividad exopeptidasa [207,208]. Además de participar en la regulación de la respuesta inmune, la inflamación, el estrés oxidativo, y la apoptosis, la DPP-4 desempeña un papel importante en el metabolismo de la glucosa al inactivar hormonas como la GLP-1 y el polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP, *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) [207–211].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Al igual que la GLP-1, el GIP es liberado por el intestino en respuesta a la ingesta de nutrientes, y estimula la secreción de insulina dependiente de la glucosa por parte de las células β-pancreáticas pero, en este caso, la secreción de glucagón no se ve afectada [211]. Debido a la importancia de GLP-1 y el GIP en el control glucémico, desde el año 2006 se emplean los inhibidores de DPP-4 en el tratamiento de la DMT2 [209,210]. La sitagliptina, fue el primer inhibidor de la DPP-4 aprobado para su comercialización, seguido de la vildagliptina, la saxagliptina, la alogliptina y la linagliptina [210]. Estos inhibidores de administran por vía oral y destacan por su buena tolerabilidad, su capacidad para controlar la glucemia y la PA, y su capacidad para prevenir las lesiones relacionadas con la osteoporosis; aunque el uso de los inhibidores saxagliptina y alogliptina se ha relacionado con un incremento del riesgo de IC en pacientes con ECVs [207,209,210,212].

1.2.2.4.1.7. Inhibidores del co-transportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)

La glucosa obtenida tras la ingesta de alimentos es transferida desde el lumen del intestino al citoplasma de los enterocitos mediante transporte activo mediado por el cotransportador de sodio-glucosa (SGLT) tipo 1 (SGLT1), expresado en la membrana apical, y posteriormente penetra en el torrente sanguíneo mediante difusión facilitada mediada por el transportador de glucosa (GLUT) tipo 2 (GLUT2), localizado en la membrana basolateral [213]. A continuación, en condiciones normales (niveles de glucosa en plasma ≈ 5,6 mmol/L y filtración glomerular ≈ 180 L/día) la glucosa plasmática es filtrada por los riñones y reabsorbida completamente (≈ 180 g/día) en el túbulo proximal tempano por acción de los SGLTs y los GLUTs [214,215].

Los SGLT2s se expresan casi de manera exclusiva en el segmento S1 del túbulo proximal, y se encargan de la reabsorción del 97% de glucosa; mientras que el 3% restante de la glucosa es reabsorbida en los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal renal por acción del SGLT1 (Fig. 1.4.) [214–220]. Los SGLT2 reabsorben la glucosa del filtrado glomerular y la cotransportan, junto con 2 moléculas de Na^+, al citoplasma celular [217,221]. La fuerza motriz del cotransporte de glucosa y Na^+ realizado por los SGLT2s y SGLT1s se obtiene a partir de la acción de la adenosintrifosfatasa (ATPasa) de Na^+ y K^+ (Na^+-K^+-ATPasa) basolateral, una proteína transmembrana que extrae 3 iones de Na^+ por cada 2 iones de K^+ que entran en el citosol celular, generando un voltaje interior negativo (Fig. 1.4) [214,221]. Posteriormente, la glucosa citoplasmática es transportada de forma pasiva de vuelta al plasma sanguíneo a través de GLUT2 o del GLUT tipo 1 (GLUT1), el cual también permite la reentrada de glucosa desde el espacio peritubular (Fig. 1.4.) [214,221].

En personas con DMT2 las concentraciones plasmáticas de glucosa son tan elevadas que superan la capacidad máxima de reabsorción renal de glucosa, por lo que cabría esperar que cierta cantidad de la misma fuese eliminada a través de la orina (glucosuria) [220,222]. Sin embargo, se ha observado un incremento de la capacidad máxima de reabsorción renal de glucosa en pacientes diabéticos, junto con un aumento del nivel umbral para la glucosuria y de la expresión renal de los SGLT2, dando como resultado un incremento de reabsorción renal de la glucosa y del Na^+ [213,221,223,224].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por estos motivos se ha propuesto la inhibición de los SGLT2s como potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de la DMT2 [219,225].

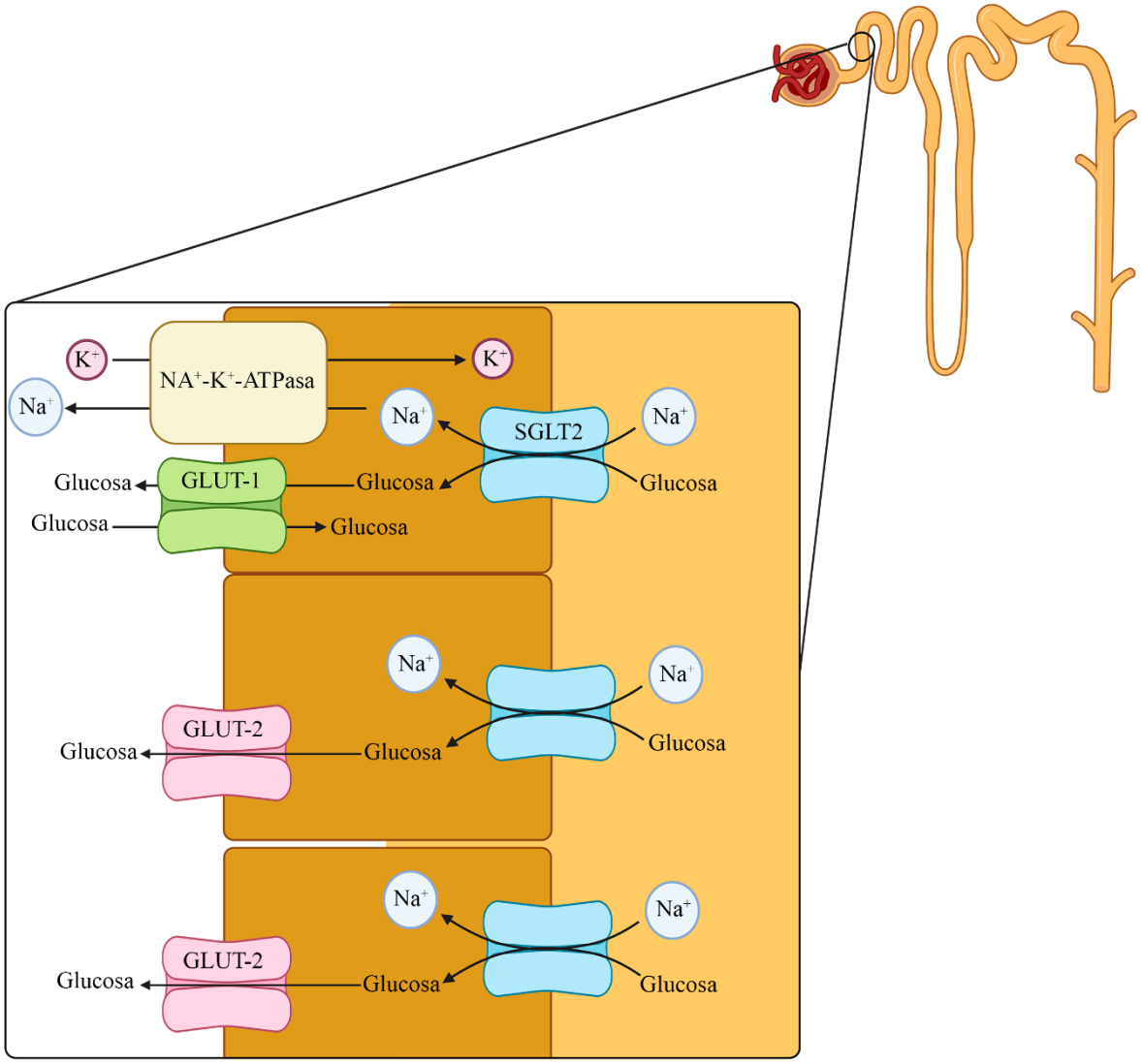


Figura 1.4.: Representación del proceso de reabsorción de la glucosa a nivel del segmento 1 del túbulo proximal renal. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

Los inhibidores de los SGLT2 (iSGLT2) son una serie de fármacos sintéticos basados en la estructura química de la floridzina (floretina-2-'O-β-D-glucopiranósido), un principio activo extraído de la corteza del manzano con propiedades antihiperglucémicas [226–228]. Su mecanismo de acción se basa en la unión al SGLT2 de forma selectiva (empagliflozina (EMPA), dapagliflozina y luseogliflozina) o no selectiva (sotagliflozina y canagliflozina, que inhiben los SGLT2s y los SGLT1s indistintamente), impidiendo la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal renal, lo que genera un incremento de la glucosuria, llegando a eliminarse ente

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

40 - 80 g de glucosa/día en la orina, junto con una reducción de la HbA1c de entre 0.5 - 0.7 % (Fig. 1.5.) [219,229,230].

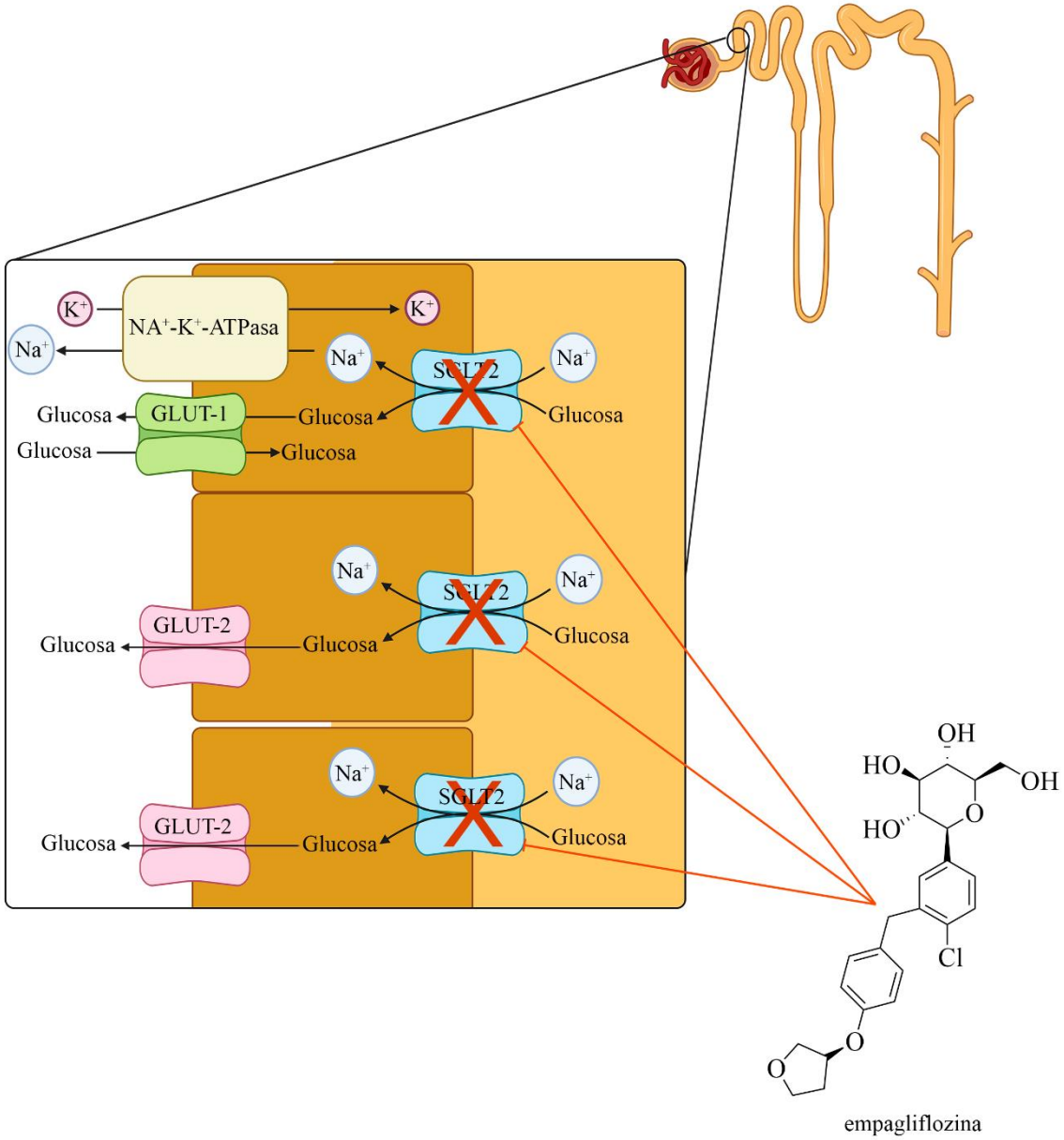


Figura 1.5.: Mecanismo de acción del iSGLT2 EMPA. La EMPA es un antidiabético oral que inhibe de forma selectiva los SGLT2 del túbulo proximal renal, disminuyendo la reabsorción de la glucosa e incrementando su excreción en la orina. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

En la actualidad se han sintetizado y aprobado una gran variedad de iSGLT2, conocidos como gliflozinas (dapagliflozina, canagliflozina, EMPA, ipragliflozina, luseogliflozina, tofogliflozina, y ertugliflozina), para el tratamiento de la DMT2, y algunos, como la sotagliflozina, incluso para el tratamiento de la DM tipo 1 (DMT1) [226,231].

Además de su papel en el control de la hiperglucemia, los iSGLT2 también han demostrado tener efectos beneficiosos a nivel CV y renal [221,226,229]. La protección renal por parte de los iSGLT2 en pacientes diabéticos, e incluso no diabéticos, no queda únicamente relevada al incremento de la glucosuria y a la inhibición de la reabsorción renal de la glucosa, sino que diferentes estudios, realizados en humanos y animales, han demostrado la capacidad de los iSGLT2 para reducir el consumo de O_2 renal, la producción de EROs, y la expresión de marcadores de inflamación y de fibrosis; así como para mejorar el metabolismo energético renal [225,226,232,233]. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con gliflozinas ha conseguido reducir el riesgo y la mortalidad CV, y el desarrollo y la progresión de la IC en pacientes diabéticos y no diabéticos, lo que parece estar relacionado con sus efectos beneficiosos a nivel hemodinámico y metabólico, junto con su capacidad para reducir el peso corporal [234–238].

1.2.2.5. Empagliflozina

De entre todas las glifozinas, es importante destacar el papel de la EMPA (Jardiance®) sintetizada por Boehringer Ingelheim GmbH (DEU) en colaboración con Eli Lilly and Compan (USA) (Fig. 1.6.), objeto de estudio de esta tesis doctoral, la cual fue aprobada para el tratamiento de pacientes con DMT2 en mayo de 2014 por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA; *European Medicines Agency*) [239] y en agosto de 2014 por la FDA [240].

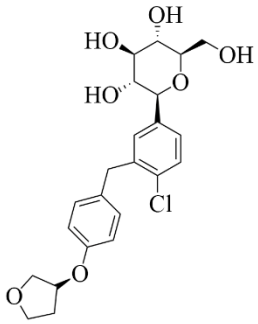


Figura 1.6.: Representación gráfica de la estructura molecular del (1S)-1,5-Anhidro-1-C-[4-cloro-3-[[4-[[(3S)-tetrahidro-3-furanil]oxi]fenil]metil]fenilo]-D-glucitol (empagliflozina). Imagen de autoría propia realizada con el programa informático ChemDraw® 23.1.1.

De todos los iSGLT2s, la EMPA es la molécula que presenta la mayor selectividad por el SGLT2 sobre el SGLT1 (aproximadamente 2600 veces) [241].

1.2.2.5.1. Posología y propiedades farmacocinéticas de la empagliflozina

Para el tratamiento de la DMT2, la posología recomendada de la EMPA es 10 mg/día por vía oral aunque, en pacientes que necesiten un mayor control glucémico y presenten una buena tolerancia al tratamiento junto con una tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) ≥ 60 ml/min/1.73 m^2, se puede administrar la dosis máxima de 25 mg/día [242,243]. Además, el tratamiento con EMPA permite su combinación con otros fármacos para el tratamiento de la DMT2 [243].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Es un fármaco de absorción rápida cuya concentración plasmática máxima se alcanza en menos de 2 horas, y que no se ve afectada en presencia de alimentos, metabolizándose principalmente por glucuronidación [242].

1.2.2.5.2. Ensayos clínicos de la empagliflozina

En el año 2010 comenzó el primer ensayo clínico que permitió evaluar los efectos de la monoterapia de pacientes con DMT2 con EMPA, en comparación a sitagliptina (NCT01177813) [244,245], tras observar sus efectos beneficiosos en el control glucémico, pérdida de peso y control de la PA, en combinación con otros fármacos antidiabéticos como la suma de metformina y sulfonilureas [246], o de metformina y la tiazolidinadiona pioglitazona [247].

En este primer ensayo clínico de fase III, aleatorizado, multicéntrico doble ciego, de grupos paralelos y con comparador activo, se buscaba evaluar la eficacia y tolerabilidad de la EMPA en pacientes con DMT2 que no habían recibido tratamiento farmacológico en las 12 semanas anteriores [244,245]. Tras una fase de preinclusión de etiqueta abierta con placebo durante 2 semanas, los 899 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (Tabla 1.3.) fueron aleatorizados en proporción 1:1:1:1 en los grupos de tratamiento con 10 mg de EMPA (224 pacientes), 25 mg de EMPA (224 pacientes), 100 mg de sitagliptina (223 pacientes) o placebo (228 pacientes) durante 24 semanas [244,245]. Los resultados demostraron que la monoterapia con EMPA mejoraba el control glucémico en pacientes con DMT2 con un amplio rango de valores iniciales de HbA1c, siendo mayores las reducciones de los niveles de HbA1c en los pacientes con los niveles plasmáticos basales de HbA1c más elevados [244,245]. Además, el tratamiento con EMPA mostró reducciones importantes del peso, la circunferencia de la cintura y la PA sistólica, en comparación con la sitagliptina y el placebo [244,245].

Los resultados obtenidos en este ensayo clínicos impulsaron la evaluación del efecto del tratamiento con EMPA en otras poblaciones de pacientes como, por ejemplo, en pacientes jóvenes con DMT2 e incluso en pacientes con DMT1.

DINAMO (DIabetes study of liNAgliptin and eMpagliflozin in children and adOlescents) (abril 2018 - mayo 2022) [248]: ensayo clínico fase III, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, de grupos paralelos y controlado con placebo [248]. Permitió evaluar la eficacia y seguridad de la EMPA y la linagliptina en el control glucémico de jóvenes con DMT2 frente a placebo [248]. Los 158 jóvenes que cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.3.) fueron aleatorizados en una proporción 1:1:1 en los grupos de tratamiento linagliptina 5 mg (53 pacientes), EMPA 10 mg (52 pacientes) o placebo (53 pacientes) [248]. El tratamiento se administró una vez al día durante 26 semanas, y los resultados demostraron una reducción significativamente mayor de los niveles de HbA1c con el tratamiento con EMPA (0.84%) frente al placebo que con el tratamiento con linagliptina (0.34%) en comparación al grupo placebo [248].

EASE-2 y EASE-3 (Empagliflozin as Adjunctive to inSulin thErapy) (2015 – 2017) [249]: ensayos clínicos fase III, aleatorizados, multicéntricos, doble ciego, de grupos paralelos y controlados con placebo [249]. Permitieron evaluar la seguridad y

eficacia de diferentes dosis de EMPA como complemento de la insulina intensificada en pacientes DMT1 [249]. 1681 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.3.) fueron incluidos en los ensayos [249]. Antes de la aleatorización se intensificó el tratamiento con insulina durante 6 semanas y se realizó un periodo de rodaje con placebo de 2 semanas, seguidos de un seguimiento de seguridad de 3 semanas [249]. En el ensayo EASE-2 participaron 723 adultos que fueron aleatorizados en los grupos de tratamiento EMPA 10 mg (243 pacientes), EMPA 25 mg (241 pacientes) o placebo (239 pacientes); mientras que en el ensayo EASE-3 958 pacientes fueron aleatorizados en los grupos de tratamiento EMPA 2.4 mg (237 pacientes), EMPA 10 mg (244 pacientes), EMPA 25 mg (242 pacientes) o placebo (238 pacientes) [249]. La duración de los estudios fue de 52 (EASE-2) y 26 (EASE-3) y se realizó una monitorización del perfil glucémico basal y durante el tratamiento [249]. Los resultados obtenidos en ambos estudios demostraron que el tratamiento con EMPA redujo significativamente los niveles de HbA1c, observándose el mayor efecto a las 12 semanas de tratamiento (resultado primario) [249]. A las 26 semanas se observó que el tratamiento con las diferentes dosis de EMPA disminuyó el peso corporal, la dosis diaria total de insulina, y la PA sistólica y diastólica [249]. Además, el tratamiento con EMPA aumentó el tiempo de permanencia de la glucosa en el rango de +1.0/+2.9/+3.1 horas/día [249].

Debido a los efectos beneficiosos en factores de riesgo CV como la PA, el peso corporal, la adiposidad y el estrés oxidativo, del tratamiento con EMPA observados en los ensayos clínicos iniciales en los pacientes con DMT2 [250], se procedió a la realización de un nuevo estudio clínico en el que se evaluaron los efectos CV del tratamiento con EMPA en pacientes con DMT2 (EMPA-REG OUTCOME) [230,251].

EMPA-REG OUTCOME (BI 10773 [Empagliflozin] Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients) (NCT01131676, septiembre 2010 – abril 2015) [230,251]: ensayo clínico fase III, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, de grupos paralelos y controlado con placebo que ha sido diseñado para evaluar la seguridad CV a largo plazo después del tratamiento con EMPA de pacientes con DMT2, y estudiar sus posibles efectos cardioprotectores y a nivel de la microvasculatura. Los 7028 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (Tabla 1.3.) recibieron placebo durante 2 semanas manteniendo el tratamiento antiglucémico basal, y posteriormente los pacientes se aleatorizaron en una proporción 1:1:1 en los grupos de tratamiento con 10 mg de EMPA (2345 pacientes), 25 mg de EMPA (2342 pacientes) y placebo (2333 pacientes) [230,251]. La mediana del tiempo de tratamiento fue de 2.6 años, y la del período de observación fue de 3.1 años en los 3 grupos de tratamiento [230]. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con EMPA redujo significativamente las muertes por causas CV, los IM no mortales (excepto IM silencioso) y el ictus no mortal en comparación con el placebo (resultado primario) [230,251]. Sin embargo, no se observaron cambios en la combinación del resultado primario con la hospitalización por angina inestable [230,251].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

De los 7028 pacientes que participaron en el estudio, 706 (10.1%) presentaban IC, por lo que posteriormente también se evaluaron los efectos del tratamiento con

EMPA en los resultados de IC de los 3 grupos de tratamiento [252]. El tratamiento con EMPA redujo significativamente la hospitalización por IC y la muerte por IC o por todas las causas en comparación con el grupo placebo [252].

Tabla 1.3.: Criterios de inclusión en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con EMPA en pacientes adultos con DMT2.

	Criterios de inclusión
NCT01177813 [244,245]	Pacientes ≥ 18 años (en Japón ≥ 20 años y en India entre 18 y 65 años) Sin tratamiento con fármacos antidiabéticos en las 12 semanas previas a la aleatorización o a inicio del tratamiento abierto HbA1c ≥ 7.0 % y ≤ 10.0% (HbA1c ≥ 7.0 y ≤ 9.0% en Alemania) en el cribado para los pacientes elegibles para el tratamiento aleatorizado HbA1c >10.0 % en el cribado para los pacientes elegibles para el grupo de tratamiento abierto IMC ≤ 45 kg/m²
DINAMO NCT03429543 [248]	Pacientes de entre 10 y 17 años DMT2 durante al menos las 8 semanas previas a la inclusión HbA1c ≥ 6.5% y ≤ 10.5% IMC ≥ 85 percentil Pruebas negativas para el antígeno 2 del insulinoma y los autoanticuerpos de la decarboxilasa del ácido glutámico
EASE-2 NCT02414958 [249]	Pacientes adultos Tasa de filtración glomerular ≥ 30mL/min/1.73 m^2 IMC ≥ 18.5 kg/m^2 Valor de péptido C en ayunas < 0.7 ng/mL (<0.23 nmol/L) Diagnóstico de DMT1 desde hace más de 1 año 0.3-1.5 U/kg insulina en múltiples inyecciones diarias o infusión subcutánea continua HbA1c 7.5-10.0% después del periodo de intensificación de la insulina
EASE-3 NCT02580591 [249]	
EMPA-REG OUTCOME NCT01131676 [230,251]	Pacientes > 18 años Plan de dieta y ejercicio físico HbA1c ≥ 7.0% y ≤ 9.0% sin tratamiento con antidiabéticos en las 12 semanas previas a la fase de aleatorización HbA1c ≥ 7.0% y ≤ 10.0% con tratamiento antidiabético de base que debe permanecer invariable al menos durante las 12 semanas previas a la aleatorización. En el caso de la insulina esta debe permanecer sin cambios superiores al 10 % respecto a la dosis de la aleatorización Elevado riesgo de sufrir eventos CV IMC ≤ 45 kg/m^2

A raíz de los beneficios observados en el grupo de pacientes con IC del ensayo clínico EMPA-REG OUTCOME, decidió evaluarse en profundidad los efectos del

tratamiento con EMPA en pacientes con IC, independientemente de la presencia de DMT2 [252].

EMPEROR Reduced (NCT03057977; abril 2017 - noviembre 2019) [253,254]: ensayo clínico fase III, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, de grupos paralelos y controlado con placebo, cuyo objetivo fue evaluar los efectos del tratamiento con EMPA en la morbilidad y mortalidad de 3730 pacientes adultos con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (ICFEr), con o sin DMT2 [253,254]. A las 16 semanas, se observó que el tratamiento con EMPA redujo significativamente la muerte por causas CV u hospitalización por IC en comparación con el placebo [253,254]. Además, la EMPA fue capaz de reducir de manera significativa los objetivos secundarios confirmatorios (las hospitalizaciones totales por IC y la pendiente de cambio de la TFGe), y el objetivo renal compuesto exploratorio (diálisis crónica, transplante renal o reducción profunda y mantenida de la TFGe), en comparación al grupo que recibió el placebo [253,254].

EMPEROR Preserved (NCT03057951; marzo 2017 – abril 2020) [255–257]: ensayo clínico fase III, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, de grupos paralelos y controlado con placebo, diseñado para estudiar los efectos del tratamiento con EMPA en la morbilidad y mortalidad de 5988 pacientes adultos con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada (ICFEp), con o sin DMT2 [255,256]. Al igual que en los pacientes con ICFEr, el tratamiento con EMPA de pacientes con ICFEp redujo significativamente el número de eventos primarios combinados (muerte por causas CV u hospitalización por IC) en comparación con el grupo con placebo [255,256]. También se observó una disminución significativa del número total de hospitalizaciones por IC y del empeoramiento de la TFGe en el grupo de EMPA en comparación con el grupo placebo [255,256].

EMPIRE-HF (NCT03198585; junio 2017 – enero 2020) [258,259]: ensayo clínico fase II, aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos y controlado con placebo, cuyo objetivo fue evaluar los efectos del tratamiento con EMPA en los niveles de la fracción aminoterminal del pro-pétido natriurético tipo B (NT-proBNP, *N-terminal pro b-type natriuretic peptide*) de 190 pacientes con ICFEr [258,259]. El tratamiento con EMPA no tuvo efectos en los niveles de NT-proBNP, en el nivel de actividad diaria, ni en la puntuación del Kansas City (KCCQ, *Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire*) en comparación al grupo placebo [258,259]. A partir de este ensayo clínico se realizaron los siguientes subestudios:

- EMPIRE-HF METABOLIC [260]: este subestudio permitió evaluar los efectos del tratamiento con EMPA en la RI en 120 pacientes con ICFEr [260]. Los resultados demostraron que el tratamiento con EMPA mejoró la sensibilidad hepática y periférica a la insulina [260].

- EMPIRE-HF RENAL [261]: el objetivo de este subestudio fue investigar el efecto de la EMPA en la eritropoyesis y el metabolismo del hierro en 190 pacientes con ICFEr [261]. El tratamiento con EMPA incrementó la eritropoyetina y redujo la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hepcidina en comparación con el placebo. Sin embargo, no se observaron diferencias en la eritroferrona entre los 2 grupos [261].

EMPA-RESPONSE-AHF (NCT03200860; diciembre 2017, septiembre 2019) [262]: estudio piloto fase II, aleatorizado, multicétrico, doble ciego, de grupos paralelos y controlado con placebo, diseñado para evaluar los efectos del tratamiento con EMPA en pacientes ingresados con IC aguda, con o sin DMT2 [262]. Los resultados obtenidos demostraron que la EMPA no fue capaz de modificar la puntuación de disnea en la escala visual analógica, los niveles de NT-proBNP, la respuesta diurética o la duración del ingreso hospitalario (resultados primarios) [262]. Sin embargo, el tratamiento con EMPA redujo la incidencia del empeoramiento intrahospitalario de la IC, muerte y/o reingreso hospitalario por IC en comparación al placebo [262].

EMPULSE (NCT0415775; mayo 2020, junio 2021) [263]: ensayo clínico fase III, aleatorizado, multicéntrico y doble ciego, cuyo objetivo fue evaluar los posibles efectos descongestivos de la EMPA en pacientes con IC aguda [263]. El tratamiento con EMPA redujo significativamente el peso corporal y los niveles de NT-proBNP de los pacientes tras 15 días de tratamiento en comparación con el grupo placebo [263]. Además, el tratamiento de pacientes hospitalizados por IC aguda produjo una descongestión precoz, efectiva y que se mantuvo a lo largo del tiempo, lo que se asoció con un beneficio clínico en el día 90 [263].

Los resultados obtenidos en estos ensayos clínicos demostraron los beneficiosos efectos del tratamiento con EMPA en la reducción de eventos CV adversos en pacientes con IC, por lo que su uso ha sido aprobado por la FDA pare el tratamiento de pacientes adultos con ICFEr e ICFEp [264–266].

1.2.2.5.3. Empagliflozina en el sistema cardiovascular

Además de los ensayos clínicos en los que se evaluó el efecto del tratamiento con EMPA en pacientes con DMT2 y otras ECVs, como por ejemplo la IC, también se realizaron numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* para intentar dilucidar los posibles mecanismos implicados en la protección CV inducida por la EMPA [267,268].

1.2.2.5.3.1. Empagliflozina y fibrosis

El tratamiento de modelos animales de ECVs con EMPA ha demostrado su capacidad para reducir la fibrosis, no solo cardíaca, sino también en otros órganos, como por ejemplo el hígado, los riñones y el TA [269–273]. En un modelo murino de DMT2 se observó que estos efectos antifibróticos de la EMPA se asociaban a una inhibición de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β, *transforming growth factor beta*)/Smad, produciendo una reducción de la expresión génica del colágeno I, colágeno III, y de la actina alfa del músculo liso (αSMA, *α-Smooth Muscle Actin*) [272]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de los marcadores de colágeno en el suero de pacientes incluidos en los ensayos EMPEROR, observándose que, tras 52 semanas de tratamiento con EMPA, se produjo una reducción significativa de los niveles séricos del propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PINP, *procollagen type 1 amino-terminal propeptide*) y del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fragmento N-terminal de colágeno tipo III (PRO-C3, *N-terminal type III collagen propeptide*) en pacientes con IC [274].

1.2.2.5.3.2. Empagliflozina e hipertrofia

Otro efecto beneficioso del tratamiento con EMPA, tanto *in vivo* como *in vitro*, es su capacidad para reducir la hipertrofia cardiomiocitaria mediante la regulación de diferentes vías de señalización celular, como por ejemplo la vía TGF-β/Smad en un modelo murino de DMT2 (272); la vía de la quinasa ribosomal s6 (RSK, *ribosomal S6 kinase*)/ intercambiador de sodio-hidrógeno 1 (NHE-1, *sodium-hydrogen antiporter 1*) en la línea celular de mioblastos cardíacos de rata H9c2 y en ratones macho C57BL/6J; y la vía de la guanilato ciclasa soluble (GCs)-guanosín monofosfato cíclico (GMPc, *cyclic guanosine monophosphate*)-proteína quinasa guanosín dependiente de monofosfato cíclico (PKG, *cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase*) (GCs-GMPc-PKG) en un modelo murino de DMT2 [275–278]. El tratamiento con EMPA redujo la fosforilación del RSK, provocando una disminución de la actividad de NHE-1, una proteína fundamental en el desarrollo de la hipertrofia [276,277].

1.2.2.5.3.3. Empagliflozina y cardiotoxicidad producida por agentes quimioterapéuticos

En la actualidad existe un elevado número de agentes quimioterapéuticos que, a pesar de conseguir aumentar la tasa de supervivencia del cáncer, a largo plazo provocan una serie de daños a nivel cardíaco que incrementan la morbilidad y mortalidad de los pacientes, por lo que, en los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de terapias que permitan prevenir o contrarrestar estos efectos cardiotóxicos [279,280]. Diversos estudios han demostrado que la administración simultánea de EMPA con el agente quimioterapéutico doxorubicina (DOXO) es capaz de reducir sus efectos cardiotóxicos, y se han propuestos diversos mecanismos de acción, entre los cuales se encuentran la reducción de la fibrosis miocárdica, la disminución del estrés del retículo endoplasmático (RE) o la activación de la ruta proteína kinasa activada por adenosín monofostato (AMPK, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*)/sirtuina 1 (sirt1, *sirtuin 1*)/ coactivador 1α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC-1α, *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator*) (AMPK/ sirt1/ PGC-1α) [281–284]. Muy recientemente, Chang y col. (2024) [281] han propuesto que los efectos protectores de la EMPA en modelos *in vivo* e *in vitro* de cardiotoxicidad, podrían deberse a la inhibición de la fosforilación del eje quinasa c-Jun N-terminal (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*)/transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*) (JNK/STAT3) y de las vías de señalización posteriores, dando como resultado una reducción de la apoptosis inducida por el agente quimioterapéutico DOXO. Asimismo, Liu y col. (2024) [285] acaban de demostrar que el cotratamiento de la línea celular cardiomiocitaria H9c2, así como de ratones macho adultos C57BL/6, con el agente quimioterapéutico sorafenib y con EMPA, disminuye significativamente la citotoxicidad, la fibrosis y los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-6 inducidas por el tratamiento quimioterápico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2.5.3.4. Empagliflozina, apoptosis y estrés oxidativo

Los beneficios del tratamiento con EMPA frente a la apoptosis también se han observado en contextos diferentes al de la cardiotoxicidad [286–288]. Wang y col. (2022) [289] demostraron que, tanto en un modelo animal como en un modelo *in vitro* de lesión por isquemia/reperfusión, el tratamiento con EMPA inhibía la vía de señalización de la *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK)/ factor de transcripción activador 4 (ATF4, *activating transcription factor 4*)/beclina 1 (Beclin1) (PERK/ATF4/Beclin1), reduciendo los niveles de autofagia, el estrés del RE y la apoptosis de los cardiomiocitos. Por otra parte, la estimulación de la vía de señalización GCs-GMPc-PKG por la EMPA en un modelo animal de DMT2, también resultó en una disminución de la apoptosis cardiomiocitaria, probablemente mediada por una reducción del daño oxidativo [275]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Li y col. (2019) [272], que demuestran que la capacidad de la EMPA para modular la vía de señalización del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)/elemento de respuesta antioxidante (ARE, *antioxidant responsive element*), concretamente estimulando la translocación de Nrf2 al núcleo celular, produce una restricción del estrés oxidativo. Adicionalmente, también se ha descrito que el tratamiento con EMPA es capaz de reducir la apoptosis de otros tipos celulares como los hepatocitos, incrementando el ratio Bcl2/Bax e inhibiendo la escisión de la caspasa-8 [290].

1.2.2.5.3.5. Empagliflozina e inflamación

Los procesos inflamatorios juegan un papel fundamental en el desarrollo de las ECVs, por lo que actualmente se está estudiando el posible efecto antiinflamatorio de diferentes terapias farmacológicas utilizadas para el tratamiento de las alteraciones metabólicas que acompañan a la fisiopatología de las principales ECVs [291]. La EMPA ha demostrado tener efectos antiinflamatorios en diferentes órganos: así, en ratones C57BL/6J con obesidad inducida por la dieta, el tratamiento con EMPA disminuyó la inflamación asociada a la obesidad al reducir la infiltración de macrófagos en el TAB y el hígado, y promover su polarización al fenotipo antiinflamatorio M2 [292]. El tratamiento con EMPA de un modelo animal no diabético de IC y NAFLD, redujo los niveles circulantes de los marcadores proinflamatorio MCP-1 y ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE, *20-hydroxyeicosatetraenoic acid*), y aumentó los niveles del marcador antiinflamatorio ácido 14,15-epoxieicosatrienoico (14,15-EET, *14,15-Epoxyeicosatrienoic acid*), reduciendo la infiltración de macrófagos en el TA e hígado [293]. La reducción de los procesos inflamatorios tras el tratamiento con EMPA también se ha observado a nivel cardíaco; en un modelo animal de miocarditis autoinmune, el tratamiento con EMPA redujo la inflamación del tejido cardíaco al estimular la polarización de los macrófagos M1 en M2 [294]. Además, Koyani y col. (2020) [295] han demostrado que el tratamiento con EMPA de un cultivo de la línea celular cardiomiocitaria HL-1 y de un modelo animal en los que se ha inducido un estado inflamatorio mediante la administración del lipopolisacárido (LPS), estimulaba la fosforilación de AMPK, activando una vía de señalización que, en última instancia, promueve la polarización de los macrófagos M1 a macrófagos M2 antiinflamatorios. La AMPK no solo participa en la regulación de los procesos inflamatorios, sino que se trata

del regulador central del metabolismo energético celular, y se ha comprobado que la activación de su fosforilación por acción de la EMPA es capaz de restaurar los niveles de ATP/adenosín difosfato (ADP), cruciales para mantener la viabilidad celular [295].

1.2.2.5.3.6. Empagliflozina y metabolismo energético

En los últimos años se ha demostrado que la EMPA presenta una gran variedad de efectos beneficiosos en el metabolismo energético; por ejemplo, se ha visto que el tratamiento de ratones diabéticos db/db con EMPA estimula la producción y el consumo de cetonas, contribuyendo al aumento de la producción de ATP y a la mejora de las alteraciones producidas en la estructura de la CTE mitocondrial provocadas por la DM [296–298]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kappel y col. (2017) [299], que describen un incremento del uso de cuerpos cetónicos y aminoácidos (AA) de cadena ramificada en pacientes con DMT2 e IC tratados con EMPA, sugiriendo un posible aumento del metabolismo energético; y son asimismo compatibles con los descritos por Santos-Gallego y col. (2019) [300], que proponen que las mejoras observadas en la función y el metabolismo energético cardíaco de un modelo porcino de IC sin DMT2 tratado con EMPA, se deben a la estimulación del uso de cetonas, FA libres y AA de cadena ramificada como sustratos energéticos cardíacos en lugar de la glucosa.

El tratamiento con EMPA ha demostrado su capacidad para reducir los depósitos de TAE en pacientes, al actuar sobre los preadipocitos y disminuir el proceso de adipogénesis; y los depósitos de TA producidos por una ingesta calórica excesiva en ratones [301,302]. También se ha observado un menor acúmulo de grasa en el hígado de pacientes y/o modelos animales de enfermedad hepática, obesidad y/o DMT2 tras el tratamiento con EMPA [302–305]. Xu y col. (2021) [306] han relacionado la pérdida de peso característica del tratamiento con EMPA, con una inducción del "*browning*" de los adipocitos del TAB debida a la estimulación de la fosforilación de AMPK, así como a un incremento de los niveles del PGC-1α.

Nuestro grupo de investigación ha evaluado previamente los efectos del tratamiento con EMPA sobre el metabolismo cardíaco y hepático de un modelo animal de obesidad y DMT2 [307,308]. El tratamiento con EMPA disminuía significativamente los niveles de varias citoquinas proinflamatorias en ambos tejidos, y era capaz de modificar el metaboloma cardíaco y el lipidoma hepático de los animales hacia un perfil protector [307,308]. Además, en el tejido cardíaco, se observaba un incremento de los niveles de autofagia y de la actividad de la AMPK, así como un descenso de la expresión cardíaca del clúster de diferenciación 36 o translocasa de FA (Cd36, *cluster of differentiation 36 or fatty acid translocase*), cuya expresión incrementada se relaciona con el acúmulo de lípidos en el miocardio y con enfermedades cardiometabólicas [307,308].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3. INSUFICIENCIA CARDÍACA

La IC se define como un síndrome clínico que se caracteriza por la presencia de síntomas y signos (disnea, edema, fatiga, etc.) debidos a modificaciones en la estructura, función y metabolismo miocárdico, lo que conduce a un bombeo de sangre insuficiente por parte del corazón para suplir el O_2 y los nutrientes necesarios al resto de órganos y tejidos del organismo [309–311]. Actualmente, la mayoría de las muertes en pacientes con IC se deben a causas CVs, aunque, las muertes por otras causas como, por ejemplo, enfermedades respiratorias, han aumentado en los últimos años [312].

Se considera que la IC es el desenlace de diversas patologías cardíacas, principalmente la cardiopatía isquémica, la cardiopatía hipertensiva, la cardiopatía reumática y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, algunas patologías sistémicas y ciertos factores hereditarios [313,314]. Además, los factores de riesgo más frecuentes para el desarrollo de la IC son la HTA, la DMT2, la obesidad, la cardiopatía coronaria, la dislipemia, el SMet, el envejecimiento, el tabaquismo, el sedentarismo y la inactividad física, el consumo de alcohol y otras drogas, y algunos agentes quimioterapéuticos [309,313,315,316].

1.3.1. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca

Actualmente, la IC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global, por lo que ha sido declarada una pandemia mundial que afecta a más de 64 millones de personas [317,318]. El envejecimiento de la población, junto con la existencia de terapias eficaces con capacidad de reducir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes con IC, han favorecido que la incidencia y prevalencia de la IC continue en aumento a nivel mundial [317,319,320]. A pesar de los numerosos avances terapéuticos producidos en los últimos años, la mortalidad debido a la IC sigue siendo alta, y aproximadamente el 50% de las pacientes con IC fallecen en los 5 años posteriores al diagnóstico [317,319,320].

Ante la falta de datos actualizados que describiesen la epidemiología de la IC en Europa, en el año 2021 la Asociación de Insuficiencia Cardíaca (HFA, *Heart Failure Association*) publicó un Atlas actualizado en el que se recogieron los datos sobre la incidencia (Fig. 1.7.A), la prevalencia (Fig. 1.7.B), las hospitalizaciones y los recursos disponibles para el tratamiento de la IC durante los años 2018 y 2019 [321]. Tras analizar los datos epidemiológicos obtenidos en estudios europeos y estadounidenses, se estimó que la prevalencia global de la IC oscila entre el 1 y el 3%, mientras que los datos sobre la incidencia son muy variables debido a la diversidad de métodos utilizados para su diagnóstico [322,323]. Aunque la mayor parte de los datos provienen de estudios realizados en países desarrollados o de renta alta, los países más afectados por la carga de la IC suelen ser los de renta media o baja, ya que niveles socioeconómicos más bajos incrementan el riesgo de desarrollar esta patología [317,324].

En España, debido a la desactualización y a la gran variabilidad de los datos epidemiológicos disponibles, entre los años 2017-2019 se realizó el estudio PATHWAYS-HF que permitió obtener una descripción actualizada del estado y recorrido terapéutico de los pacientes españoles con IC [325]. Durante los 3 años que

USC DE COMPOSTELA

duró el estudio, los datos epidemiológicos evaluados se mantuvieron estables y se observó que la prevalencia de IC en la población española es próxima al 2% [325].

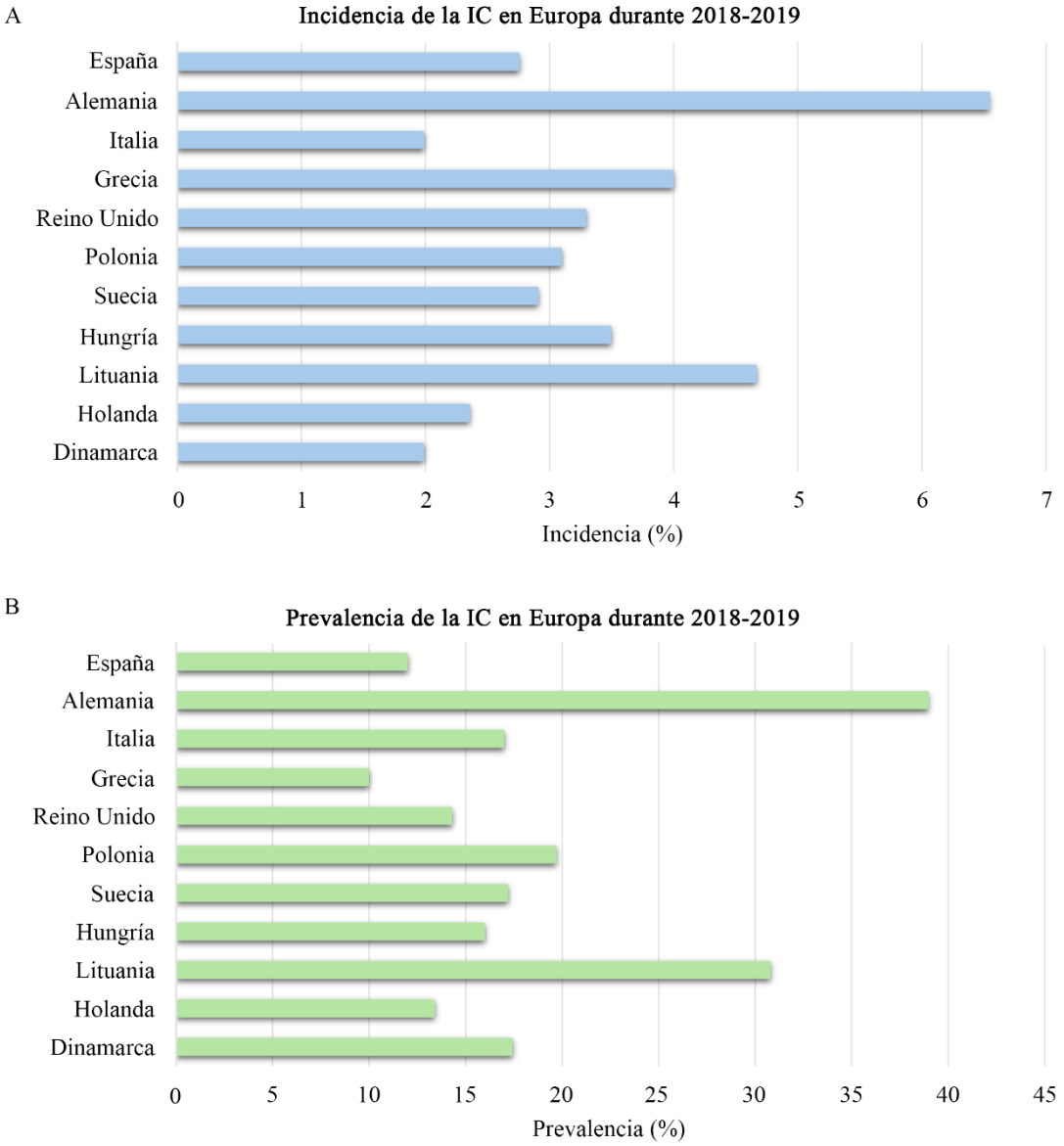


Figura. 1.7.: Representación gráfica de los datos epidemiológicos de insuficiencia cardíaca en Europa entre los años 2018-2019. Valores de la incidencia de la IC por cada 1000 personas/años (A) y prevalencia de la IC por cada 1000 personas (B) recogidos en el Atlas de la Asociación de Insuficiencia Cardíaca [321]. Gráficos de autoría propia.

1.3.2. Síntomas y diagnóstico de la insuficiencia cardíaca

Existen varios criterios, como el de la ESC, el de Framingham, el de Boston y el de Gothenburg, que permiten realizar el diagnóstico de IC [322,326–329]. Estos 4 criterios estipulan la necesidad de la presencia de síntomas que pueden ir acompañados de signos (Tabla 1.4.) para poder llevar a cabo el diagnóstico de IC [309,311,330]. Además, la actualización de las directrices de la ESC, destacan la importancia de medir los niveles del péptido natriurético (PN) tipo B o "PN cerebral" (BNP, *brain natriuretic*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

peptide), o del NT-proBNP, ambos indicadores de la presencia y severidad de IC (Tabla 1.5.) [309,331].

Tabla 1.4.: Síntomas y signos característicos de la IC [330,332,333].

Síntomas y signos de IC	Causas
Disnea	Acumulación de la sangre en las venas pulmonares debido al suministro sanguíneo deficiente
Ortopnea	
Edema	El bombeo sanguíneo insuficiente impide que el corazón se vacíe por completo y, por lo tanto, que la sangre regrese al corazón quedando en las venas, lo que provoca que los fluidos de los vasos sanguíneos pasen hacia los tejidos (normalmente pulmones y extremidades) y queden retenidos
Tos y sibilancias	Acumulación de líquido en los pulmones
Aumento de la frecuencia cardíaca	Mecanismo compensatorio frente al bombeo insuficiente
Fatiga y cansancio	Bombeo sanguíneo insuficiente para suplir las necesidades del organismo
Confusión	Reducción del flujo sanguíneo cerebral
Falta de apetito, náuseas y modificaciones en el peso corporal	Problemas en la digestión y absorción de nutrientes en el sistema digestivo debido a un aporte sanguíneo insuficiente
Aumento de la presión de la vena yugular	Dinámica cardíaca derecha anormal debido al aumento de la presión capilar pulmonar

Tabla 1.5.: Niveles plasmáticos de BNP o NT-proBNP para el diagnóstico de la IC [334].

	Presencia de síntomas leves	Pacientes con disnea aguda
IC improbable	BNP < 35 ng/L o NT-proBNP < 125 ng/L	BNP < 100ng/L o NT-proBNP < 300ng/L
Indeterminada	BNP 35-150 ng/L o NT-proBNP 125-600 ng/L	BNP 100-400ng/L o <50 años: NT-proBNP 300-450 ng/L 50-75 años: NT-proBNP 300-900 ng/L >75 años: NT-proBNP 300-1800 ng/L
IC probable	BNP > 150ng/L o NT-proBNP > 600ng/L	BNP > 400ng/L o <50 años: NT-proBNP > 450 ng/L 50-75 años: NT-proBNP > 900 ng/L >75 años: NT-proBNP > 1800 ng/L

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La evaluación de los síntomas de los pacientes con IC suele realizarse mediante el KCCQ y el Cuestionario de Vivir con Insuficiencia Cardiaca de Minnesota (MLHFQ, *Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*) [335].

Es importante mencionar que la presencia de obesidad dificulta el diagnóstico de la IC, debido a la presencia de valores de NT-proBNP y BNP dentro del rango establecido como normal, a una mayor dificultad al evaluar la presión de la vena yugular a causa del aumento de los depósitos de TA en el cuello, y a que síntomas como la disnea suelen atribuirse a la obesidad si no se realizan pruebas de esfuerzo hemodinámico invasivas adicionales [336,337].

Pese a que la IC es un síndrome muy complejo, desde 1980 la fracción de eyección (FE) del VI (FEVI) es una característica fenotípica crucial a la hora de realizar un diagnóstico, seleccionar la terapia que más se adecua al paciente con IC, y es el principal criterio de inclusión o exclusión en los ensayos clínicos aleatorizados [338,339]. La FE mide el volumen de sangre bombeado durante la sístole [340], y se define según la siguiente ecuación (1):

$$FEVI\ (\%) = (LVEDV\text{-}LVESV)/LVEDV \times 100 \quad (1)$$

Siendo LVEDV el volumen diastólico final (*left ventricular end-diastolic volume*) y, LVESV el volumen sistólico final (*left ventricular end-systolic volume*) del VI [341].

Aunque lo más habitual en la IC es la disfunción del VI, también se puede producir una disfunción del ventrículo derecho debido a una sobrecarga de presión generada por la hipertensión pulmonar o a la misma disfunción del VI, aunque esta situación todavía no ha sido ampliamente estudiada y sus mecanismos en la IC son poco conocidos [342–344].

1.3.3. Clasificación de la insuficiencia cardíaca

1.3.3.1. Clasificación según la fracción de eyección del ventrículo izquierdo

La clasificación actual más común de los pacientes con IC es según la FEVI [309,317]. Durante la década de los 90, el uso de técnicas de imagen no invasivas como la ecocardiografía, permitió identificar a un elevado número de pacientes con síntomas y signos de IC pero que presentaban una FEVI dentro de unos valores normales [338,345,346]. Diversos autores llegaron a la conclusión de que estos pacientes se caracterizaban por presentar alteraciones de la función diastólica [347,348], lo que provocó que la IC se clasificase como sistólica (reducción de los valores de la FEVI) o IC diastólica (la FEVI se mantiene dentro de los valores normales) [345]. Dado que en la mayor parte de los casos coexisten la disfunción sistólica y diastólica, las últimas guías publicadas para el manejo de la IC distinguen entre ICFEr (FE $\leq$ 40%), ligeramente reducida (ICFElr) y ICFEp (FE $\geq$ 50%) [309,313,317,349–351].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.3.2. Clasificación según las guías del colegio americano de cardiología y la asociación estadounidense del corazón

Las guías del Colegio Americano de Cardiología (ACC, *American College of Cardiology*) y de la AHA publicadas en el año 2001 propusieron la clasificación de la IC en función del estadio de la enfermedad (Tabla 1.6.), es decir, en función de su evolución y progresión [309,317].

Tabla 1.6.: Estadios de la IC por la ACC/AHA

Estadios	Definición
A	Riesgo elevado de desarrollar IC: Pacientes hipertensos, diabéticos, con SMet y obesidad, etc. Ausencia de deterioro en la estructura del miocardio, de biomarcadores de daño cardíaco y de signos o síntomas.
B	Persiste la ausencia de signos o síntomas de IC pero el paciente presenta al menos una de las siguientes evidencias: • Cardiopatía estructural: disfunción sistólica, hipertrofia del ventrículo, anomalías del movimiento de la pared del miocardio, valvulopatías. • Aumento de las presiones de llenado • Pacientes con factores de riesgo y niveles elevados de BNP o troponina cardíaca.
C	Cardiopatía estructural y síntomas de IC
D	Síntomas evidentes de IC que afectan a la vida cotidiana disminuyendo la calidad de vida, hospitalizaciones recurrentes por IC y necesidad de intervenciones especializadas (implantación de dispositivos o trasplantes cardíacos) a pesar de los esfuerzos por mejorar la terapia farmacológica

Se trata de una clasificación demasiado amplia, por lo que hay matices de pronóstico que no se tienen en cuenta y, además, existe cierta discrepancia acerca de si las personas que sólo presentan factores de riesgo deberían aparecer en esta clasificación, ya que se trata de factores de riesgo que no son exclusivos para el desarrollo de IC [351]. Por estos motivos, aunque se trata de una clasificación reconocida por los profesionales sanitarios, no se tiene en cuenta en los criterios de inclusión y/o en la aleatorización de los ensayos clínicos, ni a la hora de decidir una terapia farmacológica adecuada para el paciente [309,311].

1.3.3.3. Clasificación de la asociación neoyorquina del corazón

La Asociación Neoyorquina del Corazón (NYHA, *New York Heart Association*) propuso una clasificación de la severidad de la IC en función de la capacidad funcional y la tolerancia al ejercicio (TE) en pacientes con IC sintomática o avanzada (estadios C y D) (Tabla 1.7.) [309,313].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.7.: Clasificación de la IC por la NYHA.

Clase	Definición
I	No existe limitación al realizar ejercicio físico.
II	Existe una pequeña limitación (síntomas leves) al realizar ejercicio físico normal.
III	No existen problemas en reposo, pero surgen limitaciones al realizar actividades físicas más leves de lo habitual debido a la aparición de síntomas moderados.
IV	Presencia de síntomas de IC, como la disnea severa, en reposo que se acentúan al realizar cualquier actividad física

Esta clasificación se utiliza actualmente en la práctica clínica para evaluar la candidatura de los pacientes a diferentes tratamientos y/o implantación de dispositivos, y en los criterios de inclusión y/o en la aleatorización de los ensayos clínicos [345]. Sin embargo, se trata de una clasificación altamente subjetiva, poca reproducibilidad y que carece de fuerza para predecir resultados desfavorables en la IC [309,353].

1.3.4. Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada

En la actualidad, la ICFEp se considera un síndrome conformado por múltiples patologías que presenta efectos sistémicos [336,354]. La ICFEp afecta aproximadamente al 50% de la población que presenta IC, y está estrechamente relacionada con la obesidad (IMC $\geq$ 30 kg/m^2), la DMT2, la HTA y el SMet [335,337,354,355]. Su prevalencia, morbilidad y mortalidad continúan en aumento, debido a que su heterogeneidad y su variedad fenotípica hacen que su diagnóstico sea muy complicado, y a que las opciones terapéuticas existentes son limitadas, y solamente se centran en reducir los síntomas y signos y en mejorar la calidad de vida del paciente [309,354,355].

La disfunción diastólica (DD) del VI es una de las principales alteraciones que conducen al desarrollo de este síndrome y, por lo tanto, su evaluación mediante ecocardiografía es fundamental [356–358]. Se caracteriza por una pérdida de la capacidad de relajación y/o una mayor rigidez de la cámara cardíaca, provocando un incremento de las presiones de llenado incluso en condiciones de reposo y, por lo tanto, produciendo una pérdida de la capacidad para realizar cualquiera actividad física [356,358].

La fisiopatología de la ICFEp es muy compleja e implica múltiples órganos y sistemas, así como diferentes procesos metabólicos e inflamatorios [336,354,355].

1.3.4.1. Alteraciones neurohormonales

Los sistemas neurohormonales, como el sistema nervioso simpático (SNS), el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y el sistema de PN, se activan en las primeras fases de la IC para intentar compensar el daño cardíaco producido y mantener la homeostasis cardíaca [359,360]. Sin embargo, la activación prolongada de estos sistemas juega un papel fundamental en el mantenimiento y progresión de la IC,

favoreciendo el remodelado ventricular, la disfunción contráctil y el incremento del gasto cardíaco [359,361,362]. Además, esta activación también afecta a otros órganos como los riñones, favoreciendo la retención de Na^+ y agua y, por lo tanto, la aparición de edemas [363].

1.3.4.1.1. Sistema nervioso simpático

El SNS, también conocido como sistema nervioso adrenérgico, participa en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos dentro del sistema CV como la contracción del miocardio, la regulación de la FC, la reducción de la capacitancia venosa y la constricción de las arterias [361,364]. Su activación estimula la liberación de las catecolaminas norepinefrina (o noradrenalina) y epinefrina (o adrenalina), las cuales ejercen sus efectos en diferentes tejidos mediante la unión específica a los receptores adrenérgicos (AR, *adrenergic receptors*) [361,364–366].

Los AR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, y pueden distinguirse 3 tipos: α1AR, α2AR y βAR [361,364]. En el corazón se expresan los 3 subtipos existentes del βAR (β1AR, β2AR y β3AR), siendo el β1AR el subtipo expresado predominantemente (aproximadamente el 80%), seguido del β2AR (aproximadamente el 18 %) [360,361,364]. La activación de estos receptores por acción de la norepinefrina o epinefrina estimula la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), un mensajero con efecto inotrópico positivo, es decir, que incrementa la contractilidad y la FC [361,364,366]. En el miocardio también se expresa el subtipo β3AR (3%), cuya activación ejerce efectos contrarios a los de los β1AR y β2AR, aunque en condiciones normales permanece inactivo [364].

Sin embargo, en condiciones patológicas, como por ejemplo durante la IC, la activación continua del SNS produce un incremento de los niveles plasmáticos de norepinefrina y epinefrina, lo que se traduce en una estimulación excesiva de los βAR que conduce a su desensibilización y a endocitosis cardiomiocitaria [360,361,367]. Además, la expresión cardiomiocitaria del β1AR está reducida en la fisiopatología de la IC, mientras que la expresión de β2AR no se ve alterada [360,361,367].

La activación continua del SNS también resulta perjudicial a nivel renal, ya que la activación de los βAR expresados en el riñón, estimula la activación del SRAA [359,360].

1.3.4.1.2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El SRAA juega un papel fundamental en la regulación de la función CV y renal, de la PA, del volumen de líquido extracelular y del equilibrio de sodio, debido a su participación en diferentes rutas de señalización celular implicadas en la contracción, la fibrosis, la hipertrofia, la inflamación, la disfunción del endotelio y la viabilidad celular, por lo que su homeostasis es crucial para el correcto funcionamiento del organismo [368–371]. Aunque en la fase inicial de las ECVs la activación del SRAA suele tener un efecto compensatorio, si se prolonga en el tiempo puede llegar a ser perjudicial, ya que contribuiría al desarrollo de patologías como HTA, IM, aterosclerosis, enfermedad renal crónica (ERC) e IC [368,372].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los cambios que se producen en la PA y en el líquido extracelular debido a la activación del SRAA estimulan la producción y secreción, por parte de las células yuxtaglomerulares renales, de la enzima renina (o angiotensinogenasa), que escinde el angiotensinógeno circulante, generando la angiotensina I (Ang I) (Fig. 1.8.) [373–375]. El angiotensinógeno, el único sustrato conocido de la renina, es una proteína de 452 AA producida principalmente en el hígado, con capacidad para regular la PA e implicada en la fisiopatología de la aterosclerosis [375,376].

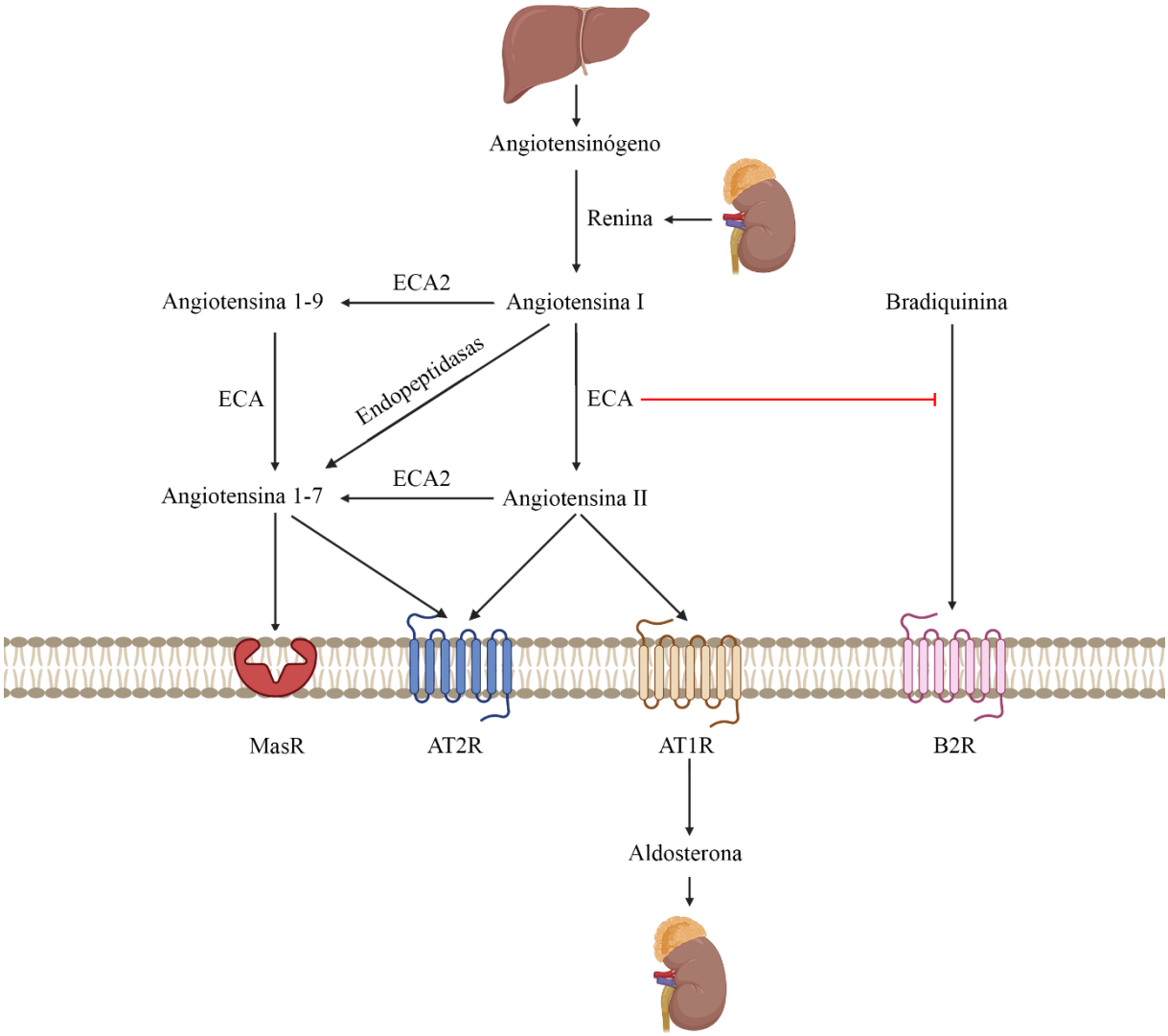


Figura 1.8.: Representación esquemática del SRAA. AT1R; receptor tipo 1 de angiotensina II, AT2R: receptor tipo 2 de angiotensina II; B2R: receptor de bradiquinina tipo 2, ECA: enzima convertidora de angiotensina, ECA2: enzima convertidora de angiotensina 2, MasR: Receptor Mas. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

La Ang I es convertida en el octapéptido activo angiotensina II (Ang II) tras la hidrólisis de su extremo C-terminal por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una metalopeptidasa de zinc muy abundante en las células

endoteliales (Fig. 1.8.) [372,375,377,378]. Es importante destacar que, a diferencia de la renina, la ECA tiene diferentes sustratos como la bradiquinina, la sustancia P y el péptido hemorregulador N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, siendo la bradiquinina el sustrato por el que presenta una mayor afinidad (Fig. 1.8.) [378]. La bradiquinina es un péptido que ejerce sus efectos mediante su unión al receptor de bradiquinina tipo 2 (B2R, *type 2 bradykinin*) endoteliales, promoviendo la vasodilatación y la natriuresis, y reduciendo el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis (Fig.1.8.) [375,379,380].

La Ang II es una hormona pleiotrópica fuertemente implicada en el desarrollo de ECVs como la HTA, la aterosclerosis, la dislipemia, la obesidad y la IC, y que ejerce sus efectos a través de los receptores de Ang II tipo 1 (AT1R, *angiotensin II type 1 receptor*) y tipo 2 (AT2R, *angiotensin II type 2 receptor*), pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Fig. 1.8.) [373,381–383]. El AT1R se expresa en el corazón, los riñones, las glándulas suprarrenales, el endotelio, las células del sistema CV, el cerebro, el hígado y los pulmones; y mientras que en humanos es codificado por un único gen, en ratones y ratas existen 2 subtipos genéticos diferentes: el AT1R tipo a y el AT1R tipo b [375,384]. Los efectos de la activación del AT1R por la Ang II aparecen recogidos en la Tabla 1.8., siendo los más relevantes la estimulación del SNS, la síntesis y secreción de aldosterona por la corteza de la glándula suprarrenal, y la liberación de vasopresina, prostaglandinas y catecolaminas; lo cual se traduce en un incremento de la vasoconstricción, de la proliferación celular y de la inflamación sistémica [369,385–387]. Además, se ha demostrado que la activación del AT1R estimula la producción de EROs, e incrementa la hipertrofia, hiperplasia y la fibrosis cardiaca [369,386].

La hormona aldosterona ejerce sus efectos fisiológicos al unirse al receptor de mineralocorticoides (RM) expresado en las células epiteliales del riñón (Fig. 1.8.), estimulando así la reabsorción de Na^+, la retención de agua y la pérdida de K^+, procesos fundamentales en la regulación de la homeostasis de la PA [387–389]. La actividad de la aldosterona también se relaciona con el desarrollo de la RI, la HTA resistente al tratamiento, y el SMet [390].

El AT2R se expresa en el endotelio, cardiomiocitos, células del sistema inmune y ciertas regiones renales y, aunque todavía existen incógnitas acerca de sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas, su activación por la unión de la Ang II promueve la vasorrelajación y la natriuresis, y presenta efectos antifibróticos, antiinflamatorios y antiproliferativos (Fig. 1.8., Tabla 1.8.), los cuales contrarrestan la activación del AT1R [378,391–395].

Se ha descrito que, debido a activación continua del RAAS, y a una sobreexpresión de la ECA, los pacientes con IC presentan un incremento de los niveles circulantes de renina, Ang II y aldosterona, junto con una disminución de los niveles de bradiquinina [372,396].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.8.: Efectos de la activación de los AT1R y AT2R por acción de la Ang II.

Activación del AT1R	Activación de AT2R
Retención de sodio	Vasodilatación
Vasoconstricción	Inhibición de la proliferación celular
Producción y secreción de aldosterona	Diferenciación celular
Liberación de vasopresina	Reparación de tejidos
Supresión de renina	Apoptosis
Hipertrofia en cardiomiocitos y en células de músculo liso	Natriuresis
Estimulación de la fibrosis en miocardio y vasos sanguíneos	-
Efectos inotrópicos positivos	-
Efectos cronotrópicos	-
Activación del sistema nervioso simpático	-
Incremento de la secreción de endotelina 1	-
Incremento de la producción de óxido nítrico	-

Otro componente importante del SRAA es el heptapéptido angiotensina 1-7 (Ang-(1-7)), resultado de la metabolización de la Ang II por el homólogo de la ECA, la ECA2 (Fig. 1.8.) [397,398]. La Ang-(1-7) también puede obtenerse a partir de la Ang I, ya sea de forma directa por acción de una endopeptidasa (prolil-endopeptidasa y endopeptidasa neutra), o de forma indirecta, obteniéndose al péptido inactivo angiotensina 1-9 (Ang-(1-9)) por acción de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), el cual posteriormente es convertido por la ECA en la Ang-(1-7) (Fig. 1.8.) [398]. La unión de la Ang-(1-7) con el receptor Mas (MasR, *Mas receptor*) acoplado a proteína G, expresado principalmente en las células del túbulo proximal renal, arteriolas aferentes, cardiomiocitos y neuronas, estimula la liberación de bradiquinina, prostaglandinas y óxido nítrico dependiente del endotelio, lo que se traduce en un efecto vasodilatador, antiproliferativo y antiinflamatorio [371,397,398]. Además, la Ang-(1-7) también puede activar el AT2R [371,397,398].

1.3.4.1.3. Sistema de péptidos natriuréticos

Los PNs son un conjunto de péptidos circulantes, activos y con estructura similar, que promueven la diuresis, la natriuresis, y la vasodilatación, y participan en la regulación de procesos inflamatorios [359,399].

En la década de los 80, de Bold y col. (1981) [400], identificaron el primer PN, actualmente conocido como PN auricular (ANP, *atrial natriuretic peptide*) [399,401]. Posteriormente en los años 1988 y 1990 Sudoh y col. [402,403] identificaron y aislaron el BNP y el PN tipo C (CNP, *C-type natriuretic peptide*) [359,399]. Estos PNs, junto con la urodilatina (URO), un PN derivado de la prohormona proANP, y el PN tipo D (DNP, *dendroaspis natriuretic peptide*), de menor relevancia en el sistema CV, conforman el sistema de PNs [399,404].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANP y BNP se expresan en los cardiomiocitos, mientras que CNP se expresa principalmente en el sistema nervioso central, riñones, células endoteliales, condrocitos y sistema reproductor y, a diferencia de los demás PNs, no presenta efectos natriuréticos [399,401,405]. Estos PNs son sintetizados como preprohormonas y, tras ser escindidas enzimáticamente, dan lugar a propéptidos pro-ANP, pro-BNP y pro-CNP [405,406]. La prohormona pro-ANP se escinde por acción de la corina, una serina proteasa localizada en el corazón, obteniéndose el ANP activo y la fracción aminoterminal del proANP (NT-proANP); mientras que el pro-BNP es cortado principalmente por la furina, aunque también puede participar la corina, obteniéndose el péptido bioactivo BNP y NT-proBNP [399,405,406]. De igual manera, la furina escinde al pro-CNP, obteniéndose la forma activa CNP y la fracción aminoterminal del proCNP (NT-proCNP) [399].

El ANP y el BNP ejercen su función al unirse al receptor de guanilil ciclasa A (GC-A, *guanylate cyclase-A*), también conocido como receptor de PN A (NPR-A, *natriuretic peptide receptor-A*), y el CNP se une al receptor de guanilil ciclasa B (GC-B, *guanylate cyclase-B*) o receptor de PN B (NPR-B, *natriuretic peptide receptor-B*) [399,401,404–406]. La activación de estos receptores estimula la producción del segundo mensajero GMPc, que a su vez interacciona con diversas enzimas y canales iónicos localizados en una gran variedad de células [399,401,405]. La actividad del ANP y del BNP contrarresta la activación del SRAA y del SNS al promover la vasodilatación, la natriuresis y la diuresis, al inhibir la secreción de aldosterona, y al reducir la hipertrofia y la fibrosis [401,407]. El CNP, aunque no tiene efectos natriuréticos, participa en la vasomoción, disminuyendo los niveles de vasopresina (incrementados por acción de la Ang II) e impidiendo el incremento del número de las células vasculares [405,406]. Además, recientemente se ha sugerido el posible efecto antiinflamatorio de los PNs y la regulación de su secreción por procesos inflamatorios [408].

Por otra parte, el ANP, el CNP y el BNP (aunque con menor afinidad) se incorporan en las células a través del receptor de PN C (NPR-C, *natriuretic peptide receptor-C*) para su posterior degradación por acción de los lisosomas [359,399,405]. El aclaramiento de los PNs no depende únicamente del NPR-C, sino que también son degradados por acción de la neprilisina (NEP), una endopeptidasa neutra localizada en la membrana plasmática celular, a péptidos inactivos [359,399]. La NEP también se encarga de la degradación de otras moléculas vasodilatadoras (sustancia P, adrenomedulina y bradiquinina) y vasoconstrictoras (ET-1 y Ang II) [359,399].

En las etapas iniciales del desarrollo de la IC se produce un incremento de la producción de ANP y BNP para intentar mantener la homeostasis cardíaca, y contrarrestar así los efectos negativos producidos por la activación neurohormonal [399,401,406]. Sin embargo, a medida que avanza la IC, y se produce un mayor deterioro de la función cardíaca, se observa una pérdida de la eficacia de los PNs, debido al aumento de la expresión de la NEP y de la eliminación mediada por el receptor NPR-C, junto con una disminución de la expresión y de la sensibilidad de los NPR-A y NPR-B [399,401]. Por este motivo, los estudios más recientes se han centrado en la inhibición de la NEP como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la IC [399].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.4.2. Hipertrofia y fibrosis

La hipertrofia del VI y la fibrosis miocárdica juegan un papel fundamental en el desarrollo de la DD y en el incremento de las presiones de llenado del VI, procesos característicos de la ICFEp [336,354]. La hipertrofia se define como un incremento del tamaño de los cardiomiocitos, alteraciones en la organización de los sarcómeros y un engrosamiento disfuncional de la pared del VI [409]. La fibrosis se caracteriza por un incremento de la expresión del colágeno en los cardiomiocitos que produce una mayor rigidez del miocardio y una reducción de la relajación y flexibilidad de la cámara cardíaca [354,410].

El estrés neurohormonal, la presencia de HTA descontrolada, la inflamación debida a la disfunción endotelial, y el incremento de la carga hemodinámica, conducen a una serie de procesos a nivel celular, como la activación de rutas proapoptóticas, la disfunción mitocondrial, una señalización disfuncional del Ca^{+2}, una angiogénesis insuficiente, cambios disfuncionales en la composición de la MEC, etc., que participan en el desarrollo de la hipertrofia y la fibrosis cardíaca a través de la activación de diferentes vías de señalización intracelular [336,354,410].

1.3.4.3. Inflamación

La inflamación sistémica crónica de bajo grado estrechamente relacionada con la presencia de obesidad, DMT2 y estrés metabólico, se denomina metainflamación, y juega un papel fundamental en la fisiopatología de la ICFEp [336,411].

Un estado hiperglucémico prolongado, debido un pobre control de los niveles de glucosa en sangre durante la DMT2, provoca la glucosilación de diferentes proteínas y lípidos, a los que se denomina productos finales de glicación avanzada (AGE, *advanced glycation end-products*), los cuales, además de interactuar con los componentes de la MEC estimulando la fibrosis cardíaca, se unen a su receptor (RAGE, *receptor for advanced glycation end-products*) incrementando la activación de vías inflamatorias, a través de la vía de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells*) [412]. Por otra parte, como se explicó en el apartado 1.2.1.3., la obesidad se caracteriza por el aumento de los depósitos de TA, que presenta un elevado grado de inflamación [91,168]. Los FA saturados (SFA, *saturated fatty acid*) procedentes de los adipocitos activan el receptor tipo Toll 4 (TLR4, *Toll-like receptor 4*) de los macrófagos, induciendo la secreción de adipoquinas proinflamatorias que estimulan la lipólisis [349]. También es importante destacar que las adipoquinas proinflamatorias secretadas por el TAE actúan directamente en el miocardio, regulando procesos inflamatorios a este nivel, así como la rigidez de los cardiomiocitos [337,413]. Todos estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en los estudios de biomarcadores en pacientes con ICFEp, los cuales revelaron un incremento de los niveles plasmáticos de moléculas proinflamatorias como el TNFα, la IL-6, el receptor similar a la interleucina 1, el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15, *growth/differentiation factor 15*) y la proteína C reactiva (CRP, *C reactive protein*), todo lo que parece estar relacionado con la activación del sistema inmune [410,411,414].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La inflamación crónica también presenta efectos importantes a nivel endotelial [415]. Por una parte, estimula la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM, *vascular cell adhesion molecule*), de moléculas de adhesión intercelulares (ICAM, *intracellular adhesion molecule*), y de E-selectina, las cuales estimulan la infiltración de células del sistema inmune, como los monocitos, que a su vez incrementan la producción de TGF-β, un factor implicado en la conversión de los fibroblastos en miofibroblastos, induciendo la fibrosis del miocardio [410,414].

Por otra parte, la inflamación endotelial conduce a una reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO, *nitric oxide*), y a un incremento del estrés oxidativo y de la producción de EROs [410–412,414]. En condiciones normales, el NO se obtiene como resultado de la conversión de la L-arginina en citrulina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS, *nitric oxide synthase*), y ejerce su efecto fisiológico en las células vecinas mediante su unión al grupo hemo de la GCs (Fig. 1.9.) [416–418]. La activación de la GCs estimula la producción del segundo mensajero GMPc (Fig. 1.9.), el cual, a través de la modulación y activación de canales catiónicos, proteínas quinasas y fosfodiesterasas (dependientes de GMPc), regula la PA, el metabolismo energético, la hipertrofia, la fibrosis y la inflamación a nivel CV [416,419–421]. Sin embargo, la menor biodisponibilidad del NO, y la pérdida de la capacidad de respuesta de la GCs al NO endógeno debido a la inflamación crónica característica de la ICFEp, produce una disfunción en la señalización de la ruta NO-GCs-GMPc (Fig. 1.9.) que, en último término, se traduce en daño endotelial y miocárdico, al estimular la hipertrofia y rigidez de los cardiomiocitos [415].

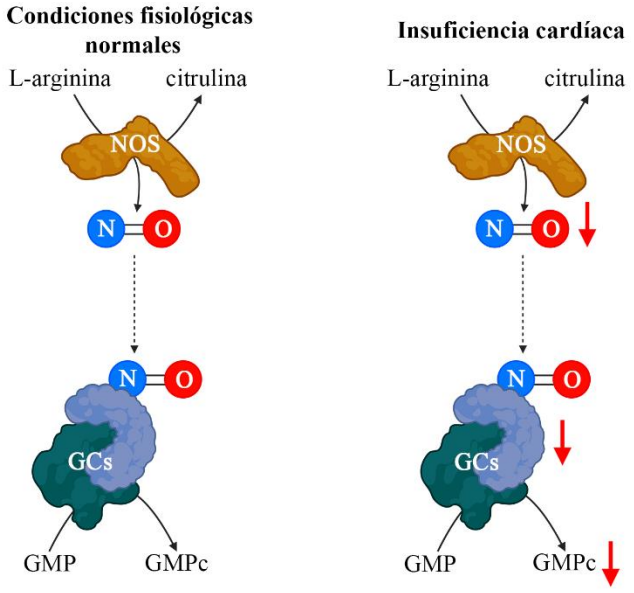


Figura 1.9.: Señalización de la vía del NO-GCs-GMPc en condiciones fisiológicas normales y en la fisiopatología de la ICFEp. N: molécula de nitrógeno, O: molécula de oxígeno. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

1.3.4.4. Metabolismo

La fisiopatología de la ICFEp está estrechamente relacionada con la desregulación de la homeostasis energética cardiaca [163,310,349]. En condiciones

normales, el corazón adulto necesita un gran aporte energético en forma de ATP que le permita mantener una función contráctil y un metabolismo cardíaco adecuados [310,349]. El metabolismo cardíaco depende principalmente (95%) de la OXPHOS mitocondrial, la cual genera 30 moléculas de ATP en presencia de O_2 [310,422]. El 5% restante de la producción de ATP se obtiene a través de la glucólisis en condiciones anaeróbicas, obteniéndose 2 moléculas de ATP [310,422]. El sustrato preferido por el corazón para la posterior producción de ATP (70 %) son los FA, principalmente los de cadena larga (con más de 12 átomos de carbono) [163,310,349]. Los FA de cadena larga son transportados a la matriz mitocondrial (MM) a través de la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT, *carnitine acylcarnitine translocase*) mediante un proceso dependiente de L-carnitina [423]. Una vez en el interior de la mt, estos FA son oxidados (β-oxidación) a moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) que, tras entrar al ciclo de Krebs, se descomponen en CO_2, electrones (e^-) y protones (H^+) que serán utilizados en la OXPHOS para la producción de las moléculas de ATP [423]. Además, el corazón sano se caracteriza por ser metabólicamente flexible, es decir, puede utilizar otros sustratos energéticos como glucosa, cuerpos cetónicos, AA de cadena ramificada, etc., para garantizar una producción de ATP suficiente para mantener un metabolismo cardíaco adecuado [163,310,349].

Se ha demostrado que en la IC la homeostasis energética del miocardio está alterada debido a la pérdida de la flexibilidad metabólica cardíaca y a la disfunción mitocondrial, llegando a producirse un 30% menos de ATP en comparación a las condiciones fisiológicas normales [349,424,425]. Aunque actualmente está bien establecido que en la ICFEr se produce un incremento del uso de la glucosa y de los cuerpos cetónicos para la obtención de las moléculas de ATP, todavía no existe consenso acerca de las modificaciones en el uso de los sustratos energéticos cardíacos producidas en la ICFEp [310,426]. El análisis del metaboloma de muestras de tejido cardiaco de pacientes con HFpEF sugiere una reducción de la absorción de los FA en el miocardio, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Tong y col. (2021) [427], que observaron, mediante una medición indirecta, una reducción de la β-oxidación en un modelo animal de ICFEp [426,428]. Sin embargo, otros estudios *in vivo* mostraron que en estas condiciones la β-oxidación de los FA se mantiene o incluso está aumentada, mientras que la glucólisis se ha reducido [426,429,430].

Por otra parte, en la ICFEp se observaron alteraciones en la morfología y la función de las mts de los cardiomiocitos y del músculo esquelético, debido a alteraciones en la homeostasis del Ca^{+2}, y en la transcripción y modificaciones postraduccionales de las proteínas mitocondriales, así como a un aumento del estrés oxidativo, de la mitofagia y de la apoptosis mitocondrial [425]. La adecuada regulación de la entrada y salida del Ca^{+2} en la MM es fundamental para la adaptación de la producción de ATP mediante la OXPHOS a la carga de trabajo contráctil del corazón [431–433]. Por lo tanto, la absorción de Ca^{2+} desde el citosol a la MM es un proceso estrechamente regulado por el complejo del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, *mitochondrial calcium uniporter*), un canal localizado en la membrana mitocondrial interna (MMI) constituido por el canal MCU, los sensores reguladores de Ca^{2+} 1 (MICU1, *mitochondrial calcium*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

uptake 1) y 2 (MICU2, *mitochondrial calcium uptake 2*), y otras proteínas adicionales, como el regulador 1 del uniportador de calcio mitocondrial (MCUR1, *mitochondrial calcium uniporter regulator 1*), MCUb y EMRE (Fig. 1.10.) [431,433,434].

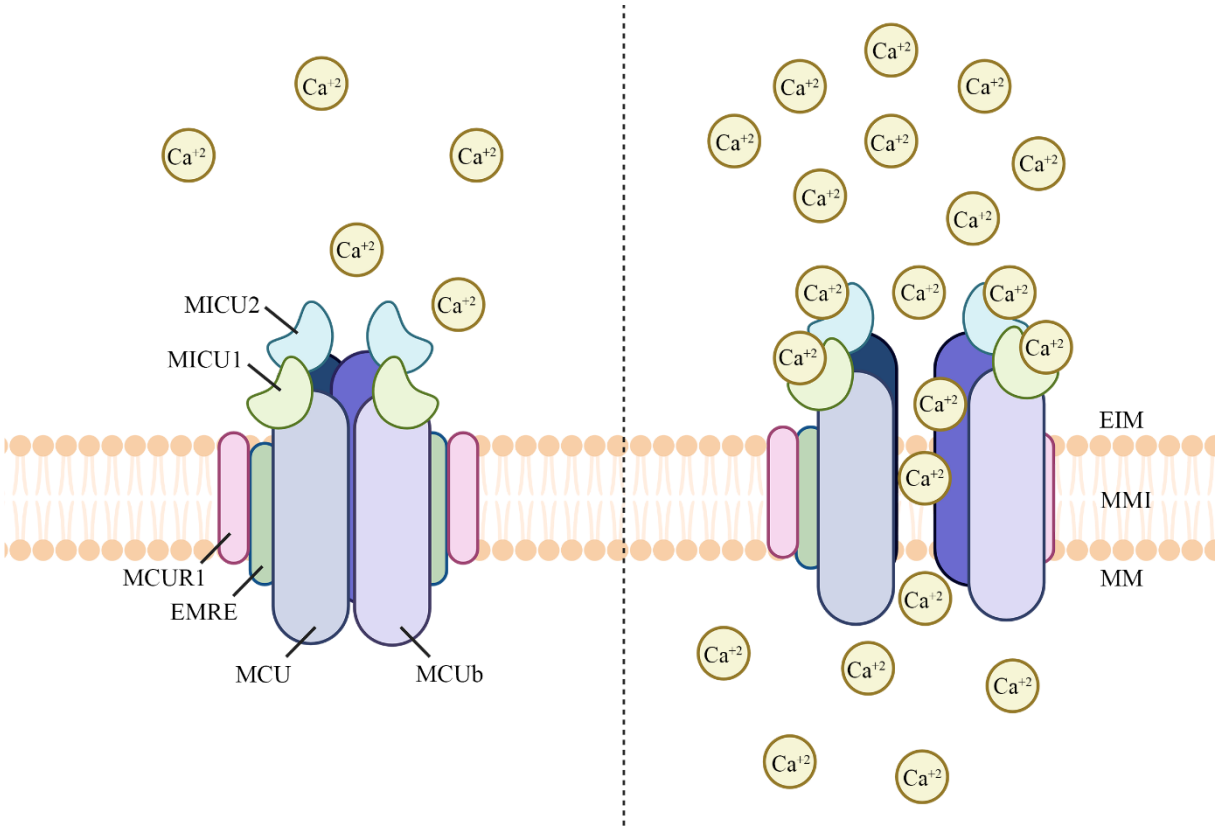


Figura 1.10.: Regulación de la homeostasis del Ca^{+2} mitocondrial. El complejo MCU regula la entrada de Ca^{+2} en la matriz de la mitocondria al detectar concentraciones elevadas de Ca^{+2} en el espacio intermembrana mitocondrial (EIM). Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

Durante la IC se han observado alteraciones disfuncionales en la composición del complejo MCU, lo que lleva a una entrada excesiva de Ca^{+2} en la MM responsable del deterioro de la función mitocondrial [431,432,435]. En concreto, se ha observado una mayor expresión de los reguladores MICU1 y MICU2 y un incremento del ratio MICU1/MCU en pacientes con IC [434,436].

Asimismo, las alteraciones morfológicas de las mts localizadas en el músculo esquelético parecen estar relacionadas con una menor TE, un síntoma característico de todos los pacientes con ICFEp [425]. Por lo tanto, se ha sugerido que el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento de la ICFEp debería centrarse en la modulación y la mejora de vías metabólicas críticas a nivel cardiomiocitario [310,349].

1.3.5. Tratamiento

Al igual que en el tratamiento de la obesidad y la DMT2, una alimentación equilibrada y la realización de ejercicio físico son fundamentales en la prevención de la

incidencia y el desarrollo de la IC, tanto con FE reducida como preservada [437–439]. A pesar de la importancia de adoptar un estilo de vida saludable, la terapia farmacológica (a veces acompañada de algún tipo de dispositivo implantable) es fundamental para aliviar los síntomas de la IC y para evitar o reducir los ingresos hospitalarios y la mortalidad por IC [439].

1.3.5.1. Dispositivos implantables

En los últimos años los dispositivos implantables han adquirido popularidad como terapia complementaria a la farmacológica, con el fin de mejorar los parámetros hemodinámicos y el remodelado cardíaco inverso, y proporcionar terapia eléctrica a los pacientes con IC, lo que se traduce en un incremento de la calidad de vida, en una reducción de la mortalidad y morbilidad, y en una disminución del impacto económico de la IC [440–442]. Actualmente existe un amplio catálogo de dispositivos implantables, como por ejemplo los desfibriladores cardioversores implantables, utilizados en el tratamiento de las arritmias en pacientes con IC, dispositivos implantables para el monitoreo remoto de la presión de la arteria pulmonar, marcapasos, desfibriladores automáticos implantables, etc. [442,443].

1.3.5.2. Farmacoterapia

El tratamiento para la ICFEr está bien definido y existen una gran variedad de fármacos diferentes que, tras ser evaluados en diferentes ensayos clínicos, han demostrado su capacidad para reducir las comorbilidades y la mortalidad de los pacientes con ICFEr [309,444–446]. Sin embargo, como se mencionó previamente en el apartado 1.3.4., actualmente no existen opciones terapéuticas adecuadas para el tratamiento de la ICFEp, y los fármacos empleados para el tratamiento de la ICFEr no han demostrado los mismos efectos beneficios en pacientes con ICFEp, por lo que el tratamiento actual de la ICFEp se basa en la reducción de los síntomas y signos de la enfermedad y en la mejora de la calidad de vida de los pacientes [359,439,444].

1.3.5.2.1. Diuréticos

El desequilibrio del sistema neurohormonal en la IC provoca un incremento de la vasoconstricción y de la retención de líquidos y sales, lo que se traduce en el desarrollo de congestión, definida como síntomas y signos de acumulación de líquido extracelular que provocan un incremento de las presiones de llenado cardíaco [447–449]. Por este motivo, la terapia con fármacos diuréticos es fundamental para abordar este desequilibrio de líquidos y sales en la ICFEr e ICFEp [309,447].

Los diuréticos del asa (bumetanida, furosemida y torsemida) impiden la reabsorción del Na^+ y Cl^- en el asa de Henle al inhibir el cotransportador Na^+-K^+-$2Cl^-$, y son los preferidos en la mayoría de los pacientes con IC [309,450]. En el caso de pacientes hipertensos con IC y una leve congestión de líquidos pueden emplearse diuréticos tiazídicos (clortalidona o la hidroclorotiazida), los cuales actúan inhibiendo el cotransportador de Na^+-Cl^- localizado en el túbulo contorneante distal de la nefrona [309,450,451].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.5.2.2. β-bloqueantes

Los β-betabloqueantes antagonizan la activación de los βAR, impidiendo la actividad neuronal simpática (apartado 1.3.4.1.1 de la introducción), por lo que desempeñan un papel importante en el control de procesos fisiológicos como la presión arterial, la FC, y el metabolismo energético, así como en el control frente a la cardiotoxicidad [452,453]. Es importante tener en cuenta que, a pesar de sus efectos beneficiosos, el tratamiento con β-bloqueantes también puede provocar una serie de efectos secundarios como bradicardia, hipo/hipertensión, hipervolemia, síntomas gastrointestinales, edema, hiperglucemia, etc. [359].

Desde los primeros años del siglo XXI, el uso de los β-bloqueantes bisoprolol, carvedilol, metoprolol, nebivolol, etc. ha sido fundamental en el tratamiento de pacientes con ICFEr debido a su capacidad para mejorar la FE y los síntomas, además de reducir el riesgo de muerte y hospitalización en pacientes con ICFEr [309,453,454]. Sin embargo, los beneficios del uso de β-bloqueantes para el tratamiento de la ICFEp no están completamente aclarados [455,456]. Mientras que algunos ensayos clínicos y estudios observacionales apuntan a que el tratamiento de pacientes con ICFEp con β-bloqueantes presenta beneficios similares a los observados en pacientes con ICFEr, otros ensayos clínicos muestran que los beneficios observados se producen pacientes con ICFElr, asociándose el tratamiento de pacientes con valores de FE superiores con un mayor número de eventos CV adversos [454–458].

1.3.5.2.3. Inhibidores del SRAA

Debido a la continua activación del SRAA en la fisiopatología de la IC, se han diseñado una serie de fármacos con capacidad de inhibirlo a diferentes niveles, los cuales han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de pacientes con ICFEr [359,459]. Sin embargo, los beneficios de la inhibición del SRAA en la mortalidad y hospitalización por ICFEp no están del todo claros, y las guías clínicas se centran en el manejo de las comorbilidades [439,459].

1.3.5.2.3.1. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs)

Los iECAs (captopril, enalapril, ramipril, lisinopril, ramipril, trandolapril, etc.) comenzaron a utilizarse en la práctica clínica a finales de los 70, y fueron el primer grupo de fármacos que redujo significativamente la mortalidad en pacientes con ICFEr [460,461]. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ECA, impidiendo la conversión de la Ang I en Ang II y la degradación de la bradiquinina, y estimulando la síntesis de Ang-(1-7) a partir de la Ang I, lo que lleva a un incremento de la vasodilatación, natriuresis y actividad simpática [359,462,463]. Estos efectos se traducen en una disminución significativa de la PA, de la mortalidad CV, del IM y de las hospitalizaciones por IC [464]. Las guías clínicas actuales para el manejo de la IC recomiendan el uso de iECAs en pacientes con FE < 40 % para prevenir la IC sintomática y reducir la mortalidad [309], aunque debe prestarse atención a la aparición de efectos secundarios como la tos, hipotensión, disnea, angioedema y síntomas gastrointestinales [359,380].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.5.2.3.2. Antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina II

A pesar del tratamiento bien establecido con iECAs en la IC, diversos estudios han demostrado que los niveles de Ang II se mantiene debido a mecanismos independientes de la ECA [465]. Por este motivo, también se recomienda el uso de los agonistas de los AT1R (ARA II), como el candesartán, losartán y valsartán (VAL), los cuales presentan un efecto vasodilatador, natriurético y son capaces de reducir la secreción de aldosterona [359]. Diversos estudios han demostrado los efectos beneficiosos que presenta el tratamiento de pacientes con ICFEr con ARA II [465–468]; sin embargo, el uso de ARA II en pacientes con ICFEp no reduce la morbilidad ni la mortalidad en comparación con el grupo tratado con ACEi, aunque sí fue bien tolerados [469].

1.3.5.2.4. Antagonistas del receptor de mineralocorticoides

El bloqueo de los RMs, mediante el uso de ligandos antagonistas esteroideos, provoca una reducción de la reabsorción de Na^+ y agua a nivel renal, y participa en procesos antihipertróficos, antifibróticos y antiinflamatorios cardíacos [470].

De los antagonistas del RM (ARM) disponibles actualmente es importante destacar a las espironolactonas, que presentan una alta afinidad y baja selectividad por el RM, y a la eplerenona, con una menor afinidad, pero mayor selectividad por el RM, lo que reduce el número de efectos adversos [359,470]. Se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con ICFEr con ARM disminuye la morbilidad, las hospitalizaciones por IC y la mortalidad por todas las causas [309,470]. Sin embargo, las evidencias para el uso de ARM en el tratamiento de la ICFEp no son tan claras [470]. En el ensayo clínico TOPCAT se observó que, aunque el tratamiento de pacientes con ICFEp con espironolactona no era capaz de reducir el resultado primario de número de muertes por ECVs y hospitalización por IC en comparación con el placebo, esta terapia sí disminuía el número de reingresos por IC [471]. Además, en el ensayo clínico Aldo-DHF se demostró que el tratamiento de pacientes con ICFEp con espironolactona tiene efectos beneficiosos en la función diastólica del VI [472]. Estos ensayos han jugado un papel clave en la recomendación del uso de ARM junto con un diurético de asa para el tratamiento de pacientes con IC que presenten una FE ≥ 45% [472,473].

El novedoso ARM no esteorideo finerenona, el cual presenta una alta afinidad y selectividad por el RM, ha presentado efectos antiinflamatorios/antifibróticos en modelos animales de daño cardíaco y se encuentra actualmente bajo investigación para el tratamiento de la ICFEp [470].

1.3.5.2.5. Inhibidores del co-transportador de sodio-glucosa tipo 2

Como se explicó ampliamente en los apartados 1.2.2.4.1.7. y 1.2.2.5.2. de la introducción, los resultados prometedores obtenidos en diversos ensayos clínicos (EMPEROR-Reduced, EMPEROR-Preserved, SOLOIST-WHF, DAPA-HF, etc.) son los responsables de la inclusión, en las últimas guías de uso clínico para el tratamiento de la ICFEr y la ICFEp, de los iSGLT2 como la EMPA [234,253,255,474].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.5.2.6. Estimuladores de la guanilato ciclasa soluble

Una de las vías de señalización celular más importantes en la regulación CV es la vía del NO-GCs-GMPc, cuya desregulación en enfermedades como la IC, la DMT2 y la HTA produce daño miocárdico y endotelial, así como un incremento de la inflamación [418,421,475]. Por este motivo, la vía del NO-GCs-GMPc se ha establecido como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la IC y, en los últimos años, se han desarrollado una serie de moléculas que intervienen activamente en su regulación [417,418].

Los estimuladores de la GCs, como el cinaciguat, riociguat y vericiguat, son unas moléculas sintéticas con capacidad para activar a la GCs a través de un sitio de unión independiente del NO, incrementando su sensibilidad por el NO endógeno y provocando una estimulación de la producción de GMPc (Fig. 1.11.) [476–479].

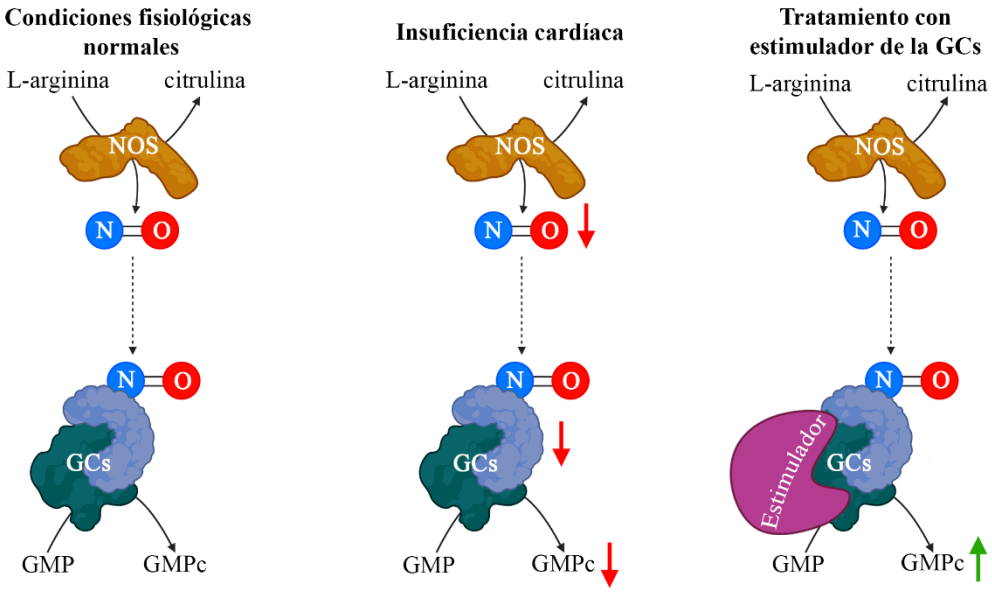


Figura 1.11.: Mecanismo de acción de los fármacos estimuladores de la GCs. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

El vericiguat, el estimulador oral de la GCs más novedoso, ha demostrado su capacidad para reducir significativamente las muertes por causas CV o la hospitalización por ICFEr en el ensayo clínico en fase III VICTORIA, estando actualmente aprobado para tratamiento de pacientes con ICFEr en Estados Unidos, Japón y la Unión Europea [479,480]. Sin embargo, estos resultados prometedores en la mortalidad y hospitalizaciones no fueron reproducibles en los ensayos clínicos SOCRATES-PRESERVED y VITALITY-HFpEF, en los que pacientes con ICFEp fueron tratados con vericiguat [481,482].

1.3.5.2.7. Inhibidor dual del receptor AT1 de la Ang II y de la neprilisina

Actualmente se recomienda que los pacientes con ICFEr sintomática (clase NYHA II o III) cambien la terapia con iECAs o ARA-II por un inhibidor dual del AT1R y de la NEP (ARNi, *angiotensin receptor neprilysin inhibitor*), debido a sus mejoras en la mortalidad (Fig. 1.12.) [309]. El primer ARNi formulado fue el sacubitril/valsartán

(SAC/VAL, Entresto®), también conocido como LCZ696, y posteriormente se desarrolló el S086, una combinación de EXP3174, el metabolito activo del losartán, con sacubitril en una proporción equimolar 1:1 [483].

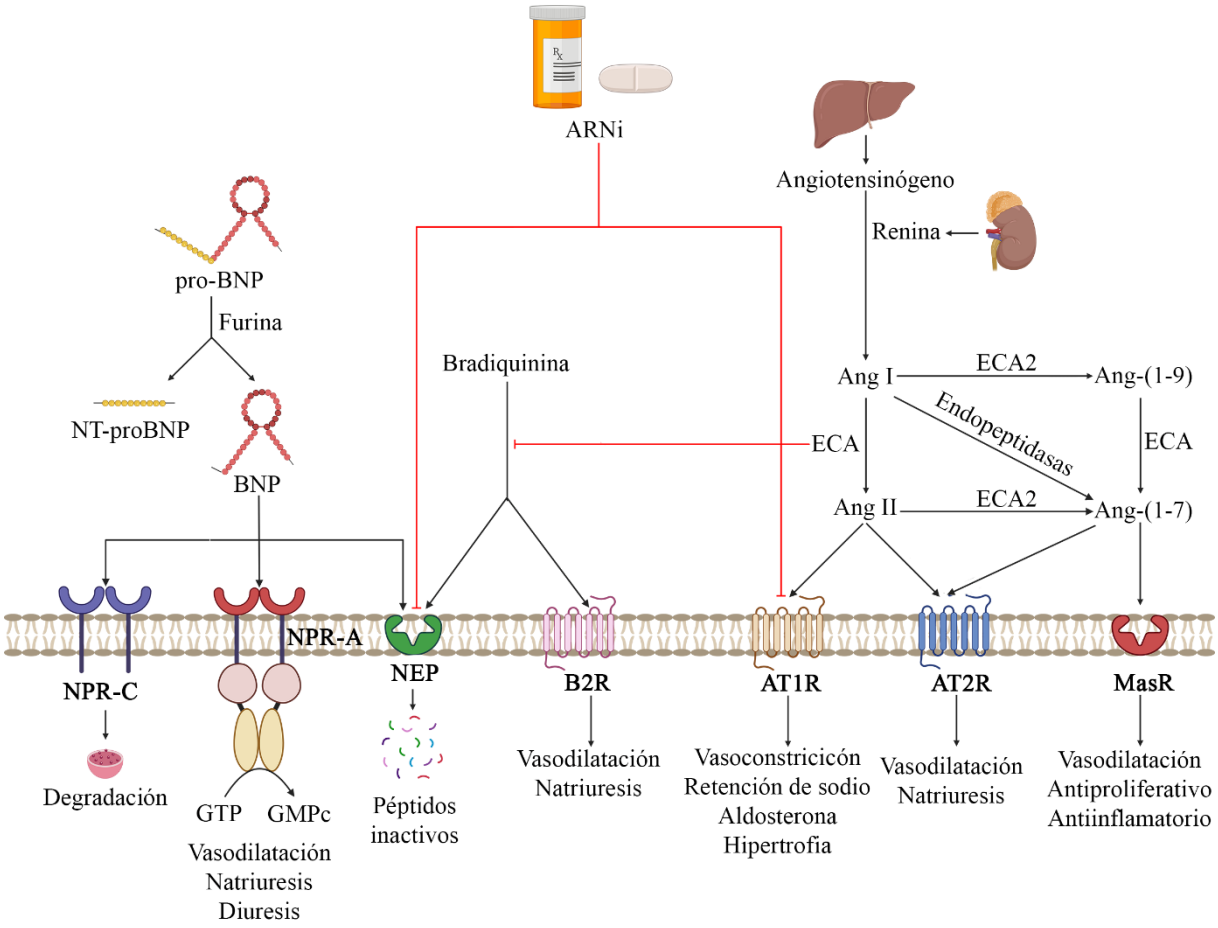


Figura 1.12.: Mecanismo de acción de los inhibidores duales del AT1R y de la NEP. La inhibición simultánea del AT1R y de la NEP ha resultado ser muy eficaz en el tratamiento de la IC, principalmente la ICFEr, al estimular la vasodilatación, la natriuresis, la diuresis, y los procesos antiproliferativos y antiinflamatorios. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

1.3.6. Sacubitril/valsartán

El SAC/VAL, uno de los objetos de estudio de esta tesis doctoral, es una combinación equimolar (1:1) de los fármacos sacubitril y VAL en forma de sal (Fig. 1.13.), que ha sido diseñada por Novartis Pharma AG (CHE), y que fue aprobada por la FDA como medicamento de primera línea para el tratamiento de la ICFEr, el 7 de julio del 2015 [484]. Posteriormente, el 16 de febrero de 2021, la FDA extendió su indicación a pacientes con ICFEp [485].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

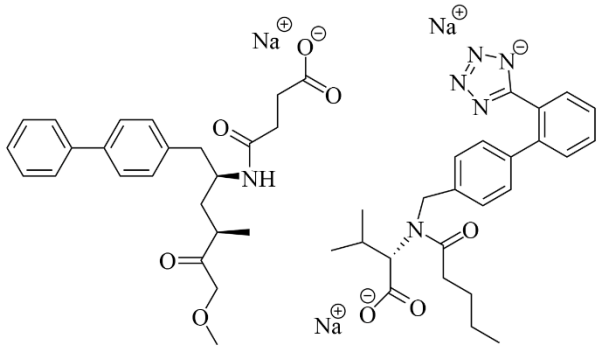


Figura 1.13.: Representación gráfica de la estructura molecular del SAC/VAL. Imagen de autoría propia realizada con el programa informático ChemDraw® 23.1.1.

El VAL es un bloqueador del receptor AT1 que ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de ECVs [486]. Por otra parte, el sacubitril es un profármaco que *in vivo* es hidrolizado por la enzima hepática carboxilesterasa 1 en el metabolito activo sacubitrilato (LBQ657), el cual es capaz se inhibir a la NEP [487,488].

1.3.6.1. Posología y propiedades farmacocinéticas del sacubitril/valsartán

Para el tratamiento de la IC se recomienda comenzar con una dosis inicial de 100 mg (49 mg sacubitril y 51 mg valsartán) de SAC/VAL 2 veces al día. Tras 2-4 semanas, si el tratamiento es bien tolerado, se instaura la dosis diana de 200 mg (97 mg sacubitril y 103 mg valsartán) de SAC/VAL 2 veces al día [489]. Antes de empezar el tratamiento con SAC/VAL, deben retirarse los iECAs o ARA II y dejar un tiempo de eliminación de al menos 36 horas [489].

El SAC/VAL es una combinación de fármacos de absorción rápida que alcanza la concentración plasmática máxima de VAL en 30 minutos y la del LBQ657 en menos de 2 horas, y en cuya administración no interfiere la presencia de alimentos [490]. El LBQ657 se excreta mayoritariamente (50-70%) a través de las heces, mientras que el VAL se elimina (aproximadamente el 90%) a través de la orina [490].

1.3.6.2. Ensayos clínicos del sacubitril/valsartán

Debido a la importancia del SRAA y del sistema de PN en la fisiopatología de la IC, a finales del año 2009 se iniciaron los ensayos clínicos que permitieron evaluar los efectos del primer ARNI sintetizado, el SAC/VAL, en pacientes con ICFEr y con ICFEp [491,492].

1.3.6.2.1. <u>Ensayos clínicos del sacubitril/valsartán en pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida</u>

PARADIGM-HF (Prospective comparison of ARNi with ACEi to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial) (diciembre de 2009-marzo del 2014) [491,493,494]: ensayo clínico fase III, prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, grupos paralelos, y con comparador activo cuyo objetivo era investigar si el tratamiento con SAC/VAL de pacientes con ICFEr generaba una mayor disminución de la mortalidad y morbilidad en comparación al

tratamiento con enalapril [491,493,494]. En diciembre de 2009 comenzaron a reclutarse los pacientes que cumplían los criterios de inclusión (Tabla 1.9.) [491,493,494]. 8399 pacientes fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (4187 pacientes) y en el de enalapril (4187 pacientes) [491,493,494]. Tras un período de pre-aleatorización simple ciego de enalapril, seguido de un período de pre-aleatorización simple ciego de SAC/VAL comenzó el período de tratamiento aleatorizado doble ciego, en el que los pacientes que toleraban 10 mg/12 horas de enalapril o 200 mg/12 horas de SAC/VAL fueron aleatorizados (1:1) a tratamiento doble ciego con las dosis 10 mg/12 horas de enalapril o 200 mg/12 horas de SAC/VAL (Tabla 1.10.) [491,493,494]. Debido a los resultados beneficiosos observados en el grupo de tratamiento con SAC/VAL durante un seguimiento de 27 meses, el ensayo se paralizó antes de la fecha prevista [491,493,494]. El tratamiento de pacientes con ICFEr con SAC/VAL redujo significativamente la mortalidad por causas CV o el ingreso por IC en comparación con el enalapril (resultado primario) [491,493,494]. Además, el SAC/VAL disminuyó significativamente la mortalidad por cualquier causa y los síntomas de IC; condujo a una menor reducción de la puntuación del KCCQ a los 8 meses, sin que se observasen diferencias en el número de pacientes con fibrilación auricular de nueva aparición ni en el deterioro de la función renal en comparación con el grupo tratado con enalapril [491,493,494].

Los resultados obtenidos en este ensayo clínico fueron los responsables de que la FDA aprobase el SAC/VAL como tratamiento de primera línea de pacientes adultos con ICFEr, y promovieron la posterior realización de múltiples ensayos clínicos en los que se evaluaron los efectos del SAC/VAL sobre otros parámetros y poblaciones de pacientes con ICFEr [309,495–497].

PARALLEL-HF (junio 2015-febrero 2021) [407,498]: ensayo clínico fase III prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, de grupos paralelos, y con comparador activo, que evaluó la eficacia clínica y la seguridad del tratamiento de pacientes japoneses con ICFEr con SAC/VAL [407,498]. En primer lugar, se realizó un período pre-aleatorización simple ciego, en el que los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (tabla 1.9.) recibieron una dosis de 50 mg/12 horas de SAC/VAL durante 2 semanas (Tabla 1.10.) [407,498]. Los pacientes que toleraron bien el tratamiento fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (112 pacientes), y en el grupo de tratamiento con enalapril (113 pacientes), y recibieron la mitad de la dosis diana del tratamiento durante 4 semanas (Tabla 1.10.) [407,498]. Transcurrido el período de tratamiento con la dosis inicial, los pacientes fueron tratado con la dosis diana (200 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril) durante 20 semanas (Tabla 1.10) [407,498]. No se observaron diferencias entre los grupos en el número de muertes CVs y de hospitalizaciones por IC a los 34 meses (resultado primario compuesto) [407,498]. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos en el empeoramiento de la IC [407,498].

TRANSITION (febrero 2016-junio 2018) [499,500]: ensayo clínico fase IV aleatorizado, multicéntrico, con grupos paralelos y etiqueta abierta, cuyo objetivo fue investigar si el inicio intrahospitalario del tratamiento con SAC/VAL en pacientes con

USC UNIVERSIDADE

IC hemodinámicamente estabilizados es tan bien tolerado como su inicio precoz tras el alta en régimen ambulatorio [499,500]. Los 998 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.9.) fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento pre-alta con SAC/VAL (497 pacientes) y en el de tratamiento post-alta con SAC/VAL (501 pacientes) [499,500]. Los pacientes fueron tratados con una dosis inicial de 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL, duplicándola cada 2-4 semanas hasta alcanzar la dosis diana de 200 mg/12 horas de SAC/VAL durante 10 semanas (Tabla 1.10.) [499,500]. Los resultados obtenidos mostraron que el 45.4% de los pacientes en el grupo de tratamiento pre-alta, y un 50.7% de pacientes en el grupo de tratamiento post-alta, alcanzaron la dosis diana de SAC/VAL al cabo de 10 semanas (resultado primario) [499,500]. Además, el 62.1% de los pacientes en el grupo de tratamiento pre-alta, y un 68.5% de pacientes en el grupo de tratamiento post-alta, alcanzaron y mantuvieron una dosis de 49/51 o 97/103 mg de SAC/VAL durante al menos 2 semanas hasta la décima semana; el 86.0% de los pacientes en el grupo de tratamiento pre-alta, y un 89.6% de pacientes en el grupo de tratamiento post-alta, alcanzó y mantuvo cualquier dosis de SAC/VAL durante al menos 2 semanas hasta la décima semana; y el 7.3% de los pacientes en el grupo de tratamiento pre-alta, y un 4.9% de pacientes en el grupo de tratamiento post-alta, interrumpieron el tratamiento debido a efectos adversos (resultados secundarios) [499,500].

PIONEER-HF (mayo 2016-mayo 2018) [501,502]: ensayo clínico fase IV prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego y con comparador activo, cuyo objetivo era evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de SAC/VAL en comparación con enalapril en pacientes con ICFEr estabilizados durante la hospitalización por IC aguda descompensada [501,502]. 881 pacientes que cumplieron los criterios descritos en la Tabla 1.9. fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (440 pacientes) y en el de tratamiento con enalapril (441 pacientes) [501,502]. El protocolo del tratamiento, que aparece ampliamente detallado en la tabla 1.10., consiste en un período de aleatorización de doble ciego (intrahospitalario), un período de ajuste de dosis y seguimiento ambulatorio, y finalmente el tratamiento durante 4 semanas con 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril [501,502]. Además, para garantizar el doble ciego, junto al tratamiento se administró un placebo [501,502]. El tratamiento con SAC/VAL redujo significativamente la concentración de NT-proBNP en comparación con el enalapril (resultado primario de eficacia) [501,502]. No se observaron diferencias en las tasas de empeoramiento de la función renal, hiperpotasemia e hipotensión sintomática y/o angioedema entre ambos grupos (resultados secundarios de eficacia y seguridad) [501,502].

ACTIVITY-HF (julio 2016-noviembre 2019) [503]: ensayo clínico fase IV aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, y comparador activo, cuyo objetivo fue evaluar a corto plazo el efecto del SAC/VAL en la mejora de la capacidad máxima de ejercicio en pacientes con ICFEr en comparación con el enalapril [503]. 201 pacientes fueron incluidos en el ensayo (Tabla 1.9.) y aleatorizados en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (103 pacientes) o enalapril (98 pacientes) [503]. Durante 2 semanas se les administró una dosis inicial del tratamiento correspondiente, y posteriormente se les trató con la dosis diana 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

durante 10 días (Tabla 1.10.) [503]. Los resultados obtenidos demostraron que no existen diferencias en el consumo máximo de O_2 (VO_2max) basal hasta la semana 12 de tratamiento entre los 2 grupos (resultado primario) [503]. Además, no se observaron diferencias significativas en los cambios en la pendiente de la ventilación/minuto en relación a la generación de CO_2, aunque se observaron ligeras variaciones no significativas en el cambio de la FC en el primer umbral ventilatorio entre el grupo de SAC/VAL en comparación con el enalapril en la semana 12 de tratamiento [503]. Ambos grupos de pacientes se agotaron por igual durante las pruebas de ejercicio cardiopulmonar [503].

EVALUATE-HF (agosto 2016-enero 2019) [504]: ensayo clínico fase IV aleatorizado, doble ciego, multicéntrico, grupos paralelos, doble simulación y control activo, cuyo objetivo es evaluar la capacidad del SAC/VAL para mejorar la rigidez aórtica central y el remodelado cardíaco en la ICFEr en comparación con el enalapril [504]. 464 pacientes cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.9.) y fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (231 pacientes) y en el de tratamiento con enalapril (233 pacientes) [504]. Durante el período de aleatorización doble ciego de los pacientes fueron tratados con SAC/VAL o enalapril y placebo hasta alcanzar la dosis diana (Tabla 1.10.) [504]. Transcurridas 12 semanas todos los pacientes pasaron al tratamiento de etiqueta abierta con SAC/VAL, y a las 14 semanas se ajustó la dosis diana de SAC/VAL, la cual se mantuvo hasta finalizar en ensayo 10 semanas después (Tabla 1.10.) [504] Los resultados mostraron que el tratamiento con SAC/VAL redujo la impedancia aórtica, aunque no de manera significativa, a las 12 semanas en comparación con el enalapril (resultado primario) [504]. Además, el SAC/VAL redujo significativamente los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI, el volumen de la aurícula izquierda (AI), el ratio entre la onda de llenado precoz del VI (E, *early diastolic transmitral flow velocity*) y el pico de velocidad anular diastólica temprana (e′, *peak early-diastolic annular velocity*) (E/e′), y los niveles de NT-proBNP; y mejoró significativamente la puntuación del KCCQ *vs.* el enalapril [504].

AWAKE-HF (diciembre 2016-marzo 2018) [505]: es un ensayo clínico fase IV, prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, doble simulación, grupos paralelos, y con comparador activo, que se centró en la evaluación del efecto del tratamiento de pacientes con ICFEp con SAC/VAL en su la actividad física y el sueño empleando un sensor portátil [505]. 139 pacientes cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.9.) y aceptaron participar en el estudio por lo que fueron aleatorizados en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (69 pacientes) y en el grupo de enalapril (70 pacientes), y durante 2 semanas se les administró una dosis inicial del tratamiento que se incrementó cada 2 semanas hasta alcanzar la dosis diana de 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril junto con la administración de un placebo para garantizar el doble ciego (Tabla 1.10.) [505]. Posteriormente se realizó una fase de etiqueta abierta durante 8 semanas que comenzó con la administración de una dosis baja de SAC/VAL la cual se incrementó hasta alcanzar la dosis diana (Tabla 1.10.) [505]. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en los recuentos medios de actividad durante los 30 min/día más activos en las primeras 8 semanas de tratamiento entre ambos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

grupos (resultado primario) [505]. Tampoco se observaron diferencias en el recuento medio de actividad/minuto durante el sueño nocturno durante las primeras 8 semanas entre los 2 grupos, aunque sí que se produjo una mejora significativa de la puntuación del KCCQ a las 16 semanas en los pacientes que recibieron SAC/VAL en comparación con el enalapril [505].

OUTSTEP-HF (diciembre 2016-abril 2018) [506,507]: ensayo clínico fase III prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, doble simulación, grupos paralelos, y con comparador activo, diseñado para estudiar el efecto en del tratamiento con SAC/VAL en la actividad física diurna no sedentaria de pacientes con ICFEp [506,507]. Se incluyeron 619 pacientes (Tabla 1.9.), de los cuales 309 fueron aleatorizados en el grupo de tratamiento con SAC/VAL y 310 pacientes en el grupo enalapril, y se les administró una dosis inicial de los tratamientos hasta alcanzar la dosis diana de 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril respectivamente (Tabla 1.10.) [506,507]. Junto con los tratamientos se administró placebo para garantizar el doble ciego [506,507]. Tras 12 semanas de tratamiento doble ciego no se observaron diferencias en la distancia recorrida en la prueba de la caminata de 6 minutos (C6M), ni en los mínimos cuadrados promedio de la actividad diurna diaria no sedentaria, medida con el acelerómetro, entre los grupos de tratamiento a las 12 semanas (resultado primario) [506,507]. Además, un mayor porcentaje de pacientes del grupo SAC/VAL mejoraron en más de 30 m en la prueba de la C6M tras 12 semanas de tratamiento, incrementaron en más de un 10% la actividad física no diurna tras 1, 2 y 4 semanas de tratamiento, y presentaron una mejora de los síntomas según la evaluación global del paciente tras 4 semanas de tratamiento en comparación con el enalapril [506,507]. Sin embargo, estos cambios no fueron significativos [506,507].

Life-HF (marzo 2017-septiembre 2020) [508,509]: ensayo clínico fase IV III prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, doble simulación y con comparador activo, cuyo objetivo los efectos del tratamiento con SAC/VAL en pacientes con ICFEr avanzada y síntomas recientes de clase IV de la NYHA en comparación con el VAL solo [508,509]. Durante el período de prealetorización abierto los 335 participantes que cumplieron con los criterios de inclusión (Tabla 1.9.) recibieron una dosis de 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL (nivel 1) durante 3-7 días (Tabla 1.10.) [508,509]. Posteriormente los pacientes se aleatorizaron en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (167 pacientes) y en el grupo de tratamiento con enalapril (168 pacientes), y comenzaron recibiendo una dosis inicial de tratamiento la cual se modificó cada 2 semanas hasta alcanzar la dosis diana la cual se mantuvo durante 20 semanas (Tabla 1.10.) [508,509]. La evaluación de los participantes se realizó a las 2, 4, 8, 12 y 24 semanas, y se observó que la media de los niveles de NT-proBNP se mantuvo elevado durante 8 semanas y luego disminuyó por debajo de los niveles basales en ambos grupos de tratamiento a las 24 semanas, no observándose diferencias en el área bajo la curva (AUC, *area under the curve*) de los niveles de NT-proBNP entre los 2 grupos de tratamientos (resultados primarios) [508,509]. El número de días que los pacientes se mantuvieron sin hospitalizaciones y sin episodios de IC fue mayor en el grupo VAL en comparación con el SAC/VAL, y no se observaron diferencias

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

significativas en muerte por causas CV o por todas las causas y hospitalizaciones por IC (resultados secundarios) [508,509].

NEPRIExTol-HF (febrero 2018-septiembre 2020) [510]: ensayo clínico fase IV aleatorizado, un único centro, doble ciego, comparador activo y comparativo, diseñado para evaluar el efecto del tratamiento con SAC/VAL en el VO_2max y la prueba de la C6M en comparación al enalapril en participantes con ICFEr [510]. En el ensayo se incluyeron 52 pacientes (Tabla 1.9.), los cuales fueron aleatorizados doble ciego en el grupo SAC/VAL (29 pacientes) y en el grupo enalapril (23 pacientes), y se fue incrementando cada 2 semanas la dosis del tratamiento administrado hasta alcanzar la dosis diana 200 mg/12 horas de SAC/VAL o 20 mg/12 horas de enalapril (Tabla 1.10.) [510]. El seguimiento de los pacientes se realizó a las 12 y 24 semanas, y no se observaron diferencias significativas en el VO_2max y en la prueba de la C6M (resultado primario); en el flujo sanguíneo y la conductancia vascular del antebrazo y flujo sanguíneo máximo en reposo; en la fuerza muscular, la masa magra, la masa grasa, el porcentaje de grasa y la calidad de vida; y en los niveles de BNP y NT-proBNP entre los grupos (resultados secundarios) [510].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.9.: Criterios de inclusión en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr.

	Criterios de inclusión
PARADIGM-HF **NCT01035255** [491,493,494]	Pecientes > 18 años FEVI ≤ 40%, (≤ 35 a partir del 15 de diciembre de 2010) NYHA clase II-IV BNP ≥ 150 pg/mL o NT-proBNP ≥ 600 pg/mL BNP ≥ 100 pg/mL o NT-proBNP ≥ 400 pg/mL en el caso de hospitalización en el último año Tratamiento, al menos en las 4 semanas previas con: • iECAs o ARA II: dosis estable equivalente a 10 mg/d de enalapril. • β-bloqueante en una dosis estable (a no ser que esté contraindicado)
PARALLEL-HF **NCT02468232** [407,498]	Pacientes Japoneses ≥ 20 años FEVI ≤ 35% NYHA clase II-IV NT-proBNP ≥ 600pg/mL o NTproBNP ≥ 400pg/mL si han sido hospitalizados por IC en el último año En tratamiento en las 4 semanas previas al ensayo con una dosis estable: de iECA/ARA II y/o β-bloqueante (a no ser que esté contraindicado) Debería considerarse el tratamiento con antagonistas de los receptores de mineralocorticoides
TRANSITION **NCT02661217** [499,500]	Pecientes ≥ 18 años FEVI ≤ 40% NYHA clase II-IV PA sistólica ≥ 100 mm Hg Hospitalización debido a IC aguda descompensada Estable en las 24 horas previas a la aleatorización Pecientes en tratamiento (o no) con iECA y ARA II. Sin el uso de vasodilatadores intravenosos (i.v.) (excepto nitratos). Sin uso de fármacos inotrópicos i.v.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.9.: Criterios de inclusión en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr (continuación).

	Criterios de inclusión
PIONEER-HF **NCT02554890** [501,502]	Pacientes ≥ 18 años FEVI ≤ 40% BNP ≥ 400 pg/mL o NT-proBNP ≥ 1600 pg/mL Inclusión entre 1 y 10 días durante la hospitalización debido a IC aguda descompensada En las 6 horas previas a la inclusión: -PA sistólica ≥ 100 mm Hg. -Sin aumento de la dosis de diurético i.v. -Sin el uso de vasodilatadores i.v (incluso nitratos). En las 24 horas previas: -Sin uso de fármacos inotrópicos i.v.
ACTIVITY-HF **NCT02768298** [503]	Pacientes ≥ 18 años FEVI ≤ 40% NYHA clase III VO_2max ≤ 18 mL/min/kg IC crónica Mínimo 4 semanas antes del cribado y hasta la aleatorización los pacientes deben estar en tratamiento con un IECA o ARA II a una dosis estable equivalente a, por lo menos, 10 mg/día enalapril
EVALUATE-HF **NCT02874794** [504]	Pacientes ≥ 50 años FEVI ≤ 40% NYHA clase I-III PA sistólica ≥ 140 mm Hg o PA sistólica > 105 mm Hg si está en tratamiento con antihipertensivos -IC crónica -Diuréticos y medicamentos de base con dosis estables (excepto iECA y ARA II)
AWAKE-HF **NCT02970669** [505]	Pacientes ambulatorios de entre 18-80 años de edad FEVI ≤ 40% NYHA clase II-III Pacientes que vivan en entornos con libertad de movimiento y que permitan programar las actividades diarias, así como los horarios de sueño

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.9.: Criterios de inclusión en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr (continuación).

	Criterios de inclusión
OUTSTEP-HF **NCT02900378** [506,507]	Pacientes ≥ 18 años FEVI ≤ 40% NYHA clase II-IV NT-proBNP ≥ 300 pg/mL, BNP≥100 pg/mL u hospitalización por IC en el último año Pacientes con IC sintomática: • En tratamiento estable para la IC por lo menos en las 4 semanas previas a la fase de selección. • En tratamiento con una dosis de iECA o ARA II equivalente a 2.5 mg/día enalapril • Que vivan en entornos con libertad de movimiento y que permitan programar las actividades diarias y el sueño • Que acepten llevar de manera continuada una pulsera con acelerómetro
Life-HF **NCT02816736** [508,509]	Pacientes de entre 18-85 años de edad FEVI ≤ 35% durante el año previo NYHA clase IV NTproBNP ≥ 800 pg/mL o BNP ≥ 250 pg/mL PA ≥ 90 mm Hg En tratamiento estable para la IC por lo menos en los 3 meses previos Que cumpla uno o más de las siguientes condiciones: • Tratamiento con inotrópicos en los últimos 6 meses • Más de 1 hospitalización por IC en los últimos 6 meses • FEVI ≤ 25% en el último año • VO_2max < 55% previsto o VO_2max ≤ 16 mL/kg/min para hombres y VO_2max ≤ 14 mL/kg/min para mujeres en el último año • C6M < 300 m en los últimos 3 meses
NEPRIExTol-HF **NCT03190304** [510]	Pacientes ≥ 18 años FEVI ≤ 40% NYHA clase II-III BNP > 150 pg/mL o NT-proBNP ≥ 600 pg/mL Etiología isquémica y no isquémica Tratamiento estable con β-bloqueantes y un iECA o ARA II equivalente a 10 mg/día de enalapril

Tabla 1.10.: Protocolo del tratamiento realizado en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr.

	Protocolo del tratamiento
PARADIGM-HF **NCT01035255** [491,493,494]	Período pre-aleatorización simple ciego de enalapril: 10 mg enalapril/12 horas durante 2 semanas o 5 mg enalapril/12 horas en pacientes tratados con ARA II o dosis bajas de iECAs. Si el tratamiento fue bien tolerado después de 1 o 2 se aumentó la dosis a 10 mg enalapril/12 horas. El tratamiento se suspendió un día antes de empezar el tratamiento con SAC/VAL. Período pre-aleatorización simple ciego de SAC/VAL: 100 mg/12 horas de SAC/VAL durante 1 o 2 semanas y posteriormente 200 mg/12 horas de SAC/VAL durante 2-4 semanas. El tratamiento se suspendió un día antes de la aleatorización. Período de tratamiento aleatorizado doble ciego.
PARALLEL-HF **NCT02468232** [407,498]	Antes de empezar el tratamiento realizó un tiempo de lavado de iECA/ARA II de al menos 36 horas. Período pre-aleatorización un ciego: 50 mg/12 horas de SAC/VAL durante 2 semanas Aleatorización doble ciego: Dosis inicial durante 4 semanas: 100 mg/12 horas de SAC/VAL o 5 mg/12 horas de enalapril Dosis diana durante 20 semanas: 200 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril
TRANSITION **NCT02661217** [499,500]	Previo al tratamiento con SAC/VAL se paralizó el tratamiento con ARA II y se realizó un tiempo de lavado de iECA de al menos 36 horas. Dosis inicial: 49/51mg/12 horas de SAC/VAL Dosis diana de 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL durante 10 semanas. En caso de pacientes en tratamiento con dosis bajas de iECA o ARA II, o con insuficiencia hepática o renal moderada se consideró el uso de una dosis inicial de 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL, duplicándola cada 2-4 semanas a 97/103 mg SAC/VAL y posteriormente hasta alcanzar la dosis diana.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.10.: Protocolo del tratamiento realizado en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr (continuación).

	Protocolo del tratamiento
PIONEER-HF NCT02554890 [501,502]	Aleatorización doble ciego (intrahospitalaria). Se administraron 2 dosis del fármaco al grupo enalapril y 2 dosis de placebo al grupo SAC/VAL garantizando un tiempo de lavado de al menos 36 horas. Tras la administración de la tercera dosis del tratamiento se monitoreó la aparición de hipotensión durante 6 horas previas al alta hospitalaria. Ajuste de dosis y seguimiento ambulatorio: En la primera semana se administraron dosis de tratamiento nivel 1 o 2, las siguientes 3 semanas dosis de tratamiento nivel 2 o 3 y en las próximas 4 semanas se administró una dosis de tratamiento nivel 3. • Nivel 1: 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL o 2.5 mg/12 horas de enalapril • Nivel 2: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL o 5 mg/12 horas de enalapril • Nivel 3: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril Tratamiento: se administró una dosis nivel 3 durante 4 semanas.
ACTIVITY-HF NCT02768298 [503]	36 horas antes de empezar se retiró el tratamiento con iECA Dosis inicial: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL o 5 mg/12 horas de enalapril 2 semanas Dosis diana: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril 10 días
EVALUATE-HF NCT02874794 [504]	Paralizar el tratamiento con ARA II y se realizó un tiempo de lavado de iECA de al menos 36 horas. Aleatorización doble ciego. Para garantizar el doble ciego, junto al tratamiento se administró un placebo. • Dosis inicial: 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL o 2.5 mg/12 horas de enalapril 2 semanas • Dosis intermedia: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL 5 mg/12 horas de enalapril 2 semanas • Dosis diana: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril 8 semanas A las 12 semanas, tras un período de lavado de al menos 36 horas, los participantes pasaron al tratamiento de etiqueta abierta con 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL (o 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL si la dosis más alta no fue bien tolerada) durante 2 semanas. A las 14 semanas se ajustó la dosis a la dosis diana del SAC/VAL y se mantuvo hasta finalizar en ensayo 10 semanas después.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.10.: Protocolo del tratamiento realizado en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr (continuación).

	Protocolo del tratamiento
AWAKE-HF **NCT02970669** [505]	Fase inicial: Evaluación durante 2 semanas del tratamiento actual para la IC. Aleatorización doble ciego: Dosis inicial durante 2 semanas (Dosis 1): 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL o 2.5 mg/12 horas de enalapril Dosis intermedia 2 semanas (Dosis 2): 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL o 5 mg/12 horas de enalapril Dosis diana durante 2 semanas (Dosis 3): 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril Junto con los tratamientos se administró placebo para garantizar el doble ciego Fase etiqueta abierta: -Administración inicial partiendo de la dosis 2 de SAC/VAL durante 2 semanas (si completaron la fase del doble ciego con la dosis 1 tienen que empezar la fase de etiqueta abierta con la dosis 1) -Administración de la Dosis diana de SAC/VAL Cada fase estuvo separada por un periodo de lavado de 36 horas.
OUTSTEP-HF **NCT02900378** [506,507]	Antes de empezar el tratamiento se realizó un tiempo de lavado de iECA/ARA II de al menos 36 horas. Los pacientes mantendrán el tratamiento base para la IC y ECV. Fase de aleatorización doble ciego: Dosis inicial durante 2 semanas: 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL o 2.5 mg/12 horas de enalapril Dosis intermedia: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL o placebo o 5 mg/12 horas de enalapril o placebo Dosis diana: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o placebo 10 mg/12 horas de enalapril o placebo Junto con los tratamientos se administró placebo para garantizar el doble ciego.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.10.: Protocolo del tratamiento realizado en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEr (continuación).

	Protocolo del tratamiento
Life-HF **NCT02816736** [508,509]	Aleatorización: Dosis inicial durante 2 semanas: • Sin tratamiento previo con iECA/ARA II o con dosis bajas: dosis nivel 1 • Tratamiento con dosis altas de iECA/ARA II: dosis de nivel 2 Dosis intermedia durante 2 semanas: • Sin tratamiento previo con iECA/ARA II o con dosis bajas: dosis nivel 2 • Tratamiento con dosis altas de iECA/ARA II: dosis nivel 3 Dosis diana: dosis nivel 3 durante 20 semanas • Nivel 1: 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL, 2.5 mg/12 horas de enalapril • Nivel 2: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL, 5 mg/12 horas de enalapril • Nivel 3: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL, 10 mg/12 horas de enalapril Junto con los tratamientos se administró placebo para garantizar el doble ciego.
NEPRIExTol-HF **NCT03190304** [510]	Antes de empezar el tratamiento se realizó un tiempo de lavado de iECA de al menos 36 horas. Aleatorización doble ciego -Dosis inicial: 50 mg/12 horas de SAC/VAL o 5 mg/12 horas de enalapril durante 2 semanas. -Dosis intermedia: 100 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 mg/12 horas de enalapril durante 2 semanas. -Dosis diana: 200 mg/12 horas de SAC/VAL o 20 mg/12 horas de enalapril durante 2 semanas. Los participantes con tratamiento previo de 10 o 20 mg/12 horas de enalapril comenzaron directamente con una dosis de 100 mg/12 horas de SAC/VAL o 10 o 20 mg/12 horas de enalapril.

1.3.6.2.2. Ensayos clínicos del sacubitril/valsartán en pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada

PARAMOUNT (noviembre 2009-enero 2012) [492]: ensayo clínico fase II, prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, grupos paralelos, y con comparador activo, cuyo objetivo era investigar si el tratamiento con SAC/VAL de pacientes con ICFEp generaba una mejora de los niveles de NT-proBNP en comparación al tratamiento con VAL [492]. En noviembre de 2009 comenzó la inclusión de los pacientes que cumplían los criterios descritos en la Tabla 1.11. 301 pacientes fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (149 pacientes) y en el de

VAL (152 pacientes) [492]. Tras un período de pre-aleatorización simple ciego, seguido de un período de aleatorización doble ciego, los pacientes fueron aleatorizados (1:1) en tratamiento con 50 mg/12 horas de SAC/VAL o 40 mg/12 horas de VAL durante 2-4 semanas hasta llegar a la dosis diana de 200 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL durante 36 semanas (12 semanas de estudio principal seguidas de un periodo de ampliación de 24 semanas) (Tabla 1.12.), finalizando en enero del 2012 [492]. El tratamiento con SAC/VAL de pacientes con ICFEp redujo significativamente los niveles de NT-proBNP en comparación con el VAL (resultado primario) [495]. Además, a las 36 semanas de tratamiento, se observó que el SAC/VAL disminuía significativamente el volumen de la AI, y mejoraba la clase NYHA en comparación con el VAL, no observándose diferencias en la puntuación del KCCQ ni en el número de pacientes con hipotensión, hiperpotasemia o disfunción renal entre los grupos (resultados secundarios) [492].

PARAGON-HF (Prospective Comparison of Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor With Angiotensin Receptor Blocker Global Outcomes in HFpEF) (julio 2014-diciembre 2016) [511–513]: ensayo clínico fase III, prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, grupos paralelos, y con comparador activo, cuyo objetivo era investigar la eficacia y seguridad del SAC/VAL en el tratamiento de pacientes con ICFEp en comparación con VAL [511–513]. En julio de 2014 comenzó la inclusión de los pacientes que cumplían con los criterios establecidos (Tabla 1.11.) [511–513]. 4822 pacientes fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (2419 pacientes) y en el de VAL (2403 pacientes) [511–513]. Tras un periodo de pre-aleatorización secuencial simple ciego, comenzó el período aleatorización doble ciego, en el que los pacientes recibieron una dosis diana: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL (Tabla 1.12.) [511–513]. Las evaluaciones se realizaron a las 4, 16, 32 y 48 semanas, y posteriormente se espaciaron cada 12 semanas [511–513]. No se observaron diferencias significativas en el riesgo de muerte por causas CV y hospitalizaciones por IC entre grupos (resultado primario) [511–513]. Por otra parte, el tratamiento con SAC/VAL de pacientes con ICFE provocó mejoras en la clase NYHA y el KCCQ, y redujo el empeoramiento de la función renal y las muertes debido a cualquier causa (resultados secundarios) [511–513].

PARABLE (abril 2015-junio 2021) [514]: es un ensayo clínico fase II, prospectivo, aleatorizado, doble ciego, doble simulación y con comparador activo, cuyo objetivo era evaluar mediante resonancia magnética cardíaca la capacidad del SAC/VAL para reducir el índice de volumen de la AI en pacientes con pre-ICFEp en comparación al VAL [514]. 250 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.11.) y aceptaron participar en el ensayo fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (122 pacientes) y en el de tratamiento con VAL (128 pacientes) [514]. El protocolo del tratamiento, que aparece ampliamente detallado en la tabla 1.12., consiste en la administración durante 2-4 semanas con una dosis de 49 mg/51 mg/12 horas de SAC/VAL al día o 80 mg/12 horas de VAL y posteriormente se incrementaron las dosis de tratamiento a 97 mg/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL durante 78 semanas [514]. Los resultados obtenidos demostraron

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

que el tratamiento con SAC/VAL aumentó el índice del volumen de la AI máximo en comparación con el VAL (resultado primario) [514]. Además, en cuanto a los resultados secundarios, en el grupo tratado con SAC/VAL se observó un menor cambio en los niveles de NT-proBNP y en la presión del pulso; una reducción del índice de rigidez diastólica de la AI y del VI, de la rigidez arterial y de la resistencia vascular sistémica, y una mejora de los indicadores de riesgo CV en comparación con los pacientes tratados con VAL [514].

PARALLAX (agosto 2017-octubre 2019) [515,516]: es un ensayo clínico fase III, prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, grupos paralelos, y con comparador activo o placebo, con la finalidad de evaluar si el tratamiento con SAC/VAL mejora los niveles de NT-proBNP, la capacidad al ejercicio físico, la calidad de vida y la carga sintomática de pacientes con ICFEp en comparación con la terapia estándar de las comorbilidades [515,516]. Para ello, los 2566 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (Tabla 1.11.) fueron aleatorizados en los diferentes grupos de tratamiento en función del tratamiento previo o no con inhibidores del SRAA (Tabla 1.11.) [515,516]. Las dosis iniciales de SAC/VAL o de los comparadores enalapril y VAL variaron en función del tratamiento previo con inhibidores del SRAA, y esta se fue incrementando cada 2 semanas hasta alcanzar las dosis diana: 97 mg/103 mg/12 horas de SAC/VAL, 10 mg/12 horas de enalapril, 160 mg/12 horas de VAL, que se administró durante 24 semanas con evaluaciones cada 4 semanas (Tabla 1.12.) [515,516]. El tratamiento con SAC/VAL redujo significativamente los niveles de NT-proBNP *vs.* su comparador activo a las 12 semanas; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la prueba de la C6M entre los grupos a las 24 semanas en comparación con el inicio del estudio (resultados primarios) [515,516]. Además, el SAC/VAL disminuyó significativamente la tasa de cambio mensual de la TFGe en comparación con los otros comparadores activos a las 24 semanas, aunque no se observaron diferencias entre los diferentes grupos en el KCQQ ni en la clase NYHA en comparación con los datos base [515,516].

PARAGLIDE-HF (junio 2019-diciembre 2022) [517,518]: 20 meses de tratamiento con un seguimiento de al menos 8 semanas del último paciente aleatorizado aleatorizado, multicéntrico, doble ciego y con comparador activo, en el que se evaluó el SAC/VAL en comparación con el VAL solo en pacientes con FE > 40% tras un evento reciente de empeoramiento de la IC [517,518]. Los 466 que cumplieron con los criterios de inclusión (Tabla 1.11.) y que quisieron participar en el ensayo clínico fueron aleatorizados 1:1 en el grupo de tratamiento con SAC/VAL (233 pacientes) y en el de VAL (233 pacientes) [517,518]. Como aparece descrito en la Tabla 1.12., al inicio del tratamiento se realizó un ajuste de la dosis inicial de los tratamientos hasta alcanzar las dosis diana de 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL [517,518]. El tratamiento tuvo una duración de 20 meses, con un seguimiento de al menos 8 semanas del último paciente aleatorizado [517,518]. Los resultados demostraron que el tratamiento con SAC/VAL redujo significativamente la concentración de NT-proBNP *vs.* VAL solo desde la primera semana de tratamiento (resultado primario) [517,518]. Además, entre los resultados secundarios obtenidos, se observó que el SAC/VAL

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

disminuyó significativamente el número total de eventos, la muerte por causas CVs, las visitas a urgencias y las hospitalizaciones por IC, mejorando significativamente la función renal, aunque incrementando la hipotensión sintomática en comparación con el VAL solo [517,518].

Tabla 1.11.: Criterios de inclusión en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEp.

	Criterios de inclusión
PARAMOUNT NCT00887588 [492]	Pecientes > 40 años FEVI ≥ 45% NYHA clase II-III NT-proBNP > 400 pg/mL PA < 140 mm Hg o <160 mm Hg si en la aleatorización toma 3 o más medicamentos para la PA Historial de IC con síntomas y signos Tratamiento con diuréticos TFGe ≥ 30 ml/min/1.73 m² Potasio < 5.2 mmol/L
PARAGON-HF NCT01920711 [511-513]	Pecientes ≥ 50 años FEVI ≥ 45% en los 6 meses previos a la fase de selección NYHA clase II-IV NT-proBNP > 300 pg/mL o > 200 pg/mL si fue hospitalizado en los últimos 9 meses. Estos valores se triplicaron si en la fase de selección el paciente presentaba fibrilación auricular Deterioro de la estructura cardíaca Tratamiento con diuréticos al menos un mes antes de la fase de selección
PARABLE NCT04687111 [514]	Pacientes ≥ 40 años con historial de hipertensión sistémica (medicada durante más de 1 mes) y/o DMT2. 20 pg/mL ≤ BNP ≤ 280 pg/mL o 100 pg/mL ≤ NTproBNP ≤ 1.000 pg/mL en los 6 meses previos o en el momento del cribado Índice del volumen de la AI > 28 mL/m^2 en los 6 meses anteriores o en el momento del cribado
PARALLAX NCT03066804 [515,516]	Pacientes ≥ 45 años FEVI ≥ 45%, (≥ 40 % a partir de septiembre de 2018 para cerrar la brecha existente entre los ensayos PARADIG-HF y PARAGON-HF). NYHA clase II-IV NT-proBNP > 220 pg/mL o > 600 pg/mL en pacientes con fibrilación o aleteo auriculares en la selección. IC sintomática Deterioro de la estructura cardíaca en los 6 meses previos a la aleatorización KCCQ < 75 Tratamiento con diuréticos al menos 30 días antes de la selección

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.11.: Criterios de inclusión en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEp (continuación).

	Criterios de inclusión
PARAGLIDE-HF NCT03988634 [517,518]	Pacientes ≥ 18 años FEVI ≥ 40% NT-proBNP ≥ 500 pg/mL o BNP ≥ 150 pg/mL en pacientes con fibrilación auricular Pacientes hospitalizados por empeoramiento de la IC o 30 días después de un episodio de empeoramiento de la IC. En las 6 horas previas a la inclusión: • PA ≥ 100 mm Hg • Sin aumento de la dosis de los diuréticos i.v. • Sin uso de vasodilatadores i.v. (incluidos nitratos) En las 24 horas previas a la inclusión: • Sin uso de fármacos inotrópicos i.v. • Sin uso de iECAS en las 36 horas previas a la aleatorización

Tabla 1.12.: Protocolo del tratamiento realizado en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEp.

	Protocolo del tratamiento
PARAMOUNT NCT00887588 [492]	Periodo de pre-aleatorización simple ciego: Durante 2 semanas a los pacientes elegibles se les administró placebo junto con su tratamiento base. 1 día antes a la aleatorización se paralizó el tratamiento con iECA/ARA II Periodo de aleatorización doble ciego: dosis inicial de 50 mg/12 horas de SAC/VAL o 40 mg/12 horas de VAL la cual se fue incrementando hasta alcanzar la dosis diana 200 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL, la cual se administró durante 2-4 semanas. El diseño de doble simulación se prolongó hasta un total de 36 semanas.
PARAGON-HF NCT01920711 [511-513]	Periodo de pre-aleatorización secuencial simple ciego: Se comenzó con la administración de 40 mg o 80 mg/12 horas de VAL durante 1 o 2 semanas. A los pacientes que presentaron una buena tolerancia se les administró 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL durante 2-4 semanas y los que toleraron bien esta dosis fueron elegidos para la aleatorización. Periodo de aleatorización doble ciego: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.12.: Protocolo del tratamiento realizado en los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con SAC/VAL en pacientes adultos con ICFEp (continuación).

	Protocolo del tratamiento
PARABLE **NCT04687111** [514]	Período de lavado de 36 horas (si los participantes tomaban previamente un iECA) Período de tratamiento aleatorizado doble ciego y doble simulación: los pacientes fueron tratados durante 2-4 semanas con una dosis de 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL al día o 80 mg/12 horas de VAL y posteriormente se incrementaron las dosis de tratamiento hasta alcanzar la dosis diana de 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas VAL durante 78 semanas.
PARALLAX **NCT03066804** [515,516]	Ajuste de la dosis inicial: Pacientes sin tratamiento con inhibidores del SRAA o dosis bajas: 24/25 mg/12 horas de SAC/VAL o comparador en función del tratamiento previo: • iECA: 2.5 mg/12 horas de enalapril • ARA II: 80 mg/12 horas de VAL • Sin inhibidor del SRAA: Placebo Pacientes con dosis elevadas de inhibidores del SRAA: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL o comparador en función del tratamiento base: • iECA: 5 mg/12 horas de enalapril • ARA II: 80 mg/12 horas de VAL Las dosis se duplicaron cada 2 semanas hasta alcanzar las dosis diana: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL, 10 mg/12 horas de enalapril, 160 mg/12 horas de VAL o placebo
PARAGLIDE-HF **NCT03988634** [517,518]	Tiempo de lavado de iECA de al menos 36 horas. Ajuste de la dosis inicial: • Pacientes sin tratamiento con iECA/ARA II o dosis bajas y pacientes con 20 < TFGe <30 mL/min/1.73 m^2: 24/26 mg/12 horas de SAC/VAL o 40 mg/12 horas de VAL • Pacientes en tratamiento con dosis elevadas de iECA/ARA II: 49/51 mg/12 horas de SAC/VAL o 80 mg/12 horas de VAL Dosis diana: 97/103 mg/12 horas de SAC/VAL o 160 mg/12 horas de VAL

Aunque los resultados obtenidos al evaluar los efectos del tratamiento con SAC/VAL en pacientes con ICFEp no fueron tan beneficiosos como en pacientes con ICFEr, debido a la ausencia de tratamientos eficaces para la ICFEp, en febrero de 2021 la FDA aprobó el uso del SAC/VAL para el tratamiento de todos los pacientes adultos con IC crónica y, en las Guías para el manejo de la IC publicadas en el 2022, se recomienda su uso en ICFElr y en la ICFEp para reducir el riesgo de hospitalización por IC [309,484].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.6.3. Sacubitril/valsartán en el sistema cardiovascular

1.3.6.3.1. Sacubitril/valsartán y remodelado cardíaco

Un metaanálisis de los estudios llevados a cabo entre los años 2010 y 2019, demostró que los pacientes con ICFEr tratados con SAC/VAL presentan mejoras en los índices de remodelado cardíaco inverso (cambios en el tamaño, volumen y FE del VI) en comparación al tratamiento con iECAS y ARA II [519]. Por ejemplo, los resultados obtenidos en el ensayo clínico PROVE-HF (NCT02887183), indicaron que el tratamiento con SAC/VAL llevó a un incremento de aproximadamente el 10 % en la FEVI, y a una reducción de los LVEDV y LVESV corregidos por el área de superficie corporal en pacientes adultos con ICFEr, procesos que parecen estar relacionados con la reducción de los niveles plasmáticos de NT-proBNP [520]. Sin embargo, estos efectos beneficiosos del SAC/VAL parecen estar limitados e los pacientes con ICFEr, ya que no se observaron cambios en los índices de remodelado cardíaco, a excepción del índice de la masa del VI y el volumen de la AI, en los en pacientes con ICFEp [492].

1.3.6.3.2. Sacubitril/valsartán, fibrosis e hipertrofia cardíaca

La fibrosis y la hipertrofia cardíaca son procesos de gran relevancia implicados en la fisiopatología de la ICFEp [521]. Los efectos antifibróticos del SAC/VAL han sido comprobados en una gran variedad de modelos animales de obesidad, cardiomiopatía diabética, IM, e IC [521–525]. Recientemente se ha propuesto que la reducción de la fibrosis cardíaca por acción del SAC/VAL se debe a la inhibición de la vía de señalización TGF-β/Smad [521,526,527]. Además, Liu y col. (2021) [528], propusieron que el SAC/VAL reduce la fibrosis y el remodelado cardíaco post IM mediante la inhibición de la vía de señalización Wnt/β-catenina [528,529]. En un subestudio del ensayo clínico PARADIGM-HF se evaluó el efecto del tratamiento con SAC/VAL en los niveles séricos de los biomarcadores profibróticos aldosterona, ST2 soluble (sST2, *soluble ST2*), inhibidor tisular de las metaloproteinasas de matriz (TIMP-1, *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*), galectina-3 (Gal-3, *galactin-3*), PINP, y propéptido N-terminal de procolágeno tipo III (PIIINP, *N-terminal propeptide of collagen III*), así como de los biomarcadores implicados en la degradación del colágeno como la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2, *matrix metalloproteinase 2*) y la metaloproteinasa de matriz (MMP-9, *matrix metalloproteinase 9*), en pacientes con ICFEr [530]. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del SAC/VAL para reducir los niveles séricos de aldosterona, sST2, TIMP-1, MMP-9, PINP, and PIIINP tras 8 meses de tratamiento en comparación con el enalapril, lo que sugiere que sus efectos cardioprotectores pueden estar relacionados con la capacidad para reducir la fibrosis cardíaca [530,531]. Además, la reducción de la fibrosis tras el tratamiento *in vivo* con SAC/VAL también se observó en el sistema renal de diversos modelos animales [532–534].

El tratamiento con SAC/VAL también demostró ser capaz de disminuir la hipertrofia cardíaca en diversos modelos *in vivo* de obesidad, HTA, IM, IC, ERC, etc. [521,523,524,535–539]. Shi y col. (2023) [521], demostraron que la reducción de la hipertrofia cardíaca en un modelo animal de ICFEp está relacionada con la inhibición de la vía de señalización celular fosfatidilinositol-3–quinasa (PI3K, *phosphoinositide 3-*

kinase)/proteína quinasa B (AKT, *protein kinase B*) (PI3K/AKT) y, por lo tanto, con la activación de la proteína glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β, *glycogen synthase kinase-3 beta*), implicada en la inhibición de vías de señalización que participan en el desarrollo de la hipertrofia. Sin embargo, este no es el único mecanismo que se ha planteado. Peng y col. (2020) [540] propusieron que el efecto antihipertrófico del SAC/VAL en un modelo animal de IC inducida por sobrecarga de presión se debe a su capacidad para incrementar la fosforilación de AMPK, lo que, a su vez, regula la vía de señalización de la sirtuina 3 desacetilasa dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) (Sirt3, *Sirtuin-3 mitochondrial NAD-dependent deacetylase*)/ superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD, *manganese-dependent superoxide dismutase*) (Sirt3/MnSOD), llevando a un descenso del estrés oxidativo y de la sobrecarga de presión, lo que se traduce en una menor hipertrofia cardíaca. Por otra parte, Tam y col. (2020) [541] observaron que la vía de señalización PN-GMPc-PKG parece no estar implicada en el proceso de disminución de la hipertrofia cardíaca inducido por el tratamiento con SAC/VAL.

1.3.6.3.3. Sacubitril/valsartán y cardiotoxicidad producida por agentes quimioterapéuticos

Al igual que el tratamiento con EMPA, el SAC/VAL es capaz de mejorar y/o revertir los efectos cardiotóxicos (estrés oxidativo, apoptosis, fibrosis, etc.) de ciertos agentes quimioterapéuticos como la DOXO, tanto *in vivo* como *in vitro* [542–546]. Un estudio realizado en pacientes oncológicos que desarrollaron ICFEr debido a los efectos nocivos de la terapia contra el cáncer de mama, demostró que el tratamiento con SAC/VAL fue capaz de reducir significativamente los niveles de NT-proBNP y de mejorar la clase NYHA, los resultados de la prueba de la C6M, la DD, el diámetro interno del VI (LVID) durante la diástole y la regurgitación de la válvula mitral [547]. Liu y col. (2022) [544] propusieron que los efectos beneficiosos del SAC/VAL frente a la cardiotoxicidad inducida por la DOXO se deben a la activación de la vía de señalización de AKT, que a su vez activa la ruta Sirt3/MnSOD que, además de estar implicada en la reducción de la hipertrofia cardíaca, también es capaz de reducir el estrés oxidativo. Además, en un modelo murino de cardiomiopatía dilatada debida al tratamiento con DOXO, se observó que el tratamiento con SAC/VAL provocaba un descenso de los niveles de expresión de la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp-1, *dynamin-1-like protein*), lo que se traducía en una mejora de la función mitocondrial y de la producción de energía [546].

1.3.6.3.4. Sacubitril/valsartán, estrés oxidativo, inflamación y apoptosis

Los resultados obtenidos en estudios realizados en modelos animales de ECVs demostraron la capacidad del tratamiento con SAC/VAL para regular los niveles de expresión de la NOS inducible y endotelial, reducir los biomarcadores de apoptosis, inflamación y estrés oxidativo, y mejorar la OXPHOS mitocondrial [521,524,529]. Mohany y col. (2022) [548] demostraron que el tratamiento de un modelo animal de enfermedad renal diabética con SAC/VAL disminuía los niveles circulantes de los biomarcadores proinflamatorios TNF-α, IL-1β, IL-6, y NF-κB, e incrementaba los niveles del biomarcador antiinflamatorio IL-10. Además, el SAC/VAL atenuaba la

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

expresión de factores pro-apoptóticos como la caspasa-3 y Bax, al mismo tiempo que estimulaba la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-2 en el tejido renal [548].

1.3.6.3.5. Sacubitril/valsartán y metabolismo energético

Previamente se han descrito los efectos beneficiosos del SAC/VAL en la regulación de la homeostasis de la glucosa [548–550]. El tratamiento con SAC/VAL de pacientes diabéticos incluidos en los ensayos clínicos PARADIGM-HF y PARAGON-HF redujo significativamente los niveles plasmáticos de HbA1c, independientemente del valor de la FEVI [549,551]. Además, el tratamiento de pacientes obesos e hipertensos con SAC/VAL mejoró el control glucémico y produjo un aumento de la movilización de lípidos del TAS [550].

Debido al limitado conocimiento de los efectos del SAC/VAL en el metabolismo cardíaco, profundizar en el estudio de este tema es un objetivo fundamental para llegar a comprender nuevos mecanismos en el tratamiento de la ICFEp.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

2.1. Estudiar los efectos metabólicos del tratamiento con empagliflozina *in vivo* en un modelo animal de obesidad y diabetes.

2.1.1. Evaluar el impacto de un tratamiento con empagliflozina en el lipidoma del tejido adiposo visceral y subcutáneo.

2.1.2. Estudiar el impacto de un tratamiento con empagliflozina en la hipertrofia de los adipocitos.

2.1.3. Evaluar el impacto de un tratamiento con empagliflozina en la expresión génica de diferentes biomarcadores de inflamación, metabolismo lipídico, fibrosis y función mitocondrial del tejido adiposo visceral y subcutáneo.

2.2. Estudiar los efectos metabólicos del tratamiento con sacubitril/valsartán *in vitro*.

2.2.1. Evaluar el papel del sacubitril/valsartán en la viabilidad cardiomiocitaria.

2.2.2. Estudiar el papel del sacubitril/valsartán en la regulación del metabolismo cardiomiocitario, estudiando la captación de ácidos grasos, la traslocación del receptor de glucosa GLUT4.

2.2.3. Estudiar el efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre los procesos de autofagia en cardiomiocitos neonatales de rata.

2.3. Estudiar los efectos del tratamiento con sacubitril/valsartán *in vivo* en un modelo animal de obesidad asociada a insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada.

2.3.1. Evaluar los efectos del tratamiento con sacubitril/valsartán en diferentes parámetros metabólicos y morfométricos.

2.3.2. Estudiar los efectos del tratamiento con sacubitril/valsartán en la función cardíaca.

2.3.3. Analizar los efectos del tratamiento con sacubitril/valsartán en test de fuerza y tolerancia al ejercicio.

2.3.4. Analizar los efectos del tratamiento con sacubitril/valsartán en la hipertrofia y fibrosis cardíacas y en la esteatosis hepática.

2.3.5. Evaluar los efectos del tratamiento con sacubitril/valsartán en la respiración mitocondrial en tejidos cardíaco y hepático.

2.3.6. Aclarar el impacto del sacubitril/valsartán en el metaboloma completo del ventrículo izquierdo cardíaco.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados pertenecen a Sigma-Aldrich (USA) excepto que se indique lo contrario.

3.1. ÉTICA

En los procedimientos experimentales *in vivo* se utilizó el número mínimo de animales necesario para desarrollar nuestros objetivos y asegurar una potencia estadística pertinente.

3.1.1. Tratamiento *in vivo* con empagliflozina

Los procedimientos experimentales *in vivo* con ratas Zucker diabéticas y obesas (ZDF, Zucker diabetic fatty) se realizaron en las instalaciones del animalario Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de Santiago de Compostela (CiMUS, ESP) (número de registro ES150780275701) de acuerdo con las guías ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*) [552], las guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, *National Institute of Health*, USA) y el Consejo Nacional de Investigación (NRC, *National Research Council*, USA) [553], los principios de la Declaración de Helsinki, las regulaciones del Comité Bioético de la Universidad de Santiago de Compostela (USC, ESP) y las directrices de la directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo para Experimentación Animal. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (2016/346, número de procedimiento: 15010/18/002), y se llevó a cabo cumpliendo la normativa legal vigente de experimentación animal, y según la Ley 32/2007 del 7 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, así como el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

3.1.2. Tratamiento *in vivo* con sacubitril/valsartán

Los procedimientos experimentales *in vivo* con ratas Zucker obesas y espontáneamente hipertensas (ZSF1, Zucker Fatty and Spontaneously Hypertensive) se realizaron en las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oporto (FMUP, PRT), de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los NIH y el NRC [553]. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de la FMUP, el comité de bienestar animal (*Orgão de Bem-Estar e Ética Animal*), y la *Direçao-General de Alimentaçao e Veterinária* portuguesa (8161/23S). La FMUP es una entidad autorizada por el gobierno portugués para realizar experimentos con animales.

3.1.3. Tratamiento *in vitro* con sacubitril/valsartán

Los procedimientos experimentales *in vitro* con neonatos de ratas ratas Sprague-Dawley se realizaron en el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA, ESP) de la USC y el Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS, ESP) de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada

por los NIH y el NRC [553]. Los protocolos del estudio fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (números de procedimientos:15005/16/004 y 15011/2022/009), y se llevaron a cabo cumpliendo la normativa legal vigente de experimentación animal, y según la Ley 32/2007 del 7 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, así como el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

3.2. ANIMALES

3.2.1. Ratas ZDF

El TAV y TAS objeto de estudio de esta tesis doctoral fue obtenido de un procedimiento experimental previamente realizado en nuestro laboratorio en ratas macho adultas ZDF [307,308]. Las ratas ZDF padecen hiperfagia debido a una mutación en el gen del receptor de leptina (fa) (ZDF-Lepr$^{fa/fa}$), lo que conduce al desarrollo de RI, hiperglucemia e hipertensión que, junto con una dieta hipercalórica, provoca el desarrollo espontáneo de DMT2 a las 10-12 semanas de edad [554–556]. El incremento de la RI y del estrés oxidativo se relaciona con otras alteraciones metabólicas, como la hiperlipidemia o la hipercolesterolemia, debido a una pérdida de la flexibilidad metabólica, que lleva a un desequilibrio entre la acumulación y la oxidación de los lípidos [308,556,557].

Brevemente, ratas macho ZDF de 7 semanas de edad con un peso comprendido entre 200 y 250 g, procedentes de Charles River Laboratories (USA), fueron alojadas individualmente en jaulas bajo condiciones controladas de temperatura ambiente (t.a.) (22 ± 2 ºC), humedad relativa (40 ± 5%) e iluminación (ciclos luz/oscuridad de 12 horas) en el Animalario del CiMUS. Los animales tuvieron acceso continuo a la dieta especial para roedores Formulab 5008 (4.15 kCal/g; 23.00% de proteínas, 6.50% de grasa, 4.00% de fibra, 12.00% de humedad y 8.00% de cenizas) (LabDiet, USA) para conseguir el desarrollo de la DMT2.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron eutanasiados mediante decapitación, y los TAV y TAS fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su posterior análisis.

3.2.2. Ratas ZSF1

Para la evaluación de los efectos del tratamiento con SAC/VAL *in vivo* se emplearon ratas macho ZSF1-obesas y ZSF1-no obesas de 9 semanas de edad con un peso comprendido entre 250 y 550 g, procedentes de Charles River Laboratories (USA).

Este modelo animal, que presenta diferentes mutaciones en el receptor de leptina (fa y facp), se estableció al cruzar ratas hembra ZDF con ratas macho con hipertensión espontánea e IC (SHHF, *Spontaneously Hypertensive Heart Failure*) [524,558,559]. Las crías homocigotas para ambas mutaciones de leptina se denominan ZSF1-obesas, y desarrollan hiperglucemia, RI e hipertensión leve [558,560]. Estos animales representan

USC DE COMPOSTELA

un modelo bien establecido de SMet que, a las 20 semanas, desarrolla el fenotipo característico de la ICFEp junto con diferentes comorbilidades, como intolerancia al ejercicio, contractilidad reducida del músculo esquelético, ERC, función endotelial dañada, etc. [524,558,561,562]. Las ratas ZSF1-no obesas son heterocigotas para ambas mutaciones y, a pesar de presentar hipertensión, no desarrollan obesidad, DMT2 ni el fenotipo de ICFEp; por este motivo se han establecido como control de las ratas ZSF1-obesas, y eso permite estudiar el papel de la obesidad en el desarrollo de la ICFEp [562,563].

Los animales fueron alimentados *ad libitum* con la dieta especial hipercalórica para roedores Formulab 5008 (4.15 kCal/g; 23.00 % de proteínas, 6.50 % de grasa, 4.00 % de fibra, 12.00 % de humedad y 8.00 % de cenizas) (LabDiet, USA). Las ratas se alojaron en grupos de 2 por jaula bajo condiciones controladas de t.a. (22 ± 2 ºC), humedad relativa (30-70 %), tasa de renovación de aire (40-50 renovaciones de aire/hora) e iluminación (ciclos luz/oscuridad invertidos de 12 horas, luces apagadas a las 08:00 horas y luces encendidas a las 20:00 horas) en el Animalario de la FMUP (PRT). Durante todo el procedimiento, se realizó una comprobación rutinaria del estado de los animales, de la ingesta de agua y de comida, y del peso corporal, para asegurar su bienestar.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron eutanasiados bajo anestesia inhalatoria con sevoflurano (8%) (AbbVie, USA) por exanguinación. A continuación, los órganos fueron recogidos, pesados, congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su posterior análisis. Debido a las diferencias entre el peso corporal de los animales, el peso de los órganos se normalizó usando la longitud de la tibia (LT) [564].

3.2.3. Neonatos de rata Sprague-Dawley

El cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata se realizó a partir de los corazones de neonatos de 24-48 horas de edad de ratas Sprague-Dawley, suministrados por el CEBEGA de la USC. Los neonatos de rata se colocaron en una placa de Petri en posición decúbito supino con ayuda de unas pinzas planas y fueron sacrificados por decapitación empleando unas tijeras quirúrgicas (Fig. 3.1.).

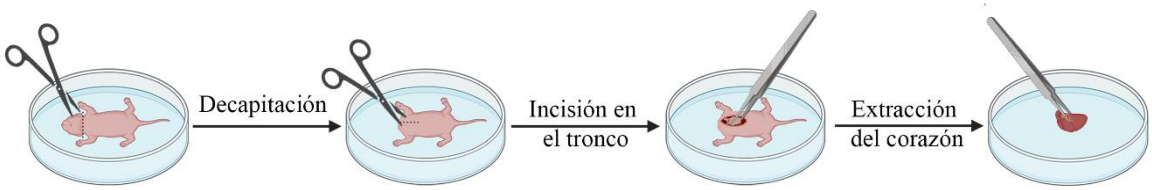


Figura 3.1.: Extracción de los corazones de neonatos de 24-48 horas de edad de ratas Sprague-Dawley para posterior cultivo primario de cardiomiocitos neonatales. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

A continuación, se realizó una pequeña incisión hacia el lado izquierdo del esternón (evitando cortar la zona abdominal) y, con ayuda de las tijeras, se ejerció presión a ambos lados de la incisión para facilitar la extracción del corazón (Fig. 3.1.).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los corazones extraídos se utilizaron para realizar los cultivos primarios de cardiomiocitos (descripción en el siguiente apartado).

3.3. CULTIVOS CELULARES

3.3.1. Línea celular HL-1: cardiomiocitos auriculares adultos de ratón

La línea celular murina HL-1 de cardiomiocitos auriculares de ratón fue donada por el Dr. William C. Claycomb (Lousiana S.U., Medical Centre, New Orleans, USA), y por el Dr. David Sanz Rosa (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, ESP). Esta línea celular, obtenida a partir de la línea tumoral de cardiomiocitos auriculares procedentes de ratones adultos C57BL/6 AT1, ha sido caracterizada mediante diferentes técnicas (microscopía, inmunohistoquímica, etc.) [565,566].

Las células HL-1 se dividen de forma continua, presentan sarcómeros altamente organizados que les confieren la capacidad de contraerse, y mantienen el fenotipo característico de los cardiomiocitos adultos, incluyendo la expresión de la cadena pesada de la α-miosina, de la α-actina y de la conexina 43 cardíacas [565,566]. Es por estos motivos que se ha establecido la línea celular HL-1 como un modelo adecuado para evaluar el funcionamiento cardiomiocitario a nivel celular y molecular [566].

El cultivo de la línea celular HL-1 se realizó en condiciones de esterilidad en flask de 75 cm^2 cuya superficie de cultivo fue pretratada con una MEC (1% de fibronectina disuelta en gelatina al 0.02% (BD, USA)) durante 24 horas. Las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm^2 empleando el medio Claycomb suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-Glutamina y se incubaron a 37 ºC y 5% CO_2. El medio de cultivo fue renovado cada 24 horas. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente el 90% se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con búffer fosfato salino (PBS; 8.00 g/L de NaCl, 0.20 g/L de KCl, 1.44 g/L de Na_2HPO_4 y 0.24 g/L de KH_2PO_4, pH 7.4) 1X, y las células fueron incubadas con tripsina-ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) (Lonza, CHE) durante 5 minutos a 37 ºC y 5% CO_2. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación, y tras comprobar que no quedan células adheridas a la superficie del flask, se inactivó la acción de la tripsina añadiendo medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de FBS, y la suspensión celular resultante se centrifugó a 2.000 xg durante 5 minutos a t.a. El pellet celular obtenido tras la centrifugación se resuspendió en medio de cultivo Claycomb y se realizó un pase en una proporción 1:3.

Previamente al uso del cultivo celular para evaluar los efectos *in vitro* del LBQ657+VAL, se realizó una deprivación de suero empleando medio DMEM, y/o se mantuvo el cultivo en condiciones normales durante un período de 16 horas.

3.3.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata

El cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata se realizó a partir de los corazones de neonatos de 24-48 horas de edad de ratas Sprague-Dawley. Este cultivo celular es un modelo ampliamente empleado en el estudio de diferentes cardiopatías *in*

USC DE COMPOSTELA

vitro, ya que se trata de una población homogénea de cardiomiocitos que, tras la siembra, mantienen su capacidad contráctil y son capaces de dividirse un número muy limitado de veces antes de entrar en estado postmitótico [567–569].

Todo el procedimiento se realizó manteniendo las condiciones de esterilidad. Los corazones se pasaron a una placa Petri limpia con ayuda de unas pinzas de punta fina, y se trocearon rápidamente en 3 o 4 porciones de tamaño similar para asegurar un rendimiento adecuado. Los trozos de corazón se mantuvieron en una solución tamponada ADS (6.80 g/L de NaCl, 4.76 g/L de HEPES, 0.12 g/L de NaH_2PO_4, 1.00 g/L de glucosa, 0.40 g/L de KCl, 0.1 g/L de $MgSO_4$ y 0.02 g/L de rojo fenol) a pH 7.4 y 37 ºC hasta su digestión. Se realizaron un total de 5 digestiones enzimáticas para conseguir la adecuada degradación del tejido cardíaco. Para ello, los trozos de corazón se pasaron a una mezcla enzimática (ME) compuesta de 80 U/mL de Colagenasa tipo II (Worthington, USA) y 0.6 mg/mL de Pancreatina disueltas en solución tamponada ADS. El volumen de ME empleado varía en función del número de corazones disponibles al realizar el cultivo, empleándose la proporción de 6 mL ME/14 corazones en cada una de las digestiones. Todas las digestiones se realizaron con la ayuda de un agitador orbital a 100 revoluciones por minuto (rpm) y a una temperatura de 37 °C. La primera digestión enzimática del tejido se realizó durante 30 minutos y fue descartada, mientras que las 4 siguientes tuvieron una duración de 15 minutos; al finalizar se añadió 1 mL de suero de ternero recién nacido (NCS, *Newborn Calf Serum*) para inactivar la ME y se realizó una centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos a t.a. El sobrenadante de cada digestión se desechó por decantación, y el pellet celular obtenido fue resuspendido en 2 mL de NCS e incubado en un flask de 25 cm^2 de superficie a 37 ºC y 5% CO_2 hasta finalizar todas las digestiones. Tras la incubación, el contenido celular de los flasks se recolectó en un único tubo y se centrifugó a 1.500 rpm, 5 minutos a t.a. El sobrenadante se desechó mediante decantación, y el pellet celular obtenido fue resuspendido en un volumen determinado de Plating Media (66.0% de DMEM 4.5 g/L glucosa (Lonza, CHE), 17.0% de M199 (*Medium 199*), 10% de FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), 5% de NCS, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-Glutamina) en función del número de corazones obtenidos y del tamaño del pellet celular obtenido (por ejemplo, en el caso de 20-30 corazones se necesitan 4 mL de Plating Media). Una vez resuspendidas, las células fueron sembradas de manera diferencial sobre una placa Petri, y fueron incubadas a 37 ºC y 5% CO_2 durante 2-3 horas consiguiendo incrementar la pureza del cultivo, ya que los fibroblastos son capaces de pegarse a la superficie de la placa, y esto permite separarlos de los cardiomiocitos que permanecen en suspensión. Una vez terminada la incubación, la suspensión de cardiomiocitos se pasa a un tubo de centrífuga y se centrifuga a 1.500 rpm, 5 minutos a t.a. El sobrenadante se desechó por decantación, y el pellet celular obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de Plating Media suplementado con arabinósido de citosina (AraC) (farmacia hospitalaria) a una concentración final de 10 μM para impedir el crecimiento de los fibroblastos. Los cardiomiocitos obtenidos se sembraron a una densidad celular de 50.000 células/cm^2 en placas para cultivo pretratadas con MEC durante 24 horas y se incubaron a 37 ºC y 5% CO_2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A las 24 horas, cuando los cardiomiocitos ya se han adheridos a la superficie de la placa, se realizaron lavados del cultivo empleando medio DMEM suplementado con 10% de FBS, con especial cuidado para no arrastrar las células. Posteriormente se renovó el medio el medio de cultivo (Plating Media suplementado con Ara C).

Previo al uso del cultivo celular para evaluar los efectos *in vitro* del LBQ657 + VAL, se realizó una deprivación de suero empleando medio DMEM, y/o se mantuvo el cultivo en condiciones normales durante un período de 16 horas.

3.4. TRATAMIENTOS CON LOS MEDICAMENTOS OBJETO DE ESTUDIO

3.4.1. Tratamiento *in vivo* con empagliflozina de ratas ZDF

La EMPA objeto de estudio fue proporcionada por Boehringer Ingelheim (DEU). El tratamiento de las ratas ZDF fue realizado previamente en nuestro laboratorio [307,308]. Brevemente, cuando los animales alcanzaron niveles de glucosa en sangre en ayunas de 350.75 ± 18.59 mg/dL (12 semanas de edad), fueron tratados con 30 mg/kg/día/p.o. de EMPA disuelta en el agua de bebida durante 6 semanas. Las ratas fueron divididas de manera aleatoria en 2 grupos: control (vehículo, agua mineral de bebida, n = 17) y EMPA (n=17) [307,308]. El tamaño del grupo se refiere a individuos independientes, y fue definido asegurando la potencia estadística necesaria y el correcto análisis estadístico.

3.4.2. Tratamiento *in vivo* con sacubitril/valsartán de ratas ZSF1

El SAC/VAL objeto de estudio de esta tesis doctoral fue proporcionado por Novartis Pharma AG (CHE). Para el tratamiento *in vivo* de ratas ZSF1, el SAC/VAL se administró a una dosis de 68 mg/kg/día/p.o. en el agua de bebida durante 9 semanas cuando las ratas alcanzaron las 14 semanas de edad [522,523,545]. Los animales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos: no obeso control (vehículo, agua mineral de bebida, n = 10), obeso control (vehículo, agua mineral de bebida, n=10) y obeso SAC/VAL (n=10). El tamaño del grupo se refiere a individuos independientes, y fue definido asegurando la potencia estadística necesaria y el correcto análisis estadístico. Las pruebas y medidas realizadas a las 14 semanas de edad de las ratas ZSF1 fueron realizadas antes de comenzar la administración del SAC/VAL. Durante la evaluación ecocardiográfica a las 18 semanas de edad, una rata del grupo no obeso control falleció debido al prolongado tiempo de exposición a la anestesia.

3.4.3. Tratamientos *in vitro* con sacubitril/valsartán (LBQ657 + valsartán)

Como se ha explicado previamente en la sección 1.3.6. de la introducción, el sacubitril es un profármaco que *in vivo* es hidrolizado por la enzima carboxilesterasa 1 hepática en el metabolito activo sacubitrilato (LBQ657), que es capaz de inhibir a la NEP [487,488].

El LBQ657 y el VAL fueron proporcionados por Novartis Pharma AG (CHE). Debido a la insolubilidad de ambos compuestos en agua, se prepararon disoluciones *stock* de LBQ657 10 mM y VAL 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) (dosis inferiores al 0.01%; PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP), que se conservaron a -80 °C. Para

la realización de los tratamientos *in vitro* se utilizaron posologías previamente descritas en la literatura científica (10 y 20 µM de LBQ657 + VAL) [523,540,545].

3.5. SAL DE BROMURO DE 3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL]-2,5 DIFENIL TETRAZOLIO (MTT): ENSAYO DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.

En 1983 Mosmann desarrolló un ensayo colorimétrico cuantitativo, reproducible y preciso [570] en el que se emplea la sal de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio (MTT) para evaluar la supervivencia y proliferación celular [571,572].

El MTT, que disuelto en medio de cultivo en ausencia de rojo de fenol presenta color amarillo, tiene una estructura lipofílica con carga positiva, que le permite atravesar la membrana celular y la MMI de las células vivas de mamíferos [570–572]. Una vez en el interior de la mt, el MTT es reducido por acción de las oxidorreductasas y deshidrogenasas celulares dando lugar al formazán (λ = 550 nm), un compuesto con estructura cristalina de color púrpura e insoluble en disoluciones acuosas (Fig. 3.2.) [571,572].

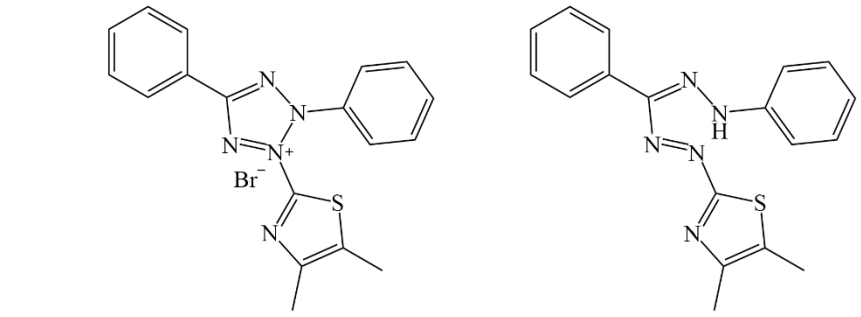


Figura 3.2.: Representación gráfica de la estructura molecular emplea la sal de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio (MTT) y del formazán. Imagen de autoría propia realizada con el programa informático ChemDraw® 23.1.1.

Una disminución de la viabilidad celular se traduce en una menor actividad mitocondrial y, por tanto, una menor metabolización del MTT [572]. La lectura del valor de la absorbancia, que será proporcional a la cantidad de cristales de formazán presentes, se realiza mediante técnicas espectrofotométricas después de la solubilización de los cristales de formazán [571,572].

Mediante este ensayo se evaluó el efecto del LBQ657 + VAL sobre la actividad mitocondrial de la línea celular HL-1 y del cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Para ello se sembraron 15.000 células en placas de cultivo de 96 pocillos (0.32 cm^2 de superficie) y se incubaron durante 24 horas a 37 ºC y 5% CO_2. Se realizaron 3 lavados con 100 µL de medio DMEM y el cultivo se deprivó de suero con el mismo medio durante 16 horas, dejando un control positivo con medio de cultivo completo. Pasado el período de deprivación de suero, los cardiomiocitos fueron tratados durante 24 horas con una mezcla equimolar de LBQ657 y Val 10 y 20 µM, o el

correspondiente vehículo. Pasadas 20 horas de tratamiento se añadieron 10 µL de MTT (5 mg MTT en 1 mL en PBS 1X) por pocillo. Al finalizar el tratamiento, las células fueron lisadas, y los cristales de formazán disueltos al añadir 100 µL de agente solubilizante (83.70 µL de HCl al 37% en dodecilsulfato sódico (SDS) (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) por pocillo. Tras 6-24 horas de incubación a 37 ºC y 5% CO_2 se realizó la lectura de la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de microplacas BioTek Epoch 2 (Agilent Technologies, USA).

3.6. ENSAYO DE CAPTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS (BODIPY®)

El efecto del tratamiento con LBQ657 + VAL en la captación de los FA a nivel cardiomiocitario se evaluó en la línea celular HL-1 empleando el reactivo ácido 4,4-difluoro-5-metil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-dodecanoico (BODIPY® 500/510 C_1, C_{12}) (ThermoFisher Scientific, USA), un análogo del ácido 3-dodecanoico, un FA de 12 carbonos unido al fluoróforo 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY®), que presenta un metabolismo y transporte similar al de los FA comunes en las células (Fig. 3.3.).

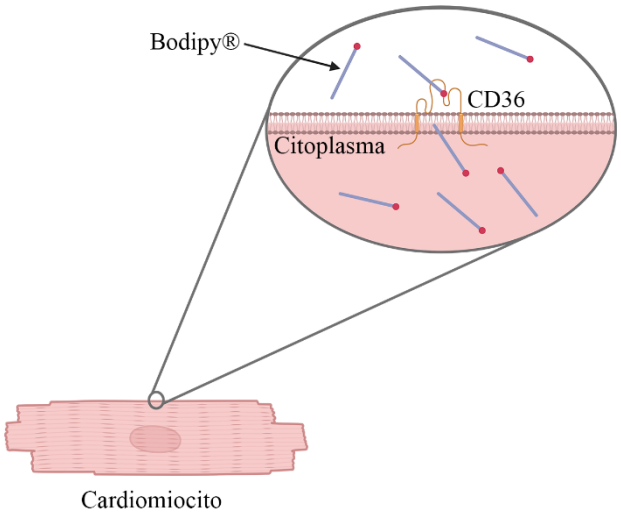


Figura 3.3.: Captación del Bodipy® por los cardiomiocitos mediante transportador CD36. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

El BODIPY® es un fluoróforo sintetizado en 1968 por Trelibs y Kreuzer [573] que presenta elevada fluorescencia, es lipofílico, y tiene propiedades muy similares a las de los lípidos naturales, por lo que se utiliza ampliamente para el estudio del transporte lipídico [574,575].

La línea celular HL-1 se sembró a una densidad de 550.000 células en placas de cultivo de 6 pocillos (9.6 cm^2 de superficie), y se incubó durante 24 horas a 37 ºC y 5% CO_2. Pasadas las 24 horas, se realizaron 3 lavados con medio DMEM y el cultivo se deprivó de suero con el mismo medio durante 16 horas. Posteriormente, el cultivo celular fue tratado con una mezcla equimolar de LBQ657 + VAL a una concentración 10 o 20 µM, o con el correspondiente vehículo durante 30 minutos. Tras el tratamiento,

el cultivo se lavó 3 veces empleando PBS 1X a 37 ºC, y se realizó una incubación con 10 μM de BODIPY® 500/510 C_1, C_{12} y 20 μM de seroalbúmina bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*) libre de FA en PBS 1X a 37 ºC durante 1.5 minutos en oscuridad. Se colocó la placa de cultivo sobre hielo, y se realizaron 3 lavados con una disolución de BSA-libre de FA al 0.1% en PBS 1X frío, deteniendo la incorporación celular de FA y eliminando los restos de FA que no fueron captados por las células. A continuación, las células se incubaron con tripsina-EDTA (Lonza™, CHE) durante 2-3 minutos a 37 ºC y 5% CO_2. Las células despegadas de la superficie de la placa de cultivo se transfirieron a tubos de centrífuga, se añadió un volumen adecuado de PBS 1X frío para inactivar la acción de la tripsina, y se centrifugaron a 1500 rpm, 8 minutos a 4 ºC. El sobrenadante fue descartado mediante decantación, y el pellet celular obtenido se resuspendió en un volumen de una disolución 1 μM de yoduro de propidio en PBS 1X. El yoduro de propidio es un agente intercalante fluorescente que penetra la membrana celular de las células muertas y marca el ácido desoxirribonucleico (ADN) [576]. La suspensión de células se traspasó a tubos específicos para citometría de flujo y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. La fluorescencia de las muestras se evaluó mediante citometría de flujo (FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorter*) utilizando un citómetro FACSAria IIu sorter (BD Biosciences, USA) disponible en la plataforma de citometría de flujo del IDIS. Los resultados obtenidos se analizaron empleando el software FACSDiva v.6.1.3 (BD Biosciences, USA).

3.7. MICROSCOPÍA CONFOCAL

Los posibles efectos del tratamiento con LBQ657 + VAL sobre la movilización del GLUT4 desde el núcleo hacia la membrana celular de los cardiomiocitos neonatales de rata fueron evaluados mediante microscopía confocal.

El cultivo de los cardiomiocitos neonatales de rata se realizó sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro y 0.17 mm de grosor, pretratados con MEC y dispuestos sobre la superficie de los pocillos de una placa P24 (1.9 cm^2 de superficie), a una densidad de 200.000 células/pocillo y se incubó durante 24 horas a 37 ºC y 5% CO_2. Al terminar la incubación, se realizaron 3 lavados con medio DMEM, y el cultivo se deprivó de suero con el mismo medio durante 16 horas. Posteriormente, el cultivo celular fue tratado con una mezcla equimolar de LBQ657 + VAL a una concentración de 10 o 20 μM, o con el correspondiente vehículo durante 30 minutos. Como control positivo se empleó insulina (farmacia hospitalaria) a una dosis de 100 nM. Cada punto de tratamiento se realizó por duplicado. Tras el tiempo de tratamiento, se realizaron 4 lavados con PBS 1X frío, y las muestras se fijaron con paraformaldehido (Elabscience, USA) al 4% en PBS (pH 7.4) durante 20 minutos a t.a. A continuación, se realizó 1 lavado cada 10 minutos con PBS 1X frío durante un total de 30 minutos, para reducir los grupos aldehído libres que pueden causar ruido de fondo. Se permeabilizó y bloqueó la membrana empleando una disolución de 2% de Triton X-100, 2% de Tween-20, 5% de suero de cabra y 0.2% de BSA en PBS (PBT-T) durante 30 minutos a t.a. El anticuerpo (Ac) primario anti-GLUT-4 (Abcam, GBR) se diluyó en PBT-T a concentración 1:100, y se incubó siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Pasado

USAL UNIVERSIDAD

el tiempo requerido, se realizaron 4 lavados con PBS 1X durante 20 minutos, y se incubó con el Ac secundario fluorescente Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, GBR) a una concentración 1:100 diluido en PBT-T durante 45 minutos a 37ºC en condiciones de oscuridad. Se realizaron de nuevo 4 lavados con PBS 1X durante 20 minutos, y se realizó una incubación con TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific, USA) (colorante fluorescente con capacidad para marcar los núcleos celulares debido a su capacidad de intercalarse en la doble hélice del ADN [577]) a una concentración de 1:500 en PBT-T durante10 minutos a t.a. Se realizaron 3 lavados con PBS, y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos (Hortas Suministros S.L., ESP) con las células orientadas hacia abajo utilizando Mowiol como medio de montaje, ya que presenta el mismo índice de refracción que el aceite de inmersión, y protege frente a la pérdida de fluorescencia de la muestra. Después de pasar 12 horas a 4ºC las muestras fueron analizadas empleando el microscopio confocal Leica TCS SP8 (con un aumento del objetivo de x40; Leica Microsystems, DEU) y el software LAS X (Leica Microsystems, DEU), tomando imágenes digitales de 6 campos visuales aleatorios por cada muestra. El análisis y cuantificación de las imágenes obtenidas se realizó con el software libre ImageJ (NIH, USA), utilizando una proyección en Z y representando la fluorescencia media. Se determinaron regiones de interés de un tamaño fijo para cuantificar la fluorescencia citoplasmática perinuclear y periférica cercana a la membrana celular. Para ello se realizaron 6 contajes de células aleatorias, evitando cuantificar aquellas células que presentaban una morfología anormal, que no estaban en contacto con al menos otra célula, o que por el contrario no podían diferenciarse de las células que las rodeaban. Las medidas de fluorescencia se representan como el cociente entre la región citoplasmática periférica y la región perinuclear.

Como controles internos de la técnica se emplearon un control de fluorescencia de las células que fue únicamente procesado con PBT-T, y un control de inespecificidad del Ac secundario en el que la muestra se procesó, pero sin ser marcada con el Ac primario.

3.8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los cardiomiocitos neonatales de rata se mantuvieron en las condiciones ideales del cultivo y/o fueron deprivados de suero 16 horas antes del tratamiento con una mezcla equimolar de LBQ657 + VAL a una concentración 10 o 20 μM, o con sus correspondientes controles durante 24 horas. El proceso de extracción se realizó rápidamente, asegurando la integridad y estabilidad de las proteínas. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, la placa de cultivo celular se colocó en hielo para detener la acción del LBQ657 + VAL, y se realizaron 3 lavados de 30 segundos cada uno con PBS 1X frío. A continuación, se añadieron 6.7 $\mu L/cm^2$ de tampón de lisado frío, compuesto por detergentes (5% de Tris-Cl a 1M y pH 7.5, 5% de NaCl a 5 M, 30% de $Na_4P_2O_7$ + $10H_2O$, 1% de EDTA a 0.5 M, 20% de NaF a 5 M, 10% de Tritón X-100 al 10%, 25 % de H_2O Milli Q) e inhibidores de proteasas (1% de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, *phenylmethanesulfonyl fluoride*) (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) a 0.1 M, 1% de aprotinina (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) 10.0 mg/mL, 1.0% de leupeptina (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) 10.0 mM y 1.0 % de Na_3VO_4

0.1 M), que provocan la ruptura de la pared celular y la liberación de las proteínas sin que se produzca su degradación. El lisado celular se recogió en tubos eppendorf, se homogenizó y mezcló durante 30 segundos empleando un agitador de tipo vórtex. Tras reposar en hielo por 30 minutos, se centrifugó a 13.000 xg, 16 minutos a 4 ºC. Finalmente, el sobrenadante se recogió y se conservó a -20 ºC hasta su uso.

La extracción de proteínas de tejido de animales se realizó siguiendo el mismo procedimiento a excepción del proceso de lisado. En este caso, se homogeneizaron 50–100 mg de muestras de tejido en 200-300 µL de tampón de lisis frío usando un TissueLysser II (Qiagen N.V., DEU). Se realizando 2 ciclos de 30 Hz durante 3 minutos.

3.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas en disolución fue determinada utilizando el método de Bradford, que consiste en la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie® G-250, que en condiciones ácidas se encuentra en su forma roja catiónica doblemente protonada (λ = 470 nm), a los residuos básicos y aromáticos de los AA que conforman las proteínas, convirtiéndose en la forma azul estable no protonada (λ = 595 nm) [578]. El valor de la absorbancia de la disolución se puede medir mediante técnicas espectrofotométricas, y es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en disolución.

Para cuantificar la concentración de proteínas presentes en las muestras se realizó una recta patrón con diluciones seriadas a partir de una disolución inicial de 1.0 mg BSA/mL: 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL y 20 µg/mL en agua Milli Q con un 20% del reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA). Se realizó una dilución 1:500 en agua Milli Q con un 20% del reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA) de las muestras a analizar. Tanto las disoluciones seriadas con concentraciones conocidas de BSA, como las disoluciones de nuestras muestras de interés, se incubaron 5 minutos y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas BioTek Epoch 2 (Agilent Technologies, USA). La concentración de proteínas de las muestras se calculó interpolando los valores de absorbancia de las muestras en la recta patrón de BSA, utilizando una recta de regresión lineal y el software GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software Inc., USA).

3.10. WESTERN BLOT

La expresión de las proteínas de interés se estudió mediante Western Blot, una técnica que permite la separación de proteínas en función de su peso molecular a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad, USA).

Se prepararon las muestras con una concentración de 15-30 µg de proteína, se diluyeron en tampón de carga (25.0% de Tris-Cl a 0.5M con pH 6.8 + 0.4% de SDS, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0.2% de β-mercaptoetanol y 0.001% de azul de

bromofenol), y se hirvieron a 100 ºC durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas antes de cargarlas en el gel para realizar la electroforesis. La parte inferior del gel se conoce como gel separador y, para su polimerización, se emplean diferentes porcentajes de poliacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad, USA) en función del tamaño de las proteínas de interés. Para el estudio de proteínas de 20-70 kDa se utilizaron geles separadores al 10%, y para proteínas de 10-20 kDa geles separadores al 12%. Además de la poliacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad, USA), los geles separadores se componen de Tris-Cl a 1.5 M con pH 8.8, SDS (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) al 10%, persulfato amónico (APS, *ammonium persulfate*) (Bio-Rad, USA) al 10%, tetrametiletilendiamina (TEMED; Bio-Rad, USA) y agua Milli Q. La parte superior del gel se conoce como gel concentrador, y se caracteriza por un mayor tamaño de poro y una composición del 5% de poliacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad, USA), Tris-Cl a 1.5 M con pH 6.8, SDS (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) al 10%, APS (Bio-Rad, USA) al 10%, TEMED (Bio-Rad, USA) y agua Milli Q. Como marcador de peso molecular se utilizó el Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad, USA). La electroforesis se realizó en frío, en tampón de electroforesis (3.00 g/L de Tris-Cl, 14.40 g/L de glicina y 0.96 g/L de SDS (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP)), a 60 V constantes hasta que las proteínas abandonaron el gel concentrador y, posteriormente, a 120 V constantes durante aproximadamente 3 horas utilizando el sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, USA). A continuación, se realizó la transferencia semiseca de las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene fluoride*) (Immun-Blot® PVDF Membranes for Protein Blotting, Bio-Rad, USA), activada siguiendo las indicaciones del fabricante, en tampón de transferencia (3.03 g/L de Tris-Cl, 14.40 g/L de glicina, 1.25 g/L de SDS (PanReac AppliChem ITW Reagents, ESP) y 5% de metanol), a un amperaje constante de 0.28 amperios (A) durante 1 hora, utilizando el sistema Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA). Después de la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana incubándola durante 1 hora a t.a. y en agitación, con una disolución de BSA al 5%, en una disolución salina tamponada (2.0% de Tris-Cl 1 M a pH 7.6, 0.8% NaCl y 0,1% Tween-20; TBS-T). Una vez transcurrido el bloqueo, la membrana se incubó con el Ac primario de interés (Tabla 3.1.) durante toda la noche, a 4 ºC y en agitación. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con TBS-T durante 1 hora para eliminar los restos de Ac primario, y la membrana se incubó con el Ac secundario (Tabla 3.1.) durante 1 hora a t.a. y en agitación. Finalmente, se repitieron los lavados con TBS-T para eliminar los restos de Ac secundario (Tabla 3.1.), y la membrana se reveló empleando el kit de revelado Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, DEU) y/o Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA) en el sistema de revelado ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA). La cuantificación de los niveles de expresión proteica se realizó mediante densitometría de las imágenes obtenidas por quimioluminiscencia utilizando el software ImageJ (NIH, USA).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.1.: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
LC3B	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., USA	#2775
SQSTM1/p62			#5114
α-Tubulin		Sigma-Aldrich, USA	T6074
Mouse-anti-rabbit IgG-HRP	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA	sc-2357
M-IgGκ BP-HRP			sc-516102

3.11. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO

El cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata se mantuvo en las condiciones normales y/o fue deprivado de suero con DMEM 16 horas antes del tratamiento con LBQ657 + VAL a las concentraciones de 10 y 20 µM durante 24 horas. Para la extracción del ácido ribonucleico (ARN) de los cardiomiocitos neonatales de rata se retiró el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS 1X frío y se añadió 1mL del tampón de lisis comercial TRIzol® (RNAzol® RT, Molecular Research Center, Inc., USA) por cada 10 cm^2 de superficie de la placa de cultivo. El RNAzol® RT permite la separación del ARN de otras moléculas. El TRIzol® es una disolución monofásica, compuesta por fenol e isotiocianato de guanidina (agente caotrópico con capacidad de lisar la membrana celular y desnaturalizar las proteínas sin comprometer la estabilidad del ARN), que permite la separación del ARN de otras moléculas presentes en la célula. El lisado celular se recogió y se pasó varias veces por una punta de pipeta para garantizar la homogenización y, a continuación, tras asegurarnos de haber recogido el máximo volumen de lisado celular presente en el pocillo, se traspasó a un tubo eppendorf de 0.2 mL y se incubó durante 5 minutos a t.a. favoreciendo la disgregación de los complejos nucleoproteicos presentes. Se añadió cloroformo en una proporción 1:5 de cloroformo:TRIzol®, los tubos eppendof se agitaron manualmente durante 15 segundos, se incubaron 3 minutos a t.a., y se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 ºC. Después de la centrifugación, se produjo una separación trifásica en la que distinguimos: la fase acuosa (superior) en la cual se encuentra el ARN, la interfase con restos de ADN y proteínas, y la fase orgánica (inferior) con cloroformo, TRIzol®, lípidos y algunas proteínas. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf de 0.2 mL, con cuidado de no contaminarla con restos de la interfase, se añadió la mitad del volumen de TRIzol® y cloroformo que en el paso inicial, y se centrifugó de nuevo a 12.000 xg, 15 minutos a 4 ºC. En esta ocasión se produjo una separación bifásica (ya no hay interfase), y la fase acuosa se trasvasó a un eppendorf limpio, mientras que el ARN presente se precipitó al añadir un volumen similar de etanol al 70 %.

La purificación en columna del ARN se realizó con el kit comercial NucleoSpin Acid Purification (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DEU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite la purificación del ARN mediante un procedimiento basado un proceso de unión selectiva de membranas basadas en gel de

USC DE COMPOSTELA

sílice con sucesivas eluciones y microcentrifugaciones de la muestra. Para ello, se utilizó una columna NucleoSpin® para cada muestra; un tampón con alta concentración de sales, que permite la elución del ADN y la retención en la membrana de la columna NucleoSpin® por el uso de etanol al 70 %, de hasta 200 μg de ARN de más de 200 nucleótidos; y H_2O ultrapura libre de ribonucleasas (RNasas) para evitar la hidrólisis del ARN. La cantidad, la calidad y la pureza del ARN se analizó a través de la medición de la densidad óptica de las muestras a 260 nm y 280 nm con el espectrofotómetro Nano-Drop® ND-1000 (Thermo Scientific, USA). La pureza del ARN de la muestra viene determinada por los siguientes valores:

- Ratio A260/A280 ≈ 2. Valores inferiores indican una posible contaminación debido a la presencia de fenol, ADN o proteínas.
- Ratio A260/A230 ≥ A260/A280. Valores inferiores son indicadores de una posible contaminación con fenol o TRIzol®.

Una vez comprobada la adecuada calidad de las muestras de ARN, estás se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La extracción de ARN de las muestras de TAV y TAS de rata ZDF se realizó siguiendo el mismo protocolo, con la única variación del primer paso. En este caso, 50-100 mg de muestra fueron homogeneizados con 1 mL de TRIzol® en el TissueLysser II (Qiagen N.V., DEU), que consigue la desintegración del tejido mediante 2 ciclos de agitación, empleando una frecuencia de 30 Hz durante 3 minutos.

3.12. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

El siguiente paso después de la extracción del RNA es la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante la reacción de transcripción reversa. A partir de 1 μg de ARN se sintetizaron 20 μL de ADNc, empleando los reactivos y cebadores Oligo(dT)18 (50 μM) y Hexámeros Aleatorios (600 μM) del kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Hoffmann-La Roche Ltd, CHE), y los termocicladores Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, US) o MWG AG BIOTECH Primus 96 plus (MWG-Biotech, DEU). El protocolo del kit comercial describe un primer paso de desnaturalización empleando un perfil térmico de 65 ºC durante 10 minutos, seguido del paso de transcripción reversa utilizando el siguiente perfil térmico: 25 ºC durante 10 minutos, 30 minutos a 55 ºC y 5 minutos a 85 ºC. Las muestras de ADNc se almacenaron a -40 °C hasta su uso.

3.13. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

La expresión de diferentes genes de interés en cardiomiocitos neonatales de rata y en TA de ratas ZDF tras el tratamiento con SAC/VAL o EMPA, respectivamente, se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en tiempo real (RT-PCR, *real time-PCR*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La RT-PCR se realizó utilizando el 2X Perfect Master Mix SYBR Gr® Kit (AnyGenes®, FRA) y los cebadores específicos de rata (AnyGenes®, FRA) (Tabla 3.2.) a una concentración de 20 µM para los siguientes genes: Il-6 (RefSeq NM_012589.2), Il-10 (RefSeq NM_012854.2), Il-1β (RefSeq NM_031512.2), Mcp-1 (RefSeq NM_031530.1), Tnfα (RefSeq NM_012675.3), Lipe (Lipasa E) (RefSeq NM_012859.1), Pnpla2 (*patatin-like phospholipase domain containing 2*) (RefSeq NM_001108509.2), Cd36 (RefSeq NM_031561.2), Cd86 (RefSeq NM_020081.2), Cd163 (RefSeq NM_001107887.1), col1a1 (cadena alfa 1 del colágeno tipo I, *collagen type I alpha 1 chain*) (RefSeq NM_053304.1), col3a1 (cadena alfa 1 del colágeno tipo III, *collagen type III alpha 1 chain*) (RefSeq NM_032085.1), col6a3 (cadena alfa 3 del colágeno tipo VI, *collagen type VI alpha 3 chain*) (RefSeq NM_001427497.1), Tgfb1 (factor de crecimiento transformante beta 1, *transforming growth factor beta 1*) (RefSeq NM_021578.2), Mcu (RefSeq NM_001106398.1), Mcur1 (RefSeq NM_001305178.1), Micu1 (RefSeq NM_199412.2), y ARN ribosomal 18S (Rn18s, *18S ribosomal RNA*) (RefSeq NR_046237.1) Todos los cebadores utilizados poseen una eficiencia de amplificación superior al 90%.

Tabla 3.2.: Cebadores específicos para rata suministrados por Anygenes® (FRA) para el análisis de la expresión de los genes de interés.

Cebador	Nombre	Pares de bases	RefSeq
Il-6	Rat Interleukin-6	90	NM_012589.2
Il-10	Rat Interleukin-10	102	NM_012854.2
Il-1β	Rat Interleukin-1β	116	NM_031512.2
Mcp-1	Rat Monocyte chemoattractant protein 1	119	NM_031530.1
Tnfα	Rat Tumor necrosis factor α	140	NM_012675.3
Lipe	Rat Lipase E	130	NM_012859.1
Pnpla2	Rat Patatin-like phospholipase domain containing 2	128	NM_001108509.2
Cd36	Rat cluster of differentiation 36 or fatty acid translocase	133	NM_031561.2
Cd86	Rat Cd86	146	NM_020081.2
Cd163	Rat Cd163	98	NM_001107887.1
col1a1	Rat collagen type I alpha 1 chain	138	NM_053304.1
col3a1	Rat collagen type III alpha 1 chain	113	NM_032085.1
col6a3	Rat collagen type VI alpha 3 chain	148	NM_001427497.1
Tgfb1	Rat transforming growth factor, beta 1	145	NM_021578.2
Mcu	Rat mitochondrial calcium uniporter	149	NM_001106398.1
Mcur1	Rat mitochondrial calcium uniporter regulator 1	124	NM_001305178.1
Micu1	Rat mitochondrial calcium uptake 1	134	NM_199412.2
Rn18s	Rat 18S ribosomal RNA	150	NR_046237.1

Las reacciones de RT-PCR se realizaron a partir de 1 µL de ADNc y 19 µL de una mezcla de los cebadores específicos para el gen de interés, mezcla Master Mix y sondas SYBR® Green empleando el termociclador Stratagene Mx3005p (Agilent

Technologies, USA) o QuantStudioTM 3 System (Applied Biosystems, Invitrogen, USA) con el perfil térmico indicado por el fabricante: 1 ciclo de 10 minutos a 95 ºC, 45 ciclos de 10 segundos a 95 ºC y 30 segundos a 60 ºC, con lectura de la fluorescencia al final de cada ciclo. También se realizó la amplificación del gen normalizador o *housekeeping* Rn18s para rata, ya que se trata de un gen de expresión constitutiva que permanece invariable ante el efecto de un tratamiento. Además, como control para la detección de una posible contaminación de la muestra con ADN genómico, se preparó una reacción de PCR *No Template Control* (NTC) para cada gen de interés y para el gen normalizador, sustituyendo el ADNc por H_2O ultrapura libre de RNasas.

3.14. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA Y DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LOS EXPERIMENTOS *IN VIVO* CON ANIMALES

Durante el período de tratamiento con SAC/VAL se evaluó la evolución de la TOG y la RI de las ratas ZSF1. Para la prueba de la TOG, tras 6 horas de ayuno, se administró a los animales 0.33 mL/100 g peso corporal de una disolución de D-glucosa al 30% mediante sonda oral. Por otra parte, la prueba de la RI requiere de 8 horas de ayuno y de la administración, mediante inyección intraperitoneal, de 1 mL/kg peso corporal de una disolución de 0,75 U/mL insulina. En ambos casos se midieron los niveles basales, intermedios (15, 30, 60, 90 minutos) y finales (120 minutos) de glucosa en sangre utilizando el glucómetro FreeStyle-Optimum Neo (Abbott Diabetes Care Inc, USA) y las tiras reactivas para glucosa en sangre FreeStyle Precision (Abbott Diabetes Care Inc, USA). El intervalo de detección del glucómetro es de 20-500 mg/dL glucosa, por lo que valores inferiores o superiores no fueron detectados, y quedaron registrados con el valor límite del aparato. A partir de la evaluación tiempo-respuesta de la glucemia, se calculó el AUC.

3.15. ANÁLISIS ECOCARDIOGRÁFICO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La evaluación de los posibles efectos del tratamiento con SAC/VAL en la estructura y función cardiaca de las ratas ZSF1 se realizó en las instalaciones del animalario de la FMUP bajo anestesia con sevoflurano (4%) (AbbVie, USA) mediante ecocardiografía transtorácica, utilizando el ecógrafo Acuson Sequoia C512, que está equipado con una sonda lineal de 15-MHz (Siemens Healthineers, DEU). Las mediciones se realizaron antes de empezar el tratamiento (14 semanas de edad), tras 4 semanas de tratamiento (18 semanas de edad), y a las 8 semanas (22 semanas de edad); es decir, antes de finalizar el período de tratamiento con SAC/VAL. Al igual que en humanos, el estudio ecocardiográfico en roedores se realiza empleando una combinación de modos [341,579]:

Modo tiempo-movimiento (modo M): se caracteriza por la emisión de un único haz de ultrasonidos sobre diferentes estructuras cardíacas, obteniendo un registro continuo del movimiento de las estructuras en función del tiempo [579–581].

Modo brillo (modo B) en 2 dimensiones (2D): permite evaluar la función total del VI empleando diferentes planos y ejes (4 o 5 cámaras, parasternal corto o transversal y parasternal largo o longitudinal) [341,581].

Doppler: se conoce como efecto Doppler a la variación de la frecuencia de las ondas del sonido al modificar la distancia del emisor con respecto al receptor. Una de las aplicaciones del efecto Doppler es la evaluación del movimiento de diferentes componentes en el corazón y en los vasos sanguíneos [341,580,581]. En función del objeto de estudio se distingue:

- El Doppler de onda pulsada (DOP): permite evaluar el movimiento del flujo sanguíneo en un punto concreto [341,580].
- El Doppler de imagen tisular (DIT): se utiliza para realizar una evaluación cuantitativa del movimiento de las paredes del miocardio [341,580].

La forma más común de evaluar la función sistólica en roedores es mediante la cuantificación (en el eje paraesternal corto empleando el modo M) de parámetros cardíacos durante la sístole y la diástole, como los LVID y el grosor de la pared anterior (LVAW, *left ventricular anterior wall thickness*) y posterior (LVPW, *left ventricular posterior wall thickness*) del VI [341], los cuales permiten calcular otros parámetros de la función sistólica como:

FEVI: como se indicó en apartado 1.3.2. de la introducción, se obtiene a partir de los LVESV y LVEDV, valores calculados siguiendo el método de Teichholz utilizando las fórmulas (2 y 3) [341,580]:

$$LVESV = 7/(2.4 + LVIDs)) \times LVIDs^3 \quad (2)$$

$$LVEDV = 7/(2.4 + LVIDd)) \times LVIDd^3 \quad (3)$$

$$FEVI\ (\%) = (LVEDV\text{-}LVESV)/LVEDV \times 100 \quad (1)$$

Masa del VI: se obtiene a partir de la fórmula de Devereux modificada para roedores (4) [341]:

$$Masa\ VI = 1.04\ [(LVIDd + LVAWd + LVPWd)^3 - LVIDd^3] \times 0.8 + 0.6 \quad (4)$$

El modo B en 2D en el eje paraesternal largo permitió obtener los valores finales del área del VI en diástole (LVEDA, *left ventricular end-diastolic area*) y en sístole (LVESA, *left ventricular end-systolic area*), y de la longitud del VI en diástole (LVEDL, *left ventricle length at end-diastole*) y en sístole (LVESL, *left ventricle length at end-systole*), los cuales también permiten calcular otros parámetros de la función sistólica [341]:

Gasto cardíaco (CO, *cardiac output*) del VI: es el volumen de sangre que expulsa el VI por minuto (fórmula 5) [341]:

$$CO = SV \times FC \quad (5)$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Siendo SV el volumen sistólico del VI (*stroke volume*) (datos no mostrados en el apartado 4.3.3). La FC (datos no mostrados en el apartado 4.3.3) se obtuvo mediante el modo DOP en la vista apical de 5 cámaras en el anillo mitral medial [341]. El SV se obtuvo a partir de los LVESV y LVEDV (fórmula 8), calculados a partir de las fórmulas 6 y 7 respectivamente [341]:

$$LVEDV = 8 \times LVEDA^2 = 3\pi\ LVEDL \quad (6)$$

$$LVESV = 8 \times LVESA^2 = 3\pi\ LVESL \quad (7)$$

$$SV = LVEDV - LVESV \quad (8)$$

Además, se evaluó la función diástole, es decir, la relajación y llenado de las cámaras cardíacas [582]. El área de la AI es un indicador de DD y del incremento crónico de las presiones de llenado del VI; y su medición se puede realizar en el plano apical de 4 cámaras en el modo B en 2D [341]. El plano de 4 cámaras también permite evaluar la onda de llenado ventricular durante la contracción auricular (A, *late diastolic transmitral flow velocity*), E, y los tiempos de eyección, de contracción isovolumétrica (IVCT, *isovolumetric contraction time*) y de relajación isovolumétrica (IVRT, *isovolumic relaxation time*) mediante DOP [341]. Otros parámetros importantes son el ratio E/A, que proporciona información acerca de las velocidades de llenado del VI, y el índice de rendimiento miocárdico (índice Tei), que proporciona la función miocárdica global (fórmula 9) [341].

$$\text{Índice Tei} = (IVCT + IVRT)/\text{Tiempo de eyección} \quad (9)$$

Además, mediante el DIT se puede medir e', lo que permite calcular el ratio E/e', un indicador de la presión de la AI y una medida indirecta de la presión de llenado del VI [341].

Se calcularon las medias de 3 ciclos cardíacos estables para todas las mediciones, y los datos se analizaron con el software syngo US workplace (Siemens Healthineers, DEU).

3.16. EVALUCIÓN DE LA TOLERANCIA AL EJERCICIO Y DEL METABOLISMO RESPIRATORIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El VO_2max y la producción máxima de CO_2 (VCO_2max) de las ratas ZSF1 se evaluó durante el período experimental (18 y 22 semanas de edad) mediante la prueba de TE. Los animales se pesaron y se colocaron en una cinta de correr para ratas (LE8700C Panlab®, Harvard Apparatus, ESP) habilitada con una rejilla de estimulación, que administra descargas eléctricas de intensidad constante (0 a 2 mA) a los animales. La cinta de correr está aislada del entorno mediante una cámara conectada a un analizador de gases (LE405, Panlab®, Harvard Apparatus. ESP), lo que permite monitorizar la producción y el consumo de gases durante el período en el que se realiza la prueba. Al comienzo se colocó la cinta de correr con una velocidad inicial de 15 cm/s, una inclinación de 10 grados y un flujo de aire fresco de 700 mL/minuto [583]. Tras el

periodo de habituación la velocidad de la cinta se aumentó a 30 cm/s, y posteriormente se incrementó en 5 cm/s cada minuto [583]. El procedimiento finalizó cuando los animales, incapaces de mantener el ritmo, permanecían inmóviles en la rejilla de estimulación durante más de 3 segundos [583]. Además de las concentraciones de gases también se registró el gasto energético (EE, *Energy Expenditure*), el cociente respiratorio (RQ, *Respiratory Quotient*) y las velocidades y distancias totales y máximas alcanzadas. El parámetro RQ se calcula como el ratio VCO_2max/VO_2max, y proporciona información acerca de los sustratos energéticos oxidados mayoritariamente en los organismos durante el ejercicio físico [584,585]. Valores de RQ próximos a 1.0 implican el uso de hidratos de carbono (glucosa) como sustrato preferente, mientras que valores inferiores (en torno a 0.7) indican el uso predominante de lípidos y FA [584–586]. También se calculó la variación en el RQ (ΔRQ) durante el período de tratamiento como la diferencia entre los valores de RQ a las 22 semanas de edad y los valores de RQ a las 18 semanas de edad. Todos los datos obtenidos se analizaron con el programa Metabolism 2.2.01 (Panlab®, Harvard Apparatus).

3.17. TEST DE FUERZA DE AGARRE DE LAS EXTREMIDADES ANTERIORES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La fuerza de agarre de las extremidades anteriores de las ratas ZSF1 se evaluó a las 21 semanas de edad utilizando un medidor de fuerza de agarre (GSM 47200, Ugo Basile, ITA). Esta prueba aprovecha la resistencia instintiva característica de los roedores a los movimientos hacia atrás, y su tendencia a contrarrestarlos agarrándose fuertemente a algún objeto próximo. Para ello, los animales se colocaron horizontalmente sobre una placa base, frente a un accesorio de agarre triangular de acero inoxidable conectado a un sensor de fuerza. Una vez que la rata se había agarrado a la barra con las 2 extremidades anteriores, se arrastraba por la cola en sentido contrario y de manera constante hasta perder el agarre (Fig. 3.4.).

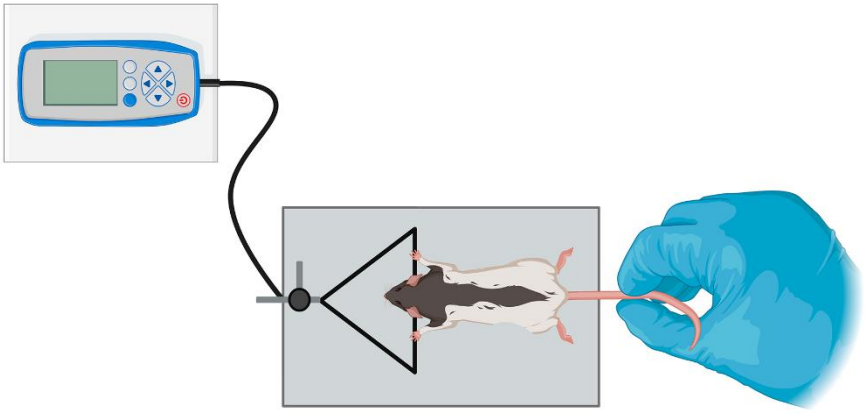


Figura 3.4.: Esquema descriptivo de la prueba de agarre de las extremidades anteriores. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La prueba se repitió 5 veces por cada animal, con descansos de 5 minutos. Se calculó la media de fuerza de agarre de los animales registrándola como g·fuerza (F) con el software DCA3 (Ugo Basile, ITA).

3.18. EVALUCIÓN DE PARÁMETROS METABÓLICOS DE LAS RATAS ZSF1

Las jaulas metabólicas permiten evaluar diferentes parámetros metabólicos de los animales alojados individualmente; sin embargo, se ha demostrado que el aislamiento de aminales sociales como las ratas, la ausencia de enriquecimiento, y la estructura característica de las jaulas metabólicas (suelo de rejilla metálica que permiten la recolección de heces y orina, y sistemas de comida y bebida diferentes a los habituales) de forma prolongada incrementa los niveles de corticosterona de los animales [587,588].

Por todo los expuesto anteriormente se decidió realizar una adaptación de los animales a las nuevas condiciones de alojamiento durante 24 horas antes de realizar ningún experimento o medida. A las 22 semanas de edad, antes de terminar el tratamiento con SAC/VAL, se evaluó el consumo energético, consumo de agua, y producción de orina y heces durante 24 horas utilizando las jaulas metabólicas (Techniplast, Buguggiate, ITA).

Previamente a los sacrificios, y tras 9 semanas de tratamiento con SAC/VAL, se evaluaron los niveles de glucosa y cetonas en sangre de todas las ratas ZSF1. La muestra de sangre se tomó de las venas coccígeas de la cola de los animales, y los niveles de glucosa y cetonas se midieron empleando el glucómetro FreeStyle-Optimum Neo (Abbott Diabetes Care Inc, USA) y las tiras reactivas para glucosa y cetonas en sangre FreeStyle Precision (Abbott Diabetes Care Inc, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los límites de detección de este dispositivo son de 20-500 mg/dL para la glucosa, y de 0.0-8.0 mmol/L para las cetonas en sangre, valores inferiores o superiores no fueron detectados, y quedaron registrados con el valor límite del aparato.

3.19. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS EN EL PLASMA Y SUERO DE LOS ANIMALES

Después del sacrificio de las ratas ZDF, su sangre se recolectó en tubos recubiertos con K2EDTA mediante pulverización (BD Vacutainer®, USA), se centrifugó a 2.000 xg durante 10 minutos a t.a., y el plasma sanguíneo obtenido se alicuoteó en microtubos y se almacenó a -80 ºC. Los niveles plasmáticos de fructosamina y albúmina de ratas ZDF tratadas con EMPA se analizaron en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Los protocolos rutinarios realizados en este centro hospitalario basados en "GlycoGap® The Missing Piece in Diabetic Testing. For the Quantitative Determination of Glycated Serum Protein (GSP, Glycated Albumin)" de los Laboratorios Diazyme (USA) permitieron calcular el porcentaje de albúmina glicosilada empleando la siguiente ecuación (10):

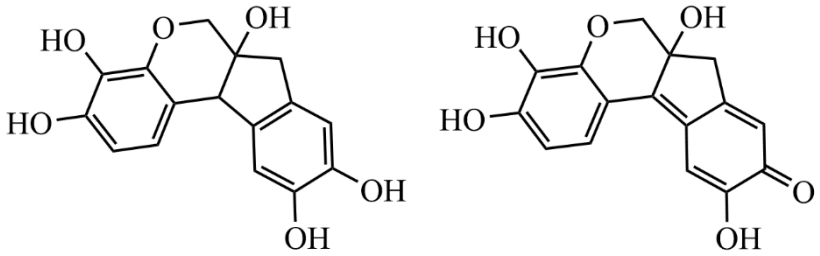
USC DE COMPOSTELA

$$\% \text{ Albúmina glucosilada} = \frac{\text{Fructosamina } (\mu\text{mol/L}) \bullet 0.182 + 1.97}{\text{Albúmina Total } (\text{g/dL}) + 2.9} \quad (10)$$

Tras el sacrificio de las ratas ZSF1, la sangre se recolectó en tubos separadores de suero (BD Vacutainer®, USA), se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC, y el suero sanguíneo obtenido se alicuoteó en microtubos y se almacenó a -80 ºC. Los niveles séricos de Cho total, TG, creatinina, enzimas hepáticas (alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST)), sodio y urea de las ratas ZSF1 tratadas con SAC/VAL fueron determinados en el Laboratório Clínico Veterinário CEDIVET (PRT).

3.20. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE LOS TEJIDOS DE LOS ANIMALES

En el siglo XVI se descubrió la hematoxilina, un extracto procedente del palo de Campeche (Haematoxylon campechianum), que al ser oxidado con una sal metálica a hemateína (Fig. 3.5.), actúa como un colorante [589–591]. Aunque principalmente se utilizaba para teñir ropa o como pintura en trabajos artísticos, en 1840 este extracto comenzó a utilizarse para teñir secciones de plantas y en 1879 Cook y col. [592], publicaron uno de los primeros protocolos en el que se describe el uso de hematoxilina para la tinción de tejidos. La hematoxilina, al tratarse de un colorante básico, tiñe de color azul/violeta los componentes celulares ácidos (basófilos) como el núcleo, los ribosomas y el RE rugoso [590,593].



hematoxilina hemateína

Figura 3.5.: Estructura molecular de la hematoxilina y la hemateína. Imagen de autoría propia realizada con el programa informático ChemDraw® 23.1.1.

La eosina es un colorante ácido derivado sintético de la fluoresceína con capacidad de teñir de un color rosado los componentes básicos de la célula (acidofilos) como el citoplasma, la membrana celular y los orgánulos celulares [590,591,593]. Actualmente, en los estudios histológicos es muy común la combinación de hematoxilina con eosina (HE) para la tinción de los diferentes componentes celulares, ya que la eosina se utiliza como contracolor, permitiendo obtener una información precisa acerca de las estructuras celulares [590,593].

En 1964 Sweat F. y col. [594] recomendó el uso del tinte comercial rojo sirio F3BA con la técnica del ácido pícrico para la tinción del colágeno presente en tejido conectivo. Posteriormente, se observó que esta tinción colorea selectivamente las fibras de colágeno de rojo presentes en diferentes tejidos (corazón, hígado, riñón, etc.) de

forma duradera y que se trata de una técnica adecuada para la microscopía de polarización [595,596].

El Análisis histológico del TAV y del TAS de las ratas ZDF tratadas con EMPA se realizó en el Departamento de Ciencias Morfológicas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (ESP). Parta ello, las muestras del tejido TA se fijaron en formaldehído tamponado al 10% (v/v) durante 24 horas, posteriormente se embebieron en parafina, y se realizaron cortes de 4 µm de grosor que fueron teñidos con HE empleando el sistema CoverStainer (Dako-Agilent, USA) para poder medir el área de los adipocitos del TA. Secciones aleatorias fueron fotografiadas digitalmente empleando un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara digital DP70 (Olympus, JPN). Posteriormente se seleccionaron 2 campos microscópicos (utilizando un aumento x10 del objetivo) en los cuales se midió el área de 50 adipocitos/muestra elegidos al azar utilizando el software de análisis de imágenes DP-Soft (Olympus, JPN).

El análisis histomorfométrico del tejido cardíaco y hepático de las ratas ZSF1 tratadas con SAC/VAL se realizó en la FMUP (PRT). Las muestras de tejido del VI y hepático obtenidas tras el sacrificio de los animales se fijaron en formaldehído tamponado al 10% (v/v). Una vez fijadas las muestras, se embebieron en parafina, y se realizaron cortes de 3 µm de grosor.

La tinción de los cortes histológicos del VI con HE permite cuantificar el área de los cardiomiocitos, un indicador de la hipertrofia cardiaca [537]. Se fotografiaron diferentes campos aleatorios de cada muestra empleando el microscopio Zeiss Axio Scope A1 (DEU) equipado con una cámara digital Axiocam 305 color (Zeiss, DEU) (con un aumento del objetivo de x40), y se midieron 60 cardiomiocitos seleccionados al azar utilizando el software Zen 2.3 lite (Zeiss, DEU). Además, la tinción del tejido hepático con HE se empleó para cuantificar los porcentajes de infiltración lipídica [597]. En este caso, se fotografiaron 8 campos aleatorios de cada muestra empleando un microscopio Zeiss Axio Scope A1 (DEU) equipado con una cámara digital Axiocam 305 color (Zeiss, DEU) (con un aumento del objetivo de x10) y el porcentaje de infiltración lipídica se analizó con el software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc. USA).

Por otra parte, los cortes histológicos del VI teñidos con rojo picro-sirio se utilizaron para cuantificar la fibrosis en muestras cardíacas y hepáticas [524,598]. Se fotografiaron aleatoriamente 8 campos por muestra de tejido con un microscopio Zeiss Axio Scope A1 (DEU) equipado con una cámara digital Axiocam 305 color (Zeiss, DEU) (con un aumento de x10), y se cuantificó el porcentaje de fibrosis utilizando el software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc. USA).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.21. EVALUACIÓN DE LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO MITOCONDRIAL EN TEJIDOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La evaluación de la tasa de consumo de O_2 mitocondrial de tejido cardíaco y hepático de las ratas ZSF1 tratadas con SAC/VAL se realizó mediante respirometría, utilizando el FluoRespirometer O2k de alta resolución (Oroboros Instruments GmbH, AUT), un equipo que consta de un sensor polarográfico de O_2 y 2 cámaras cerradas, que permiten la realización de 2 medidas individuales simultáneas, empleando el protocolo de titulación sustrato-desacoplador-inhibidor (SUIT, *substrate-uncoupler-inhibitor titration*) y el software DatLab 7 (Oroboros Instruments GmbH, AUT). El principio de la respirometría en una cámara cerrada se basa en el control continuo de la concentración de O_2 durante la adición secuencial de diferentes sustratos, desacopladores o inhibidores, a partir de la cual se calcula el valor del flujo de O_2 [599,600]. Los protocolos SUIT para fibras permeabilizadas (pfi, *permeabilized fibres*) del VI (SUIT-001 O_2 pfi) o para mts aisladas del tejido hepático (SUIT-001 O_2 mt D001) permitieron evaluar el flujo específico mitocondrial, es decir, el flujo de O_2 normalizado en función del peso del tejido durante las siguientes circunstancias: respiración mitocondrial basal; estado no fosforilativo (LEAK) en ausencia de ADP; estado de OXPHOS activado en presencia de concentraciones saturantes de ADP [1-5 mM]; y capacidad máxima de transferencia de e^- tras valoración con el desacoplador cianuro de carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) [600–602].

Las cámaras del equipo se limpiaron previamente al ensayo realizando una serie de lavados con H_2O destilada (H_2Od), y posteriormente se realizó la calibración de los sensores con el medio empleado en los análisis. Para ello se ejecutó el test Stirrer en el software DatLab (Oroboros Instruments GmbH, AUT), hasta que se obtuvieron unos valores de la pendiente de O_2 con el tiempo dentro del rango -1.0 a 1.0 pmol/s·mL, y la pendiente negativa de O_2 dentro del rango 2 a 4 pmol/s·mL.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, y paralelamente a la calibración del equipo, las muestras de los tejidos de interés se transfirieron a una disolución fría de relajación y preservación de biopsias (BIOPS) [tampón Ca-EGTA 10.0 mM (2.77 mM CaK_2EGTA + 7.23 mM K_2EGTA; 0.10 μM calcio libre), 50.0 mM K^+-MES, 20.0 mM taurina, 0.5 mM ditiotreitol, 6.56 mM $MgCl_2$, 5.77 mM ATP, 15.0 mM fosfocreatina y 20.0 mM imidazol; pH = 7.1 ajustado con 5.0 N KOH a 0 °C] y se mantuvieron en hielo hasta que fueron procesadas.

El primer paso en la obtención de las pfi del VI fue la separación mecánica, con ayuda de pinzas quirúrgicas, de las fibras del VI manteniendo el tejido sumergido en la disolución de BIOPS. A continuación, las fibras cardíacas se pasaron a 2 mL de solución fría de saponina en BIOPS (5 mg de saponina /1 mL de BIOPS) durante 30 minutos para su permeabilización, y posteriormente se aclimataron al medio de procedimiento MIR06 [MIR05 (MiR05-Kit, Oroboros Instruments GmbH, AUT) con 280 U/mL de catalasa] durante 15 minutos. Antes de su uso, el medio MIR05 se disolvió en 230 mL de H_2Od a 30 °C en agitación, y se ajustó a pH = 7.1 empleando una disolución de KOH 5 M. Una vez ajustado el pH (puede demorar hasta 90 minutos), se separaron 50 mL de la

disolución que se emplearon para disolver 0.25 g de BSA libre de FA, se unió todo el volumen a la disolución principal, se comprobó el pH, y se adicionó H_2Od hasta un volumen final de 250 mL. Tras la permeabilización, se añadieron 1- 2 mg de pfi del VI junto con 2.0 mL de medio MIR06 en cada cámara del FluoRespirometer O2k de alta resolución (Oroboros Instruments GmbH, AUT). Las mts del tejido hepático se aislaron con el PBI-Shredder O2k-Set (Oroboros Instruments GmbH, AUT) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se trocearon aproximadamente 8 mg de tejido hepático que se depositaron rápidamente en el lado estrecho del tubo Shredder (cámara del tejido sólido) homogéneamente sobre el disco de lisis, mientras que en el lado ancho del tubo se añadieron 0.5 mL de MIR05 [603]. El tubo Shredder se colocó en la base metálica del PBI-Shredder SG3 (Oroboros Instruments GmbH, AUT) previamente enfriada a -20 °C durante 10-30 minutos, con la parte ancha hacia arriba. Se encajó la parte superior del PBI-Shredder SG3 (Oroboros Instruments GmbH, AUT) con la tapa del tubo y, para la disgregación de la muestra, primero se colocó en la posición 1 durante 10 segundos y, a continuación, se pasó a la posición 2 durante 5 segundos. Al terminar, el tubo se mantuvo en hielo, se recuperó el volumen de homogeneizado mitocondrial, y se realizaron lavados con MIR05 en ambos lados del tubo para recuperar todos los restos. Tras el aislamiento, se añadieron 2.0 mL de homogeneizado mitocondrial en medio MIR05 en cada cámara del FluoRespirometer O2k de alta resolución (Oroboros Instruments GmbH, AUT).

La adición de diferentes sustratos e inhibidores en las cámaras del equipo permitió la evaluación de cada uno de los complejos mitocondriales que conforman la CTE (Fig. 3.6.), así como de diferentes rutas implicadas en el metabolismo energético (Fig. 3.7.).

La adición simultánea de piruvato (P) 5mM (producto final de la glucólisis) y malato (M) 2 mM (intermedio del ciclo de Krebs), sustratos de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y de la malato deshidrogenasa (MDH), respectivamente, estimula la producción de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), y la transferencia de e^- al complejo mitocondrial I (Fig. 3.6. y 3.7.) [601,602]. En esas condiciones, la mt se encuentra en el estado LEAK debido a la ausencia de adenilatos [602]. A continuación, se añadió ADP, provocando la entrada en estado de OXPHOS mitocondrial [601]. El gradiente de H^+ generado penetró de nuevo en la MM, permitiendo que la enzima ATPasa (o complejo mitocondrial V) catalice la reacción del ADP con el fosfato inorgánico (Pi) para generar ATP (Fig. 3.6) [604]. Una vez estabilizada la concentración de O_2 y su consumo, se añadió citocromo c (Cit c) 10 µM para evaluar la integridad y calidad mitocondrial, y comprobar que las mts no se habían dañado con el tratamiento con SAC/VAL o durante el proceso de permeabilización (Fig. 3.6). Posteriormente, se añadió el desacoplador CCCP, generando una fuga de H^+ que fueron bombeados a través de la MMI, independientemente del complejo ATPasa, hacia la MM (Fig. 3.6). El desacoplamiento de la CTE es un paso irreversible en el que la respiración mitocondrial alcanza su máxima capacidad [605].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

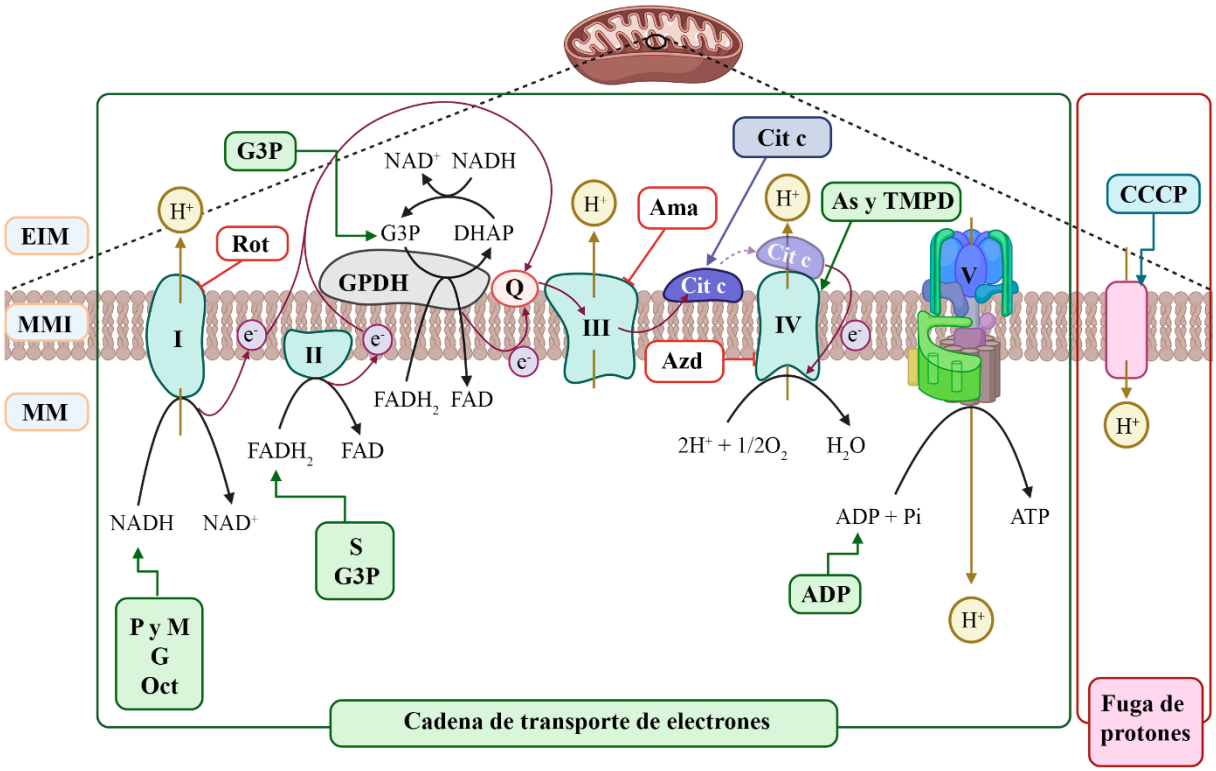


Figura 3.6.: Representación esquemática de la CTE mitocondrial, y de las dianas de los sustratos, inhibidores y desacoplador utilizados para la evaluación de la tasa de respiración mitocondrial en los tejidos de interés. Ama: antimicina A; As: ascorbato; Azd: azida; DHAP: dihidroxiacetona fosfato (dihydroxyacetone phosphate); FAD: dinucleótido de flavina y adenina; $FADH_2$: forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina; G: glutamato; G3P: glicerol-3-fosfato (*glycerol-3-phosphate*); GPDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*glycerol phosphate dehydrogenase*); Oct: octanoilcarnitina; Q: coenzima Q; Rot: rotenona; S: succinato; TMPD: N,N,N′,N′-Tetrametil-p-fenilendiamina. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

La adición de G 10.0 mM, precursor del intermedio del ciclo de Krebs α-cetoglutarato (Fig. 3.7), permite evaluar los efectos de la estimulación del complejo mitocondrial I cuando las mts alcanzan su máxima capacidad (Fig. 3.6) [601]. La evaluación de los efectos de la estimulación del complejo mitocondrial II, también conocido como succinato deshidrogenasa, se realizó al adicionar S 50.0 mM, intermedio del ciclo de Krebs, manteniendo a su vez la estimulación del complejo mitocondrial I [601]. El S es convertido en fumarato por acción de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), produciéndose la oxidación de la $FADH_2$ al FAD y la liberación de e^- (Fig. 3.7). Los e^- obtenidos en las reacciones de oxidación de los complejos I y II mitocondriales son transportados al complejo mitocondrial III (o coenzima Q – Cit C reductasa) por la acción de la coenzima Q (Fig. 3.6) [606]. También se evaluó cómo afecta la estimulación de la β-oxidación a la respiración mitocondrial, específicamente en la actividad de los complejos I y II, mediante la adición de Oct 0.2 mM, un FA de cadena media (Fig. 3.6 y 3.7). A continuación, se inhibió la actividad del complejo mitocondrial I adicionando

rot 0.5 µM, lo que permitió evaluar de forma aislada el efecto de la estimulación del complejo II por el S (Fig. 3.6).

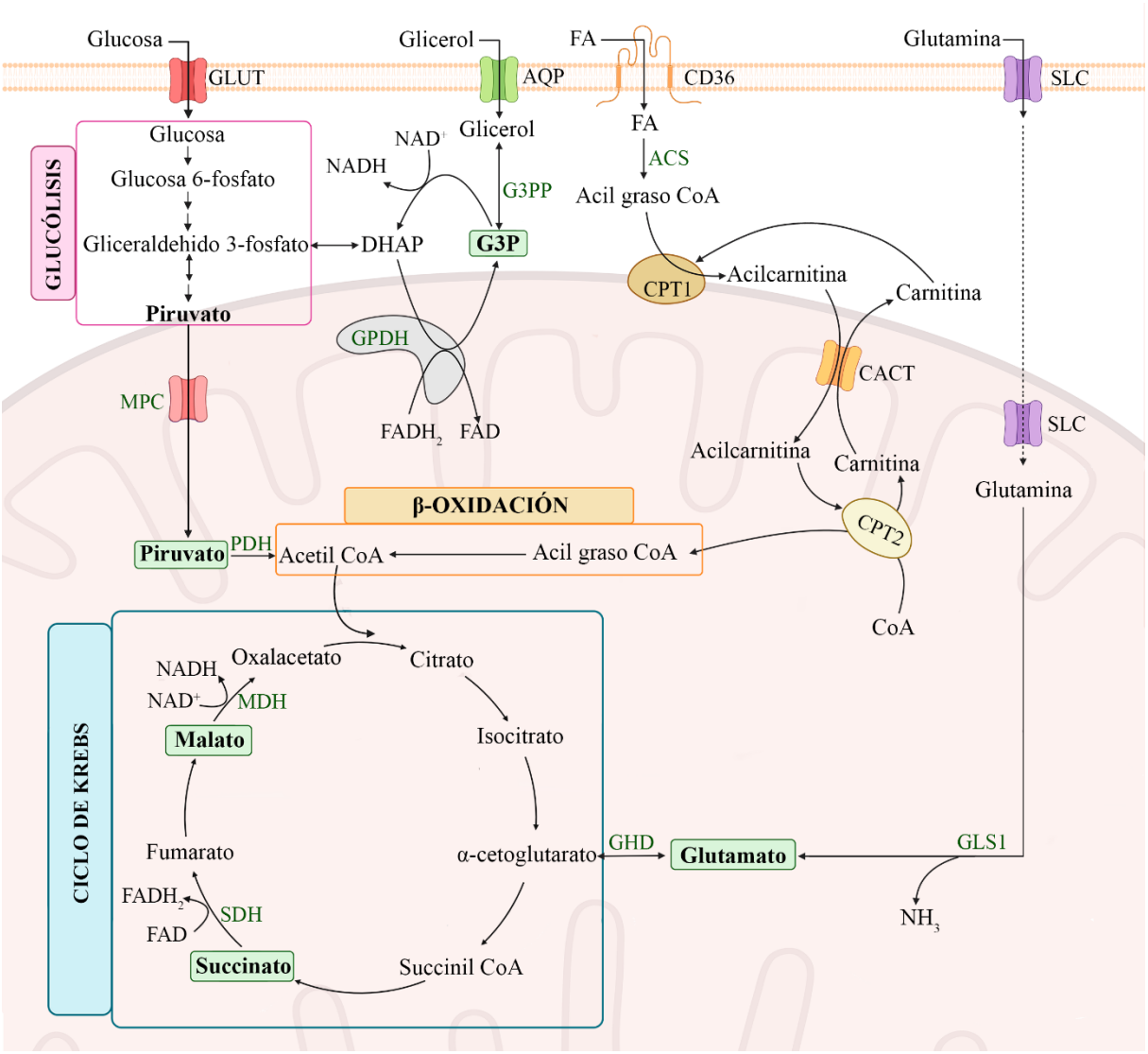


Figura 3.7.: Vías metabólicas estimuladas tras la adición de sustratos mitocondriales en los tejidos procedentes de ratas ZSF1. ACS: Acil-CoA sintetasa; AQP: acuagliceroporina; CoA: coenzima A; CPT1: carnitina palmitoiltransferasa I; CPT2: carnitina palmitoiltransferasa II; G3PP: glicerol-3-fosfato fosfatasa (*glycerol-3-phosphate phosphatase*); GHD: glutamato deshidrogenasa; GLS1: glutaminasa-1; MPC: transportador de piruvato mitocondrial (*mitochondrial pyruvate carrier*); SLC: transportador ligado a soluto (*solute-linked carrier*). Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

Con la adición de glicerofosfato 0.2 mM, también conocido como G3P, se estimuló la vía de la glucólisis y la actividad de GPDH, localizada en la superficie citoplasmática de la MMI, y que cataliza la transformación del G3P en DHAP transfiriendo e^- a la coenzima Q (Fig. 3.6 y 3.7) [607–609]. A continuación, se añadió el inhibidor del complejo III, la Ama 2.5 µM, que conduce a un estado en el que se consume el O_2 residual producido por las reacciones oxidativas secundarias (Fig. 3.6). La penúltima etapa consiste en la evaluación de la capacidad del complejo IV (los

complejos I, II y III permanecen inhibidos) con la adición simultánea de As 2.0 mM y TMPD 0.5 mM. El As es oxidado por el O_2 y permite la reducción del TMPD, lo que resulta en una transferencia de e^- al Cit c y la reducción del complejo IV (Fig. 3.6) [610,611]. Finalmente, el complejo IV fue inhibido por la acción de la Azd 100.0 mM, inhibiendo así completamente la CTE (Fig. 3.6).

Los cambios en la respiración se registraron y analizaron con el software Datlab (Datlab Versión 7.0, Oroboros Instruments, Innsbruck, AUT).

3.22. ANÁLISIS METABOLÓMICOS EN TEJIDOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El análisis del perfil lipidómico del TA de las ratas ZDF tratadas con EMPA; y del perfil metabolómico completo del tejido de VI de corazón de las ratas ZSF1 tratadas con SAC/VAL fue llevado a cabo por OWL Metabolomics S.L. (ESP) mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS, *Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometer*).

Dentro del grupo de las ciencias "ómicas" ocupa un lugar fundamental la metabolómica que, junto a una de sus ramas, la lipidómica, permiten el análisis de los metabolitos presentes en tejidos o fluidos biológicos de organismos, y han despertado un elevado interés en la práctica clínica, debido a su capacidad para caracterizar fenotipos complejos y analizar el estado fisiopatológico de los individuos en un momento concreto [612–616]. En los últimos años se ha demostrado que la metabolómica es un método eficiente para mejorar la comprensión de la fisiopatología de las ECVs, especialmente de la IC [616,617]. Los perfiles metabolómicos pueden revelar nuevos mecanismos de enfermedad, y pueden ayudar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, así como a la contribuir a la categorización de los pacientes con IC en distintos fenotipos caracterizados por mecanismos específicos de enfermedad, distinta progresión y respuesta a tratamientos, fomentando así la medicina de precisión en IC [617].

La clave del éxito en el análisis del metaboloma completo o del lipidoma reside en la capacidad de identificar las variaciones que se han producido en el conjunto de metabolitos de una muestra biológica [618,619]. Debido a su elevada sensibilidad, amplia cobertura de las diferentes clases de metabolitos, alta capacidad de rendimiento y amplio rango dinámico, se ha escogido la UHPLC-MS para realizar un análisis preciso del perfil lipidómico del TAV y TAS y de perfil metabólico del tejido cardíaco [620–624]. En este estudio, se han empleado múltiples plataformas de UHPLC-MS para analizar diferentes analitos endógenos, que se incluirán en subsecuentes procedimientos de análisis estadístico para determinar diferencias entre distintos grupos de muestras.

3.22.1. Extracción de metabolitos

Los disolventes fueron adquiridos en Sigma Aldrich (USA) y Fisher Scientific (USA) y los compuestos estándar de metabolitos de referencia se obtuvieron de Sigma Aldrich (USA), Avanti Polar Lipids (USA) y Larodan Fine Chemicals (SWE).

USC DE COMPOSTELA

La extracción de los metabolitos se realizó mediante el fraccionamiento de las muestras de tejido del VI de las ratas ZSF1 y del TAV y TAS de las ratas ZDF en grupos de especies con propiedades fisicoquímicas similares empleando diferentes combinaciones de disolventes orgánicos [625].

El primer paso para el estudio del metaboloma completo del VI de las ratas ZSF1 fue la precipitación de las proteínas añadiendo H_2O:metanol (15:1, v/p) enriquecido con los estándares internos empleados en las plataformas 1 y 4 (50:1, v/p), cloroformo:metanol (2:1) enriquecido con los estándares internos empleados en la plataforma 2 (10:1, v/p), y cloroformo (35:1, v/p) para 15 mg de tejido del VI. La mezcla se homogeneizó empleando un homogeneizador Precellys 24 en un ciclo de 6500 rpm durante 23 segundos. Las muestras se incubaron durante 1 hora a -20 °C y posteriormente se vortexearon y se emplearon diferentes volúmenes para en las siguientes plataformas:

Plataforma 1: Perfil metabólico de acilos grasos, ácidos biliares (BA, *bile acids*), esteroides y lisoglicerofosfolípidos. Tras una centrifugación a 18000 xg, 10 minutos a 4 ºC de la muestra, se recogieron aproximadamente 300 µL de sobrenadante los cuales se secaron en vacío, se reconstituyeron en metanol y se resuspendieron con agitación durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 18000 xg, 5 minutos a 4 ºC y se transfirieron a placas para realizar el análisis por UHPLC-MS.

Plataforma 2: Perfil metabólico de glicerolípidos, ésteres de colesterol (ChoE, *Cholesterol esters*), esfingolípidos y glicerofosfolípidos. 100 µL de los extractos se mezclaron con hidróxido de amonio en agua (pH = 9, 100 µL), se vortexearon y se incubaron durante 10 minutos a 4 °C. Al terminar la incubación, se centrifugaron a 18000 xg durante 10 minutos a 4 ºC, se recuperó la fase orgánica y se secó al vacío. Los extractos secos se reconstituyeron en acetonitrilo/isopropanol (1:1) y se resuspendieron en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 18000 xg, 5 minutos a 4 ºC y se transfirieron a placas para realizar el análisis por UHPLC-MS.

Plataforma 3: Perfil metabólico de AA. Alícuotas (10 µL) de los extractos obtenidos en la plataforma 1 se transfirieron a microtubos para el al análisis de AA [626].

Plataforma 4: Perfil metabólico de metabolitos polares, incluyendo los metabolitos del metabolismo central del carbono. 350 µL de extracto se mezclaron con 40 µL de cloroformo y 700 µL agua y se vortexearon. Después de 10 minutos en agitación, las muestras se centrifugaron a 18000 xg, 10 minutos y a 4 ºC. La fase polar se recogió, se secó en vacío, se reconstituyó en agua y se resuspendió con agitación durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 18000 xg, 5 minutos a 4 ºC y se transfirieron a placas para realizar el análisis por UHPLC-MS.

El primer paso en el estudio del lipidoma del TA fue la adición de PBS (20:1 v/p) a 30 mg de TA. A continuación, la mezcla se homogeneizó empleando un homogeneizador Precellys 24 en un ciclo de 6500 rpm durante 23 segundos y se utilizó en las siguientes plataformas:

USC DE COMPOSTELA

Plataforma 1: Perfil metabólico de acilos grasos, AB, esteroides y lisoglicerofosfolípidos. 100 µL de homogeneizados se mezclaron con cloroformo (10:1, v/v) y NaCl 50 mM (5:1, v/v) en microtubos de 1,5 mL en hielo. Se añadió cloroformo:metanol (2:1), que contenía los patrones internos utilizados para la plataforma 1 y los patrones internos que no estaban presentes en el TA de rata (2:1, v/v). Tras mezclarlas brevemente en el vórtex, las muestras se sonicaron en hielo durante 30 minutos y, a continuación, se precipitaron las proteínas a -20 ºC durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC, se recogió aproximadamente 1 mL de la fase orgánica y se secó al vacío durante 10 minutos a 40 ºC. Las muestras se resuspendieron en 100 µL de metanol y se centrifugaron a 13000 rpm, 5 minutos a 4 ºC. Los sobrenadantes se transfirieron a viales para el análisis por UHPLC-MS.

Plataforma 2: Perfil metabólico de glicerolípidos, ChoE, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. 20 µL de homogeneizados fueron mezclados con NaCl 50 mM (10:1 v/v) y cloroformo:metanol (2:1; 1000 µL) en microtubos de 1,5 mL en hielo. También se añadieron estándares internos no detectados en el TA de rata no enriquecido, disueltos en cloroformo:metanol (2:1;500 µL). Tras ser mezcladas en vórtex, las muestras se sonicaron en hielo 30 minutos y se incubaron durante 1 hora a -20 °C. Tras centrifugar a 13000 rpm, 10 minutos a 4 °C, se recogieron 50 µL de fase orgánica que se secó al vacío. A continuación, los extractos secos se reconstituyeron en acetonitrilo/isopropanol (1:1; 200 µL), se centrifugaron a 13000 rpm, 5 minutos a 4 ºC y se transfirieron a viales para el análisis por UHPLC-MS.

En ambos casos se emplearon diferentes tipos de muestras de control de calidad (CC) para establecer la calidad de los datos obtenidos [627]:

Muestras de CC de calibración: Se trata de un conjunto de referencia de todas las muestras analizadas, utilizado para corregir los diferentes factores de respuesta entre los lotes (*inter-batch*) y dentro de cada lote (*intra-batch*). Estas muestras se extrajeron y analizaron al mismo tiempo que las muestras individuales.

Muestras de CC de validación: son muestras de referencia de suero y del tejido de interés, utilizadas para evaluar en qué medida el procedimiento de preprocesamiento de datos mejoraba la calidad de los mismos. Estas muestras también se extrajeron y analizaron al mismo tiempo que las muestras individuales.

Muestras de CC del blanco: muestra de blanco con extracción realizada del mismo modo a la de las muestras biológicas.

Blanco de CC de la idoneidad del sistema: muestra de blanco de los disolventes en los que se reconstituyen las muestras biológicas.

3.22.2. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida (LC, *Liquid chromatography*) se realizó utilizando sistemas ACQUITY UPLC (Waters Corp., Milford, USA). La calidad global del procedimiento de análisis se controló repitiendo los extractos de las muestras de CC. El tiempo de retención a lo largo del procedimiento suele mantenerse estable (variación <

6 segundos entre inyecciones), y la precisión de la masa generalmente < 5 ppm (partes por millón) para 400-1000 m/z (masa/carga), y < 1.2 mDa para 50-400 m/z. Para cada muestra y para cada plataforma se empleó una metodología de UHPLC-MS diferente

En el análisis del metaboloma completo del VI de las ratas ZSF1 se utilizaron los espectrómetros de masas LCT Premier XE Tiemp de vuelo (ToF, time of flying) (Waters Corporation, USA) y Xevo G2-XS QTof (Waters Corporation, USA) para las plataformas de lipidómica 1 y 2. Para el perfil metabólico de AA (plataforma 3) se empleó el detector cuadrupolar único Waters Acquity SQD (Waters Corporation, USA), mientras que el análisis del perfil de los metabolitos polares (plataforma 4) se realizó con un espectrómetros de masas LCT Premier (ToF) (Waters Corporation, USA). Las condiciones características del análisis por LC acoplada a espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) (LC- MS) se resume en las tablas 3.3. y 3.4.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.3.: Métodos del análisis del metaboloma completo del tejido cardíaco mediante UHPLC-MS. Condiciones empleadas en las plataformas 1 y 2.

	Metaboloma Completo VI	
	Plataforma 1	**Plataforma 2**
Tipo de columna	UPLC BEH C18, 1.0 x 100 mm, 1.7 µm	UPLC BEH C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
Velocidad de flujo	0.14 mL/minuto	0.40 mL/minuto
Disolvente A	H_2O + 0.05% Ácido fórmico	H_2O + ACN + 10mM Formiato de Amonio
Disolvente B	ACN + 0.05% Ácido fórmico	ACN + Isopropanol + 10mM Formiato de Amonio
***(%B), Tiempo**	0 %, 0 minutos	40 %, 0 minutos
(%B), Tiempo	50 %, 2 minutos	100 %, 10 minutos
(%B), Tiempo	100 %, 13 minutos	40 %, 15 minutos
(%B), Tiempo	0 %, 18 minutos	40 %, 17 minutos
(%B), Tiempo	-	-
(%B), Tiempo	-	-
(%B), Tiempo	-	-
(%B), Tiempo	-	-
Temperatura de la columna	40 °C	60 °C
Volumen de inyección	2 µL	3 µL
Temperatura de la fuente	120 °C	120 °C
Flujo de nebulización de N_2	600 L/hora	1000 L/hora
Temperatura de nebulización de N_2	350 °C	500 °C
Flujo del cono de N_2	30 L/hora	30 L/hora
Voltaje del capilar	2.8 kV	3.2 kV
Voltaje del cono	50 V	30 V

*(%B), tiempo: incremento en el porcentaje de la fase móvil B por unidad de tiempo (representación del gradiente). ACN: acetonitrilo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.4.: Métodos del análisis del metaboloma completo del tejido cardíaco mediante UHPLC-MS. Condiciones empleadas en las plataformas 3 y 4.

	Metaboloma Completo VI	
	Plataforma 3	**Plataforma 4**
Tipo de columna	UPLC BEH C18, 1.0 x 100 mm, 1.7 µm	UPLC HSS T3, 1.0 x 150 mm, 1.8 µm
Velocidad de flujo	0.14 mL/minuto	0.10 mL/minuto
Disolvente A	10 mM de Bicarbonato de Amonio (pH = 8.8)	10 mM de Tributilamina + 15 mM de Ácido Acético + 0.2% Metanol (pH = 5.0)
Disolvente B	ACN	Metanol
***(%B), Tiempo**	2 %, 0 minutos	0 %, 0 minutos
(%B), Tiempo	8 %, 6.5 minutos	4 %, 1.5 minutos
(%B), Tiempo	20 %, 10 minutos	20 %, 3 minutos
(%B), Tiempo	30 %, 11 minutos	25 %, 8 minutos
(%B), Tiempo	100 %, 12 minutos	50 %, 10 minutos
(%B), Tiempo	2 %, 14 minutos	45 %, 15 minutos
(%B), Tiempo	-	100 %, 16-20 minutos
(%B), Tiempo	-	0 %, 21-25 minutos
Temperatura de la columna	40 °C	40 °C
Volumen de inyección	2 µL	2 µL
Temperatura de la fuente	120 °C	120 °C
Flujo de nebulización de N_2	600 L/hora	600 L/hora
Temperatura de nebulización de N_2	350 °C	300 °C
Flujo del cono de N_2	10 L/hora	50 L/hora
Voltaje del capilar	3.2 kV	3.2 kV
Voltaje del cono	30 V	100 V

*(%B), tiempo: incremento en el porcentaje de la fase móvil B por unidad de tiempo (representación del gradiente).

Las condiciones características del análisis del metaboloma completo del TAV y del TAS de las ratas ZDF por LC-MS se resume en la tabla 3.5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.5.: Métodos del análisis del lipidoma del tejido adiposo visceral y subcutáneo mediante UHPLC-MS. Condiciones empleadas en las plataformas 1 y 2.

	Lipidoma TAV Y TAS	
	Plataforma 1	**Plataforma 2**
Tipo de columna	UPLC BEH C18, 1.0 x 100 mm, 1.7 μm	UPLC BEH C18, 1.0 x 100 mm, 1.7 μm
Velocidad de flujo	0.14 ml/minuto	0.15 ml/minuto
Disolvente A	H_2O + 0.05% Ácido fórmico	H_2O + ACN + 10mM formiato de amonio
Disolvente B	ACN + 0.05% Ácido fórmico	ACN+ Isopropanol + 10mM formiato de amonio
***(%B), Tiempo**	0%, 0 minutos	40%, 0 minutos
(%B), Tiempo	50%, 2 minutos	100%, 10 minutos
(%B), Tiempo	100%, 13 minutos	40%, 15 minutos
(%B), Tiempo	0%, 18 minutos	40%, 17 minutos
Temperatura de la columna	40 °C	60 °C
Volumen de inyección	2 μl	2 μl
Temperatura de la fuente	120 °C	120 °C
Flujo de nebulización de N_2	600 L/hora	1000 L/hora
Temperatura de nebulización de N_2	350 °C	400 °C
Flujo del cono de N_2	30 L/hora	30 L/hora
Voltaje del capilar	2.8 kV	2 kV
Voltaje del cono	50 V	30 V

*(%B), tiempo: incremento en el porcentaje de la fase móvil B por unidad de tiempo (representación del gradiente).

3.22.3.Procesamiento previo de los datos del estudio metabolómico

Los datos obtenidos se procesaron empleando el gestor de aplicaciones TargetLynx para el programa informático MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Massachusetts, USA), en el que se introdujeron un conjunto de tiempos de retención (Rt, *retention times*) predefinidos y los pares de la proporción masa-carga (Rt-m/z) correspondientes a los metabolitos incluidos en el análisis. Los cromatogramas de los iones extraídos asociados (ventana de tolerancia de masa = 0.05 Da) fueron detectados mediante sus picos cromatográficos. Se redujo el ruido en los dominios de LC y MS de manera que el software solo procesó las características de los verdaderos metabolitos.

Para los metabolitos identificados, se generaron curvas respuesta de la detección representativa del MS empleando un estándar interno para cada clase química incluida en el análisis. Al suponer niveles de respuesta del detector similares para todos los metabolitos que pertenecen a una clase química determinada, se permitió definir un rango de detección lineal para cada variable. Los valores máximos se definieron como aquellos en los que la respuesta del detector fue no lineal con respecto a la concentración de los estándares internos representativos. Las variables no fueron consideradas para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

futuros análisis cuando más del 30% de los valores de los datos se encontraban fuera de su correspondiente rango de detección lineal.

3.22.4. Clasificación de los metabolitos

Los lípidos son los componentes fundamentales de las membranas biológicas [628,629] y desempeñan múltiples funciones importantes en los sistemas biológicos, como:

Convertir a la célula en un subsistema relativamente independiente del medio exterior a través de las estructuras de bicapa lipídica [630].

Proporcionar un medio hidrofóbico apropiado para las implementaciones funcionales de las proteínas de membrana y sus interacciones [631].

Actuar como mediadores en las vías de transducción de señales, proliferación, apoptosis y transporte a través de membranas [629].

Los AA, además de ser las unidades estructurales básicas de las proteínas; son una fuente de energía y sirven como precursores para la biosíntesis de neurotransmisores, porfirinas, poliaminas y óxido nítrico [632].

El metabolismo central del carbono utiliza una compleja serie de pasos enzimáticos para convertir los carbohidratos en precursores metabólicos que serán utilizados para generar toda la biomasa de la célula [633,634]. El metabolismo central del carbono implica 3 rutas metabólicas principales: la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo Krebs [633].

Los AA y los lípidos se clasificaron según sus propiedades químicas (Tabla 3.6). La clasificación de los lípidos se basó en el sistema propuesto por Fahy y col. (2005) [635], bajo la dirección de la *International Lipid Classification and Nomenclature Committee* (ILCNC) y expresado en la iniciativa *LIPID Metabolites And Pathways Strategy* (LIPID MAPS) (Tabla 3.6) [636].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.6.: Clasificación de los metabolitos. AC: acil carnitinas; Cer: ceramidas; DG: diglicérido; MG: monoglicéridos; MUFA: FA monosaturados (*monounsaturated fatty acids*); NAE: N-acil etanolaminas; oxFA: FA oxidados (*oxidized fatty acids*); PUFA: FA poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*); SM: esfingomielina (*sphingomyelins*).

Categoría	Clase	Subclase	Nombre general
AA	-	-	AA ramificados
	-	-	AA aromáticos
	-	-	Otros AA
FA	FA no esterificados	-	SFA
		-	MUFA
		-	PUFA
	Amidas grasas	-	Amidas grasas primarias
		-	NAE
	Ésteres grasos	-	AC
	oxFA	Eicosanoides	Ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos Ácidos eicosatetraenoicos epoxi
			Ácidos dihidroxieicosatrienoicos
		Octadecanoides	Ácidos hidroxi-octadecadenoicos
			Ácidos oxo-octadecadenoicos
Glicerolípidos	-	-	MG
	-	-	DGs
	-	-	TG
Esfingolípidos	Fosfoesfingolípidos	-	SMs
	Cer	-	N-acilesfingosinas
	Glucoesfingolípidos	-	Monohexosilceramidas
	Bases esfingoides	-	Bases esfingoides libres
Lípidos esteroles	Esteroles	-	ChoE
	Esteroides	-	Esteroides libres
		-	Sulfatos de esteroides
	BA	-	BA libres
		-	BA conjugados de taurina
		-	BA conjugados de glicina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.6.: Clasificación de los metabolitos (continuación). DAPC: diacilglicerofosfatidilcolinas; LPC: lisofosfatidilcolinas; LPE: lisofosfatidiletanolaminas; LPG: lisofosfatidilgliceroles; LPI: lisofosfatidilinositoles; MAPC: 1 o 2-monoacilglicerofosfatidilcolinas; MAPE: 1 o 2-monoacilglicerofosfatidiletanolaminas; MEPC: 1-monoetherglicerofosfatidilcolinas; MEPE: 1 o 2-monoacilglicerofosfatidiletanolaminas, PC: fosfatidilcolinas; PE: fosfatidiletanolaminas; PG: fosfatidilgliceroles; PI: fosfatidilinositoles.

Categoría	Clase	Subclase	Nombre general
Glicerofosfolípidos	Glicerofosfatidilcolinas	PC	DAPC
			1-éter, 2-acilglicerofosfatidilcolinas
		LPC	MAPC
			MEPC
	Glicerofosfatidil-etanolaminas	PE	diacilglicerofosfatidiletanolaminas
			1-éter,2-acilglicerofosfatidiletanolaminas
		LPE	MAPE
			MEPE
	Glicerofosfatidil-inositoles	PI	diacilglicerofosfatidilinositoles
		LPI	monoacilglicerofosfatidilinositoles
	Glicerofosfatidil-gliceroles	PG	diacilglicerofosfatidilgliceroles
		LPG	monoacilglicerofosfatidilgliceroles

3.23. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

3.23.1. Análisis estadísticos utilizados en los experimentos *in vivo* e *in vitro*

Los datos se expresan como media ± error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*) o como mediana ± rango intercuartílico (RIC), según se describa en los pies de figura, de al menos 4 animales por grupo experimental o 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el programa informático GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software Inc., USA). Las comparaciones entre grupos se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, al estudiar variaciones de las condiciones tratadas en comparación a las condiciones control (*fold change*). Para el análisis de la expresión génica, se calculó el *fold change* de la expresión del ARN mensajero (ARNm) del gen de interés *vs.* control empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los cambios con p-valor < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. En algunos de los análisis *ex vivo* realizados no pudieron incluirse todos los animales debido a que, después de realizar los ensayos de metabolómica, la cantidad de muestras fue bastante limitada.

3.23.2. Análisis estadístico de los ensayos de metabolómica y lipidómica

Los datos obtenidos en el análisis del metaboloma completo del tejido cardíaco y del lipidoma del TAV y TAS fueron procesados con el gestor de aplicaciones

USC DE COMPOSTELA

TargetLynx para el programa informático MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Massachusetts, USA).

Los factores de normalización se calcularon para cada metabolito dividiendo sus intensidades en cada muestra por la intensidad registrada de un patrón interno adecuado en esa misma muestra, siguiendo el procedimiento descrito por Martínez-Arranz y col. (2015) [637].

El estándar interno más apropiado para cada variable se definió como aquel que dio lugar a una desviación estándar relativa mínima tras la corrección, calculada a partir de las muestras de CC de calibración de todos los lotes de análisis. En general, como cabía esperar, las tendencias del mejor patrón interno siguieron similitudes estructurales químicas entre los compuestos enriquecidos y las variables endógenas.

Se utilizó una regresión lineal robusta para estimar en las muestras de CC de calibración cualquier desviación *intra-batch* no corregida por la corrección del patrón interno. Para todas las variables, la respuesta corregida por patrón interno en cada lote se dividió por su correspondiente tendencia de desviación *intra-batch*, de forma que los valores de abundancia normalizados de las muestras de estudio se expresaron con respecto a las muestras de suero de CC de calibración promediadas por lote (fijadas arbitrariamente en 1).

Después de la normalización de los datos, se redujo su dimensionalidad mediante el análisis multivariante de datos utilizando el software SIMCA 14.1. (MSK Umetrics AB, SWE), para facilitar la visualización de cualquier agrupación metabólica de los diferentes grupos de muestras [638]. En el análisis multivariante se incluye el análisis no supervisado de componentes principales (PCA, *principal components analysis*), que permite reducir la matriz de datos a una serie de componentes principales, cada uno de los cuales es una combinación lineal de los datos de metabolitos. Los datos se centraron y se ajustaron a la varianza unitaria. La calidad del modelo se evaluó mediante los valores R^2 y Q^2, que indican la fracción de varianza explicada y la bondad de la predicción, respectivamente. El parámetro Q^2 se calculó mediante validación cruzada séptuple.

Los datos metabolómicos se expresan como media ± SEM, y la significación se estableció como p-valor < 0.05. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de software estadístico R v.3.1.(R Development Core Team, 2011, AUT; https://cran.rproject.org/). La distribución normal de los datos se determinó mediante el test estadístico Shapiro-Wilk. A continuación, se calculó el porcentaje de cambios de los metabolitos de cada grupo y el p-valor de las comparaciones entre los grupos utilizando el test paramétrico t de Student, si las muestras seguían una distribución normal, o el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon si la distribución de las muestras no era normal.

Los gráficos tipo *volcano* (*Volcano Plot*) resumen los criterios del *fold change* y del test paramétrico t de Student o el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon. Son gráficos de dispersión (*scatter plot*) en los que se representa en el eje de

USC DE COMPOSTELA

ordenadas (eje y) los *p*-valor proporcionado por el test paramétrico t de Student o el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon en la forma negativa del $\log_{10}$ (-$\log_{10}$(*p*-valor)) y en el eje de abscisas (eje x) el $\log_2$ del *fold change* ($\log_2$ (*fold change*)). Los metabolitos con niveles diferenciales estadísticamente significativos se sitúan por encima de la línea umbral horizontal. Cuanto mayor sea el valor del *fold change* de un metabolito este aparecerá más alejado de la línea umbral vertical en $\log_2$ (*fold change*) = 0 indicando si su regulación está incrementada (lado derecho) o reducida (lado izquierdo).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE EMPAGLIFLOZINA SOBRE EL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATAS ZDF

4.1.1. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre el control glucémico de las ratas ZDF

Para evaluar el control glucémico de los animales y realizar el seguimiento de la DM tras el tratamiento con EMPA, se midieron los niveles de los biomarcadores fructosamina y albúmina y se calculó el porcentaje de albúmina glucosilada.

Los análisis realizados mostraron que el tratamiento con 30 mg/kg/día/p.o. de EMPA durante 6 semanas a partir del inicio de la DMT2 disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de fructosamina (control: 79.25 ± 10.54 µmol/L, n = 4; EMPA: 31.80 ± 7.84 µmol/L, n = 5; *p*-valor = 0.02) (Fig. 4.1.A), así como el porcentaje de albúmina glicosilada (control: 7.11 ± 0.50 unidades arbitrarias (u.a.), n = 4; EMPA: 4.85 ± 0.35 u.a., n = 5; *p*-valor = 0.02) (Fig. 4.1.B) en ratas ZDF en comparación con el grupo control. Sin embargo, el tratamiento con EMPA no modificó los niveles plasmáticos de albúmina total (control: 3.91 ± 0.09 g/dL, n = 4; EMPA: 3.98 ± 0.07 g/dL, n = 5; *p*-valor = 0.72 (Fig. 4.1.C).

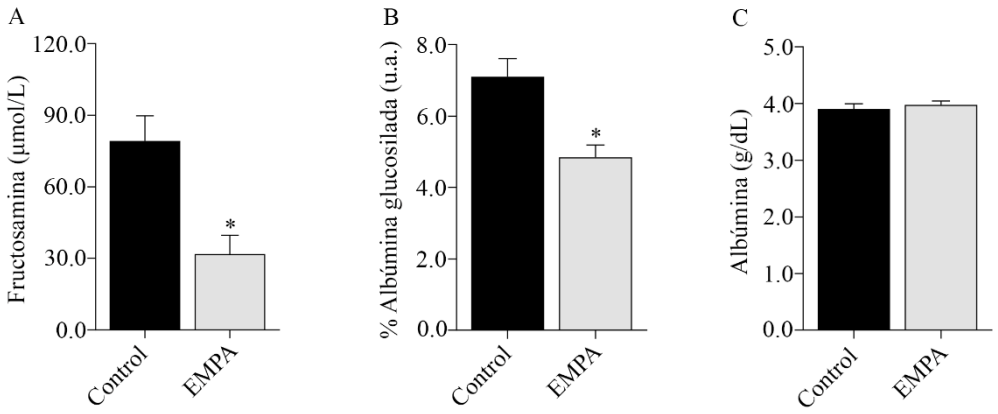


Figura 4.1.: Efecto de la EMPA en los niveles plasmáticos de diferentes parámetros bioquímicos en ratas macho ZDF. El tratamiento con EMPA durante 6 semanas redujo significativamente los niveles plasmáticos de fructosamina (A) y de albúmina total (B) pero no el porcentaje de albúmina glucosilada (C) en ratas ZDF en comparación con el grupo control (n = 4 para el grupo control y n = 5 para el grupo EMPA). **p*-valor < 0.05. Los datos se expresaron como media ± SEM en µmol/L, u.a. y g/dL. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios, antiinflamatorios y de macrófagos en el tejido adiposo de las ratas ZDF

La inflamación crónica de los tejidos diana de la insulina, como es el caso del TA, es una característica clave de la obesidad y la DMT2 [69,87,168,639,640]. Se decidió evaluar los posibles efectos del tratamiento con EMPA en el perfil inflamatorio del TA empleando la técnica RT-PCR para determinar los niveles de expresión génica de las citoquinas proinflamatorias Il-1β, Il-6, Tnfα y Mcp-1; de la citoquina antiinflamatoria Il-10 y de los marcadores de macrófagos M1 (Cd86) y M2 (Cd163) en el TAV y TAS de las ratas ZDF.

Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con EMPA durante 6 semanas redujo significativamente la expresión de los niveles de ARNm de Il-1β (TAV: *p*-valor = 0.003, n = 11; TAS: *p*-valor = 0.010, n =11) (Fig. 4.2.A) en el TAV y el TAS; y de Il-6 (TAV: *p*-valor = 0.002, n = 11; TAS: *p*-valor = 0.831 , n = 11) (Fig. 4.2.B), Tnfα (TAV: *p*-valor = 0.001, n = 12; TAS: *p*-valor = 0.770, n = 10) (Fig. 4.2.C), Mcp-1 (TAV: *p*-valor = 0.002, n = 10; TAS: *p*-valor = 0.910, n = 12) (Fig. 4.2.D) e IL-10 (TAV: *p*-valor = 0,002, n = 10; TAS: *p*-valor = 0.084, n = 10) (Fig. 4.2.E) en el TAV pero no en el TAS de las ratas ZDF *vs.* el grupo control. Además, el tratamiento con EMPA redujo de manera significativa los niveles de ARNm de Cd86 (TAV: *p*-valor = 0.010, n = 10; TAS: *p*-valor = 0.084, n = 10) (Fig. 4.2.F) y Cd163 (TAV: *p*-valor = 0.005, n = 11; TAS: *p*-valor = 0.123, n = 11) (Fig. 4.2.G) en el TAV sin que se observaran cambios en el TAS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

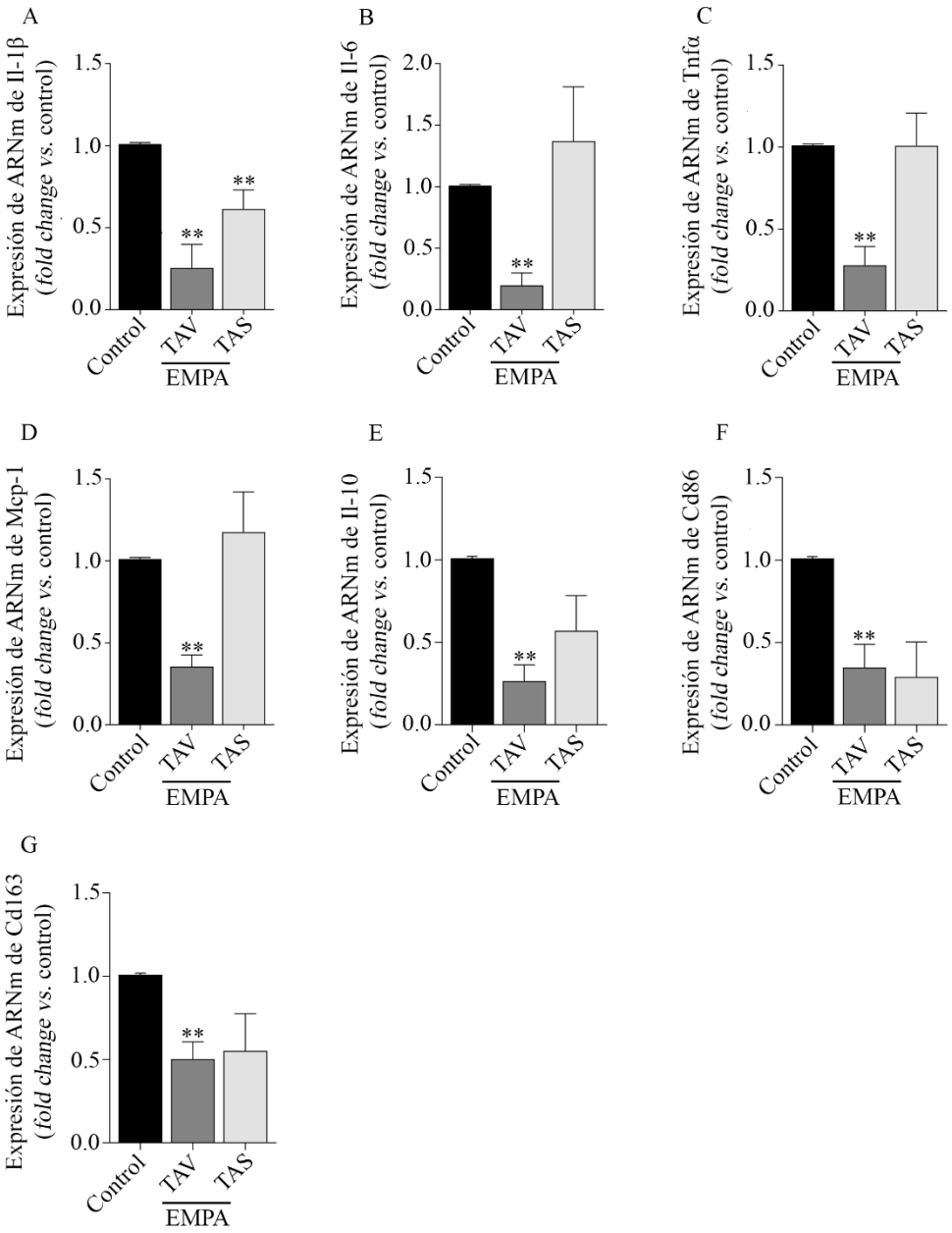


Figura 4.2.: Evaluación mediante RT-PCR del efecto de la EMPA sobre los niveles de expresión génica de marcadores pro-, antiinflamatorios y de macrófagos del TA de ratas ZDF. El tratamiento con EMPA redujo significativamente los niveles de expresión de ARNm de los marcadores proinflamatorios interleuquina 1β (Il-1β) (n = 11) (A); interleuquina 6 (Il-6) (n = 11) (B); factor de necrosis tumoral α (Tnfα) (n = 11-12) (C); proteína quimioatrayente de monocitos 1 (Mcp-1) (n = 10-12) (D); del marcador antiinflamatorio interleuquina 10 (Il-10) (n = 10) (E); y de los marcadores de macrófagos M1 (Cd86) (n = 10) (F) y M2 (Cd163) (n = 10-11) (G) en TAV pero no en el TAS a excepción de la expresión de Il-1β, que se vio reducida en ambos TAs. ***p*-valor < 0.01. Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al control (*fold change vs.* control) en u.a. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.3. El tratamiento con empagliflozina no modificó el área de adipocitos del tejido adiposo de las ratas ZDF

La obesidad caracteriza por la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos que conduce a una disfunción del TA [69,641]. Debido al papel fundamental que juega la hipertrofia de los adipocitos en la disfunción e inflamación del TA, llegando incluso a tener implicaciones negativas a nivel del sistema CV [641–643], se estudió el posible efecto del tratamiento con 30 mg/kg/día/p.o. de EMPA durante 6 semanas en el área de los adipocitos del TAV y TAS de las ratas ZDF.

El análisis histológico del TA demostró que tratamiento con EMPA durante 6 semanas no tuvo efectos sobre el área de los cardiomiocitos que componen el TAV (control: 9511.0 ± 407.3 μm^2, n = 5; EMPA: 9899.0 ± 1730.0 μm^2, n = 5; *p*-valor > 0.999) y el TAS (control: 10726.0 ± 1052.0 μm^2, n = 5; EMPA: 9996.0 ± 431.1 μm^2, n = 4; *p*-valor = 0.2) de las ratas ZDF en comparación con el grupo control (Fig. 4.3.A y 4.3.B).

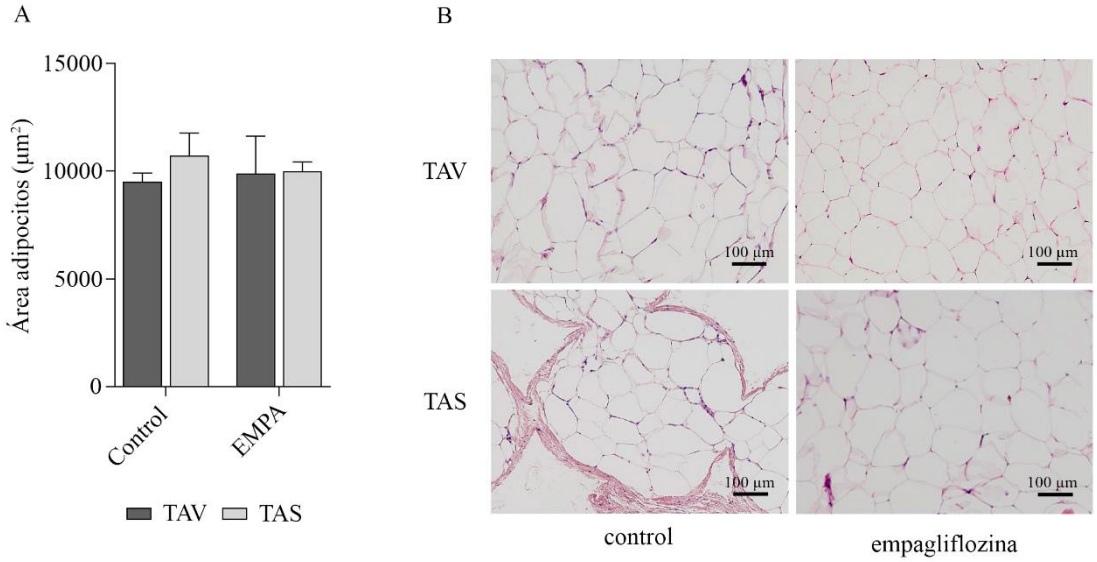


Fig. 4.3.: Evaluación histológica del TA de ratas ZDF después del tratamiento con EMPA. Representación gráfica del área de los adipocitos del TAV y TAS las ratas ZDF tratadas con EMPA (A). Imágenes histológicas representativas de los adipocitos de ambos depósitos de grasa teñidos con HE (aumento de objetivo, x10) (n = 4-5). Los valores se representan como media ± SEM en μm^2. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

4.1.4. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre la expresión génica de marcadores profibróticos en el tejido adiposo de las ratas ZDF

La hipertrofia del TA durante la obesidad favorece el desarrollo de la fibrosis de los adipocitos debido principalmente a la acumulación de colágeno y al incremento de la expresión de Tgfb1 [114,644–646]. Debido a la importancia de la fibrosis del TA en el desarrollo de obesidad, hemos evaluado el efecto del tratamiento con EMPA en los niveles de expresión génica de los marcadores profibróticos col1a1, col3a1, col6a3 y Tgfb1 en el TAV y TAS de ratas ZDF.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El tratamiento con EMPA durante 6 semanas consiguió reducir significativamente los niveles de ARNm del col1a1 (TAV: *p*-valor = 0.002, n = 12; TAS: *p*-valor = 0.080, n = 13) (Fig. 4.4.A) y col6a3 (TAV: *p*-valor = 0.006, n = 13; TAS: *p*-valor = 0.966, n = 11) (Fig. 4.4.B) en el TAV, pero no en el TAS de las ratas ZDF. Sin embargo, el tratamiento con EMPA no modificó los niveles de expresión del ARNm de col3a1 (TAV: *p*-valor = 0.266, n = 12; TAS: *p*-valor = 0.922, n = 10) (Fig. 4.4.C) ni de Tgfb1 (TAV: *p*-valor = 0.588, n = 13; TAS: *p*-valor = 0.244, n = 13) (Fig. 4.4.D) en el TA de las ratas ZDF.

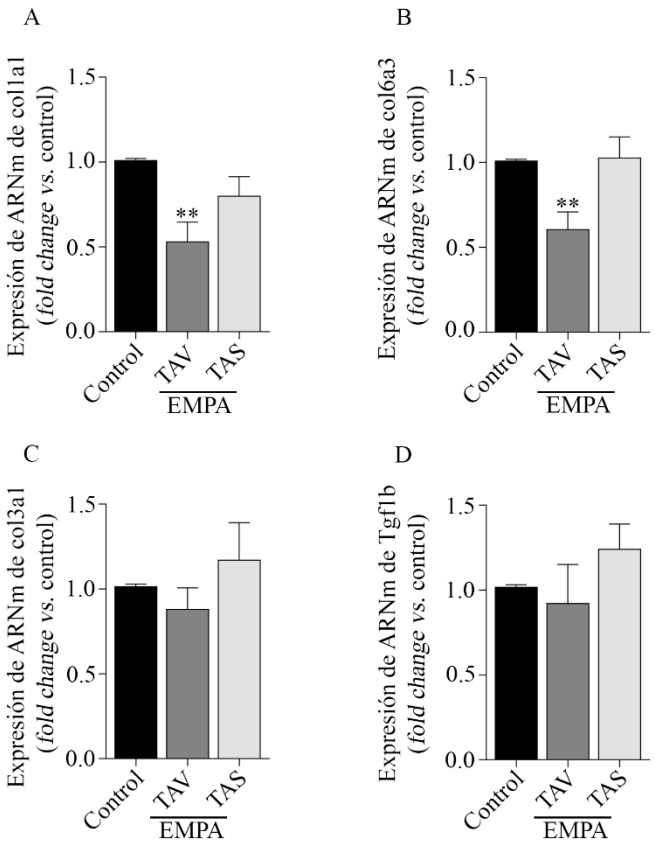


Figura 4.4.: Evaluación mediante RT-PCR de los niveles de expresión génica de marcadores profibróticos en el TA de ratas macho ZDF después del tratamiento con EMPA. La EMPA redujo significativamente los niveles de expresión de ARNm de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (col1a1) (n = 12 en TAV y n = 13 en TAS) (A); la cadena alfa 3 del colágeno tipo VI (col6a3) (n = 13 en TAV y n = 11 en TAS) (B); la cadena alfa 1 del colágeno tipo III (col3a1) (n = 12 en TAV y n = 10 en TAS) (C) y del factor de crecimiento transformante beta 1 (Tgfb1) (n = 12 en ambos tejidos) (D) en comparación con el grupo control. ***p*-valor < 0.01. Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al control (*fold change vs.* control) en u.a. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.5. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre la expresión de los componentes del complejo uniportador de calcio mitocondrial en el tejido adiposo de las ratas ZDF

El MCU tiene una actividad muy relevante en el TA y, además, desempeña un papel fundamental en el metabolismo aeróbico y en la termogénesis [647,648]. Debido a su importancia, se evaluó el efecto del tratamiento con una dosis de 30 mg/kg/día/p.o. de EMPA durante 6 semanas sobre los niveles de expresión de Mcu, Mcur1 y Micu1, subunidades que conforman el complejo MCU [436,647] en el TAV y TAS de ratas ZDF.

Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con EMPA durante 6 semanas reducía significativamente los niveles de ARNm de Mcu (TAV: *p*-valor = 0.004, n = 9; TAS: *p*-valor = 0.326, n = 14) (Fig. 4.5.A) y Mcur1 (TAV: *p*-valor = 0.004, n = 9; TAS: *p*-valor = 0.380, n = 12) (Fig. 4.5.B) en el TAV, pero no en el TAS de las ratas ZDF en comparación con el grupo control. El tratamiento con EMPA no modificó los niveles de expresión del ARNm de Micu1 (TAV: *p*-valor = 0.250, n = 9; TAS: *p*-valor = 0.426, n = 9) (Fig. 4.5.C) en el TAV y el TAS de las ratas ZDF.

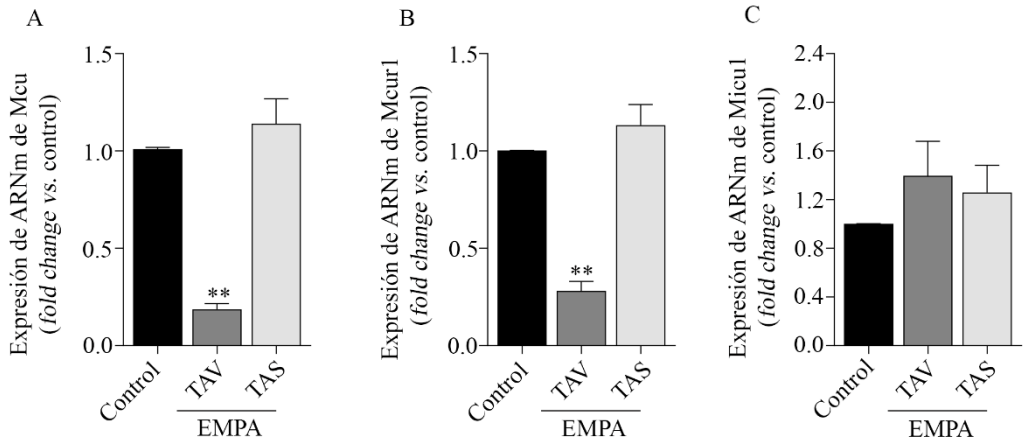


Figura 4.5.: Evaluación mediante RT-PCR de los niveles de expresión de las subunidades que conforman el complejo MCU en el TA de ratas macho ZDF después del tratamiento con EMPA. Niveles de expresión ARNm del uniportador de calcio mitocondrial (Mcu) (n = 9 en TAV y n = 14 en TAS) (A); regulador 1 del uniportador de calcio mitocondrial (Mcur1) (n = 9 en TAV y n = 12 en TAS) (B) y el *mitochondrial calcium uptake 1* (Micu1) (n = 9 en ambos tejidos) (C). ***p*-valor < 0.01. Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al control (*fold change vs.* control) en u.a. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

4.1.6. Estudio del lipidoma del tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas ZDF tras el tratamiento con empagliflozina

En la evaluación del perfil lipidómico del TAV y TAS de rata, realizado mediante UHPLC-MS, se identificaron 246 metabolitos, de los cuales 12 fueron eliminados por encontrarse fuera de su correspondiente intervalo de detección lineal, siendo 234 los metabolitos que se incluyeron en los subsiguientes análisis multivariantes y univariantes. Para facilitar la visualización de los resultados, se generó un *heatmap* (Fig.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.6.) en el que aparecen representados el $\log_2$ (*fold change*) de los 234 metabolitos analizados, junto con los *p*-valor del test t de Student o de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon obtenidos al comparar el TAV y TAS de los 2 grupos, respectivamente. Como se puede observar, el tratamiento con EMPA fue capaz de generar modificaciones significativas en el lipidoma del TA, siendo mayor el efecto en el TAV, donde afectó principalmente a los niveles de oxFA y de DG. Por otra parte, en el TAS se observó un mayor número de modificaciones en los glicerofosfolípidos, como por ejemplo las LPC, las LPE y los LPI. Se elaboró un gráfico tipo *volcano* que permite destacar los metabolitos más significativos, considerados individualmente, presentes en cada uno de los depósitos de TA objeto de estudio (Fig. 4.7.A y 4.7.B) después del tratamiento con EMPA en comparación con el grupo control.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

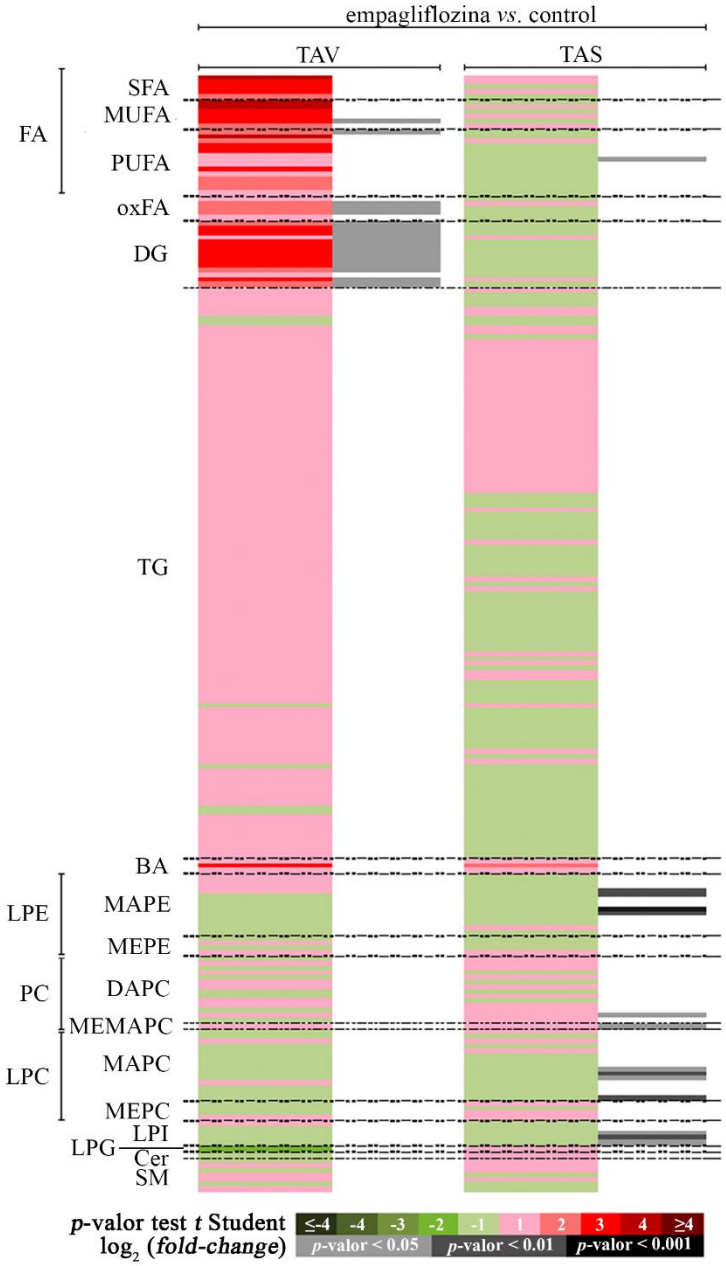


Figura 4.6.: *Heatmap* de los metabolitos alterados en TA de las ratas ZDF tratadas con EMPA. Los metabolitos aparecen ordenados según la clase metabólica a la que pertenecen y, a su vez, según el número de carbonos e insaturaciones que presentan sus cadenas acilo. Los valores del $\log_2$ (*fold change*) y los *p*-valor obtenidos en el análisis con el test t de Student o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon se representaron siguiendo el código de color que aparece en la leyenda de la figura. El color verde representa una disminución ($\log_2$ (*fold change*) negativos) mientras que el color rojo indica el aumento ($\log_2$ (*fold change*) positivos) de los niveles de los metabolitos presentes en el grupo tratado con EMPA *vs.* el grupo control, siendo mayor la modificación cuanto más oscuros sean los colores. Por otra parte, las líneas grises/negras representan el nivel de significancia de los *p*-valor de la prueba t de Student o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (gris claro, $p < 0.05$; gris oscuro, $p < 0.01$; negro, $p < 0.001$). MEMAPC: 1-acil,2-eterglicerofosfatidilcolinas.

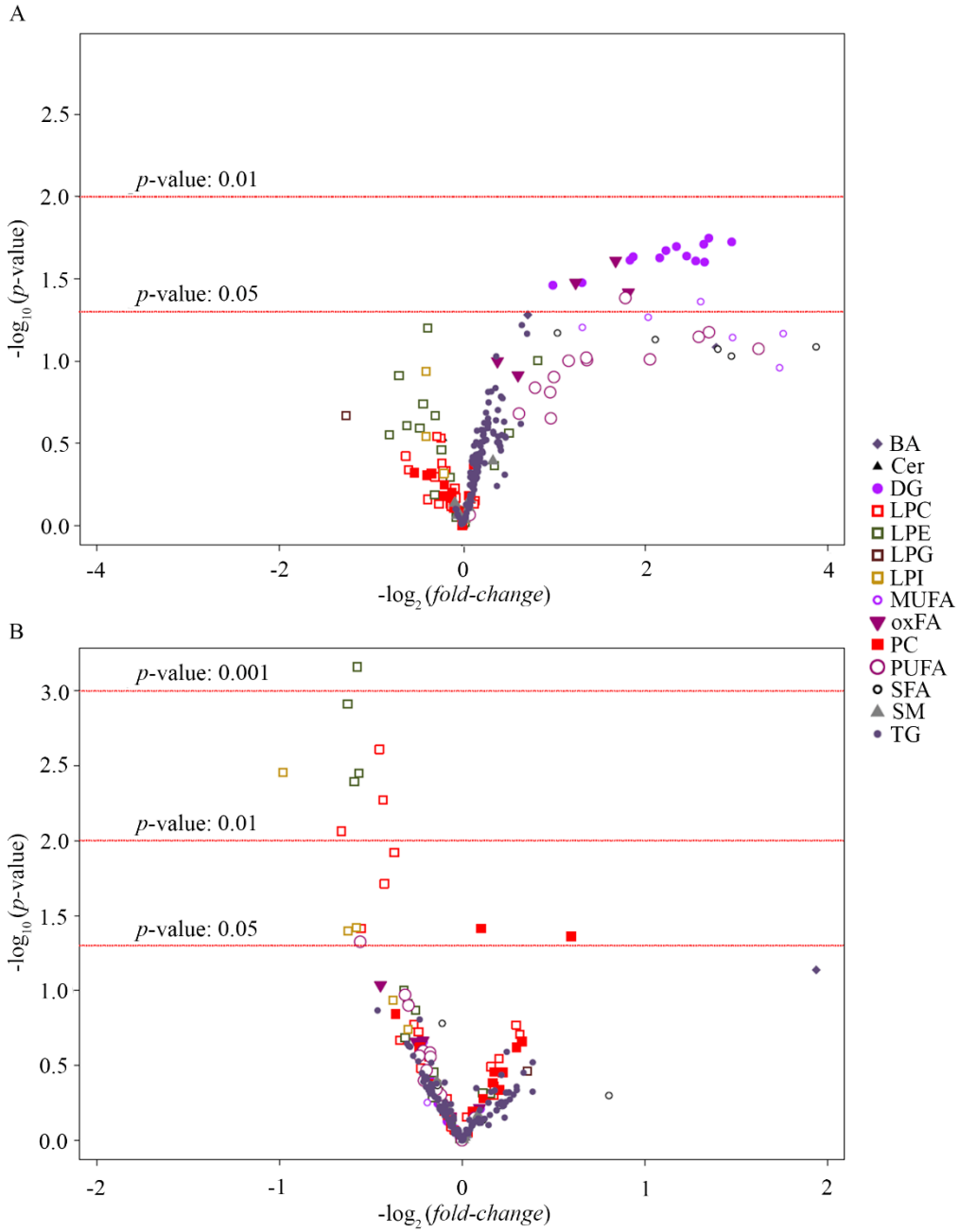


Figura 4.7.: Gráficos tipo *volcano* [-$\log_{10}$ (*p*-valor) con respecto al $\log_2$ (*fold change*)] con los resultados del análisis estadístico tras comparar el tejido adiposo de las ratas ZDF tratadas con EMPA con su respectivo grupo control. Representación gráfica de los metabolitos con cambios más significativos en TAV (*p*-valor < 0.05 y *p*-valor < 0.01) (A) y en el TAS (*p*-valor < 0.05, *p*-valor < 0.01 y *p*-valor < 0.001) (B) considerados de manera individual para la comparación.

Del total de los metabolitos analizados, se observó que el tratamiento de ratas ZDF con 30 mg/kg/día/p.o. de EMPA durante 6 semanas modificó significativamente los niveles de 18 metabolitos en el TAV (Tabla 4.1. y Fig. 4.8.A). 13 de 14 DG aumentaron significativamente en las ratas tratadas, siendo la clase química alterada más notable. Además, el tratamiento con EMPA incrementó significativamente los niveles

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de 3 ácidos oxFA y de 2 FA, como el ácido gadoleico (20:1n-6) y el ácido linoleico (18:2n- 6) (Tabla 4.1. y Fig. 4.8.A).

Por otra parte, la EMPA modificó significativamente los niveles de 14 metabolitos, mayoritariamente glicerofosfolípidos, del TAS en comparación con el grupo control (Tabla 4.2. y Fig. 4.8.B). Se observó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de 4 LPE, 4 LPC y 3 LPI, y niveles significativamente más altos de 2 PC (Tabla 4.2. y Fig. 4.8.B). Además, el tratamiento de las ratas ZDF con EMPA durante 6 semanas redujo significativamente los niveles del PUFA 20:3n-x en el TAS en comparación con el grupo control (Tabla 4.2. y Fig. 4.8.B). Algunos de estos cambios en las clases de metabolitos del TA de las ratas ZDF tratadas con EMPA también se representaron en los diagramas de cajas de la Figura 4.9.

Tabla 4.1.: FA, oxFA y DG cuyos niveles fueron modificados significativamente en TAV de las ratas ZDF tras el tratamiento con EMPA en comparación con los animales control. Se indican los valores del $\log_2$ (*fold change*) y los *p*-valor obtenidos en con el tetst t de Student no pareado (n = 10). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test t de Student no pareado.

Clase	Metabolito	$\log_2$ (*fold change*)	Test t de Student *p*-valor
MUFA	Ácido gadoleico 20:1n-6	2.610	0.043
PUFA	Ácido linoleico 18:2n-6	1.790	0.041
oxFA	13-OxoODE	1.820	0.039
	9,10-DiHOME	1.240	0.034
	12,13-DiHOME	1.680	0.025
DG	DG(32:0)	1.310	0.033
	DG(32:1)	2.560	0.025
	DG(32:2)	2.650	0.025
	DG(34:0)	0.990	0.035
	DG(34:1)	2.230	0.021
	DG(34:2)	2.340	0.020
	DG(36:1)	2.460	0.023
	DG(36:2)	2.640	0.019
	DG(36:3)	2.700	0.018
	DG(36:4)	2.950	0.019
	DG(36:4)	1.840	0.024
	DG(38:5)	2.160	0.024
	DG(38:6)	1.870	0.023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4.2.: Cambios en los niveles de metabolitos del TAS tras el tratamiento con EMPA de las ratas ZDF en comparación con los animales control. Se indican los valores del log_2 (*fold change*) y los *p*-valores obtenidos en con el test t de Student no pareado.

Clase	Metabolito	log_2 (*fold change*)	Test t de Student *p*-valor
PUFA	20:3n-x	-0.560	0.047
LPE	PE(18:2/0:0)	-0.630	0.001
	PE(20:4/0:0)	-0.590	0.004
	PE(0:0/18:1)	-0.580	0.0006
	PE(0:0/18:2)	-0.570	0.004
PC	PC(40:0)	0.100	0.038
	PC(P-16:0/20:4)	0.600	0.043
LPC	PC(0:0/16:1)	-0.550	0.039
	PC(0:0/18:1)	-0.450	0.002
	PC(0:0/20:3)	-0.430	0.019
	LPC(16:1)	-0.660	0.009
LPI	LPI(18:1)	-0.630	0.040
	LPI(20:4)	-0.980	0.004
	LPI(20:4)	-0.580	0.038

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

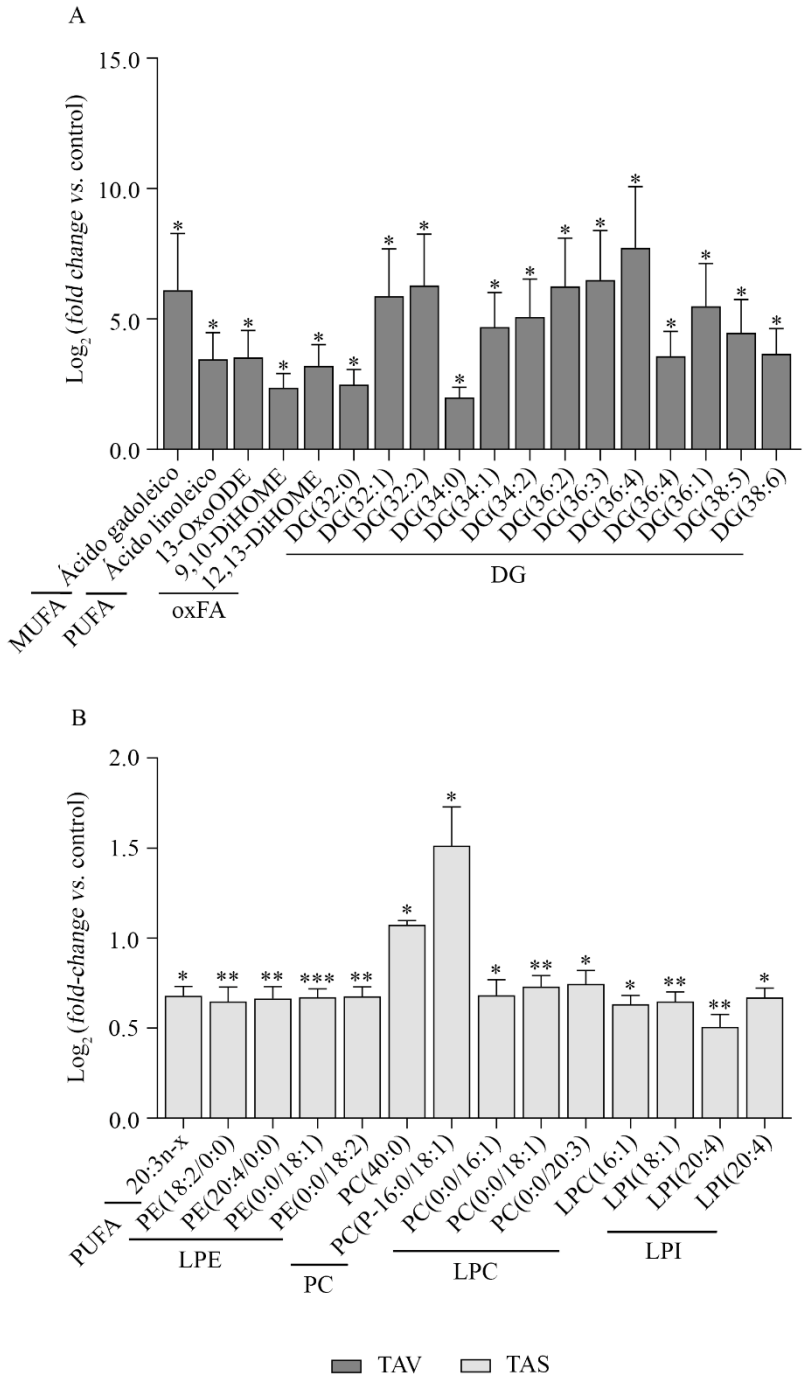


Figura 4.8.: Análisis metabolómico del tejido adiposo de las ratas ZDF tratadas con empagliflozina. Representación gráfica del $\log_2$ (*fold change*) de los metabolitos modificados significativamente en el TAV (A) y TAS (B) de ratas tratadas con EMPA en comparación a las ratas control. El tratamiento con EMPA incrementó significativamente los niveles de varios DG, oxFA, del ácido gadoleico y del ácido linoleico en TAV (A); mientras que en el TAS disminuyó significativamente los niveles de varios tipos de LPI, LPC, PC, LPE y de 1 PUFA (B) en comparación con el grupo control (n = 10). **p*-valor < 0.05, ***p*-valor < 0.01, ****p*-valor < 0.001. Los datos se expresan como media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test t de Student no pareado o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

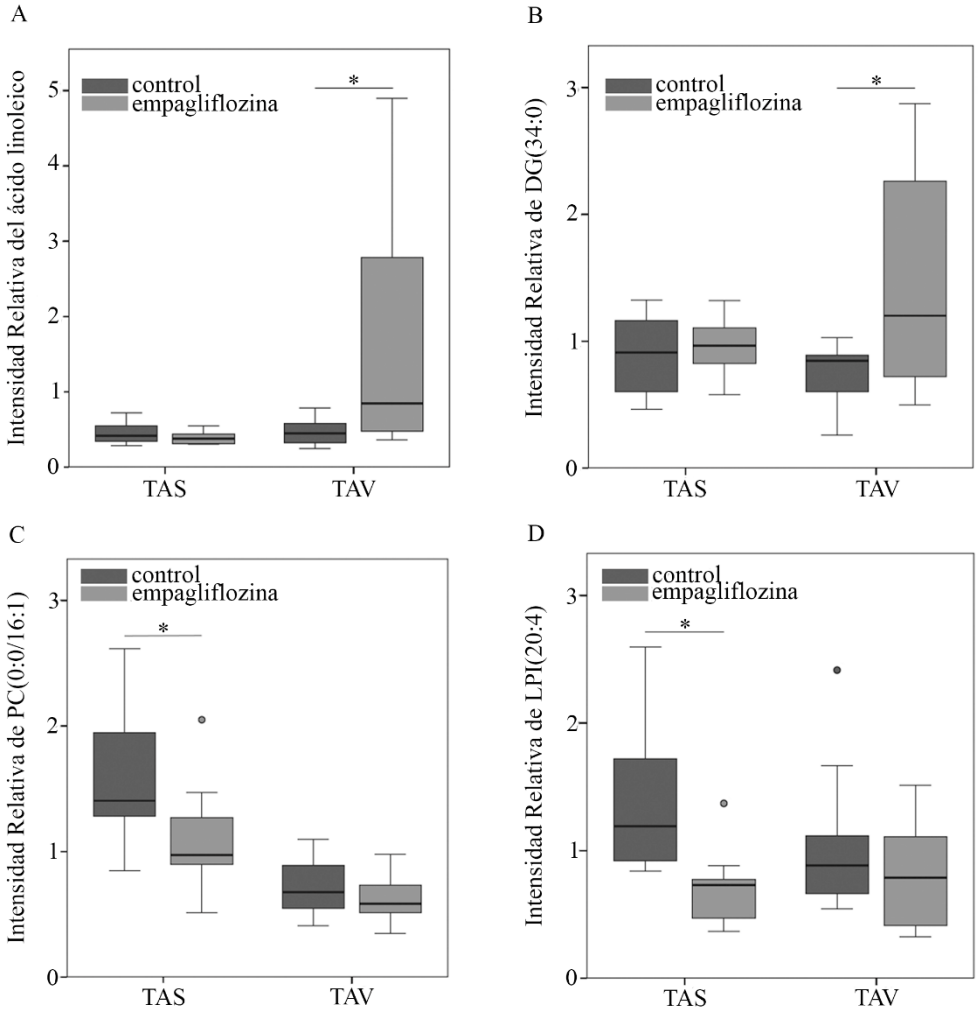


Figura 4.9.: Diagrama de algunos de los metabolitos alterados en el TAV y TAS de ratas control y tratadas con EMPA. Representación gráfica de los cambios producidos en los niveles de ácido linoleico (A), DG(34:0) (B), PC(0:0/16:1) (C) y LPI(20:4) (D) en el TA de ratas ZDF tratadas con EMPA (n = 10). Los valores se han representado como la intensidad relativa de la mediana ± RIC. Test estadístico: test t de Student no pareado o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. **p*-valor < 0.05.

Para completar el análisis de los metabolitos individuales, se calcularon las diferencias en las clases metabólicas como la suma de las áreas normalizadas de todos los metabolitos que presentaban las mismas características químicas. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de los metabolitos individuales, se observó que las clases oxFA y glicerolípidos estaban aumentadas en el TAV de las ratas tratadas con EMPA en comparación con las ratas control, y que la clase glicerofosfolípidos estaba disminuida en el TAS de las ratas tratadas con EMPA en comparación con el control (Tabla 4.3. y Fig. 4.10.).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4.3.: Modificaciones en los niveles de metabolitos en el TAV y TAS de las fatas ZDF tratadas con EMPA en comparación con las ratas control. Se indican los valores del log_2 (*fold change*) y los *p*-valor de la prueba t de Student no pareado o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

		empagliflozina *vs.* control			
		TAV		**TAS**	
Clase	**Metabolito**	**log_2 (*fold change*)**	**Test t de Student *p*-valor**	**log_2 (*fold change*)**	**Test t de Student *p*-valor**
FA	FA. 18.2	1.790	0.041	-0.210	0.253
oxFA	LAdoxFA	1.110	0.036	-0.190	0.208
	DiHOME	1.450	0.028	-0.150	0.337
	oxoODE	1.820	0.039	0.090	0.613
Glicerolípidos	DG	2.130	0.020	-0.050	0.784
	Sat.DG	1.150	0.032	0.040	0.825
	Unsat.DG	2.290	0.020	-0.080	0.685
	Unsat (1=) DG	2.410	0.022	-0.090	0.696
	Unsat (>2=) DG	2.070	0.019	-0.040	0.824
BA	BA	1.390	0.035	0.150	0.691
Glicerofosfolípidos	2-MAPC	-0.090	0.673	-0.290	0.034
	LPE	-0.140	0.664	-0.300	0.039
	1-MAPE	0.220	0.409	-0.400	0.015
	2-MAPE	-0.450	0.189	-0.330	0.030
	MAPE_total	-0.160	0.583	-0.350	0.021
	MAPI	-0.190	0.379	-0.590	0.024

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

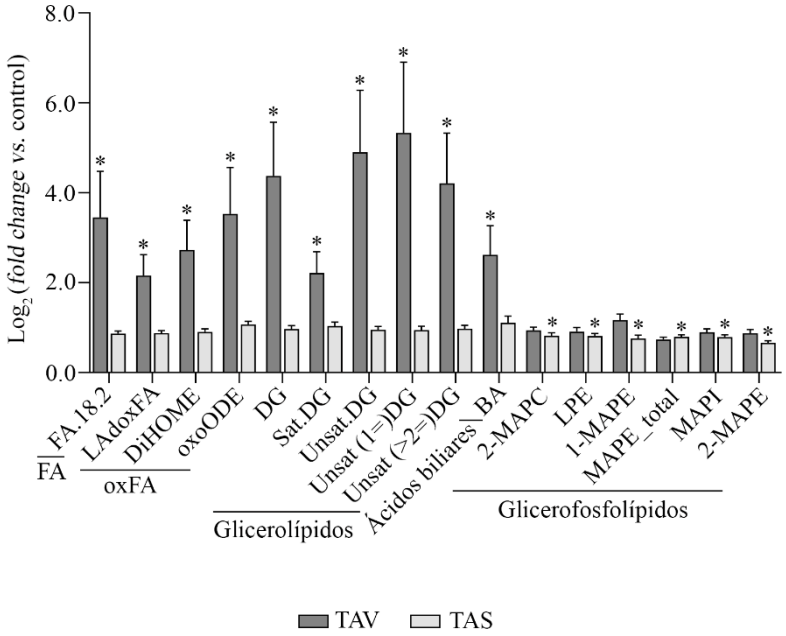


Figura 4.10.: Análisis metabolómico del TA de las ratas ZDF tratadas con EMPA. Representación gráfica de las diferencias en las clases metabólicas de los metabolitos que presentaban las mismas características químicas en ambos TAS (n = 10). **p*-valor < 0.05. Los datos se expresan como media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test t de Student no pareado o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

4.1.7. El tratamiento con empagliflozina modificó el metabolismo lipídico en el tejido adiposo de las ratas ZDF

En relación con los resultados obtenidos en el análisis del lipidoma del TA de las ratas ZDF se decidió estudiar si el tratamiento con EMPA era capaz de modificar los niveles de expresión génica de Pnpla2 y Lipe, genes que codifican las enzimas clave en la en la degradación de los TG (ATGL y HSL) [649], y del transportador Cd36, encargado del transporte de FA y de su incorporación en los TG [650,651], en el TAV y TAS de las ratas ZDF.

Se observó que, tras el tratamiento con EMPA durante 6 semanas, se incrementaba significativamente la expresión génica de las enzimas lipolíticas Lipe en el TAV (*p*-valor = 0.023, n = 8) y en el TAS (*p*-valor = 0.019, n = 9) (Fig. 4.11.A), y Pnpla2 en el TAV (*p*-valor = 0.042, n = 11) (Fig. 4.11.B) de las ratas ZDF en comparación con el grupo control. Además, la EMPA fue capaz de reducir significativamente la expresión génica de Cd36 en el TAV (*p*-valor = 0.004, n = 15) y en el TAS (*p*-valor = 0.021, n = 16) (Fig. 4.11.C) de las ratas ZDF en comparación con el grupo control.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

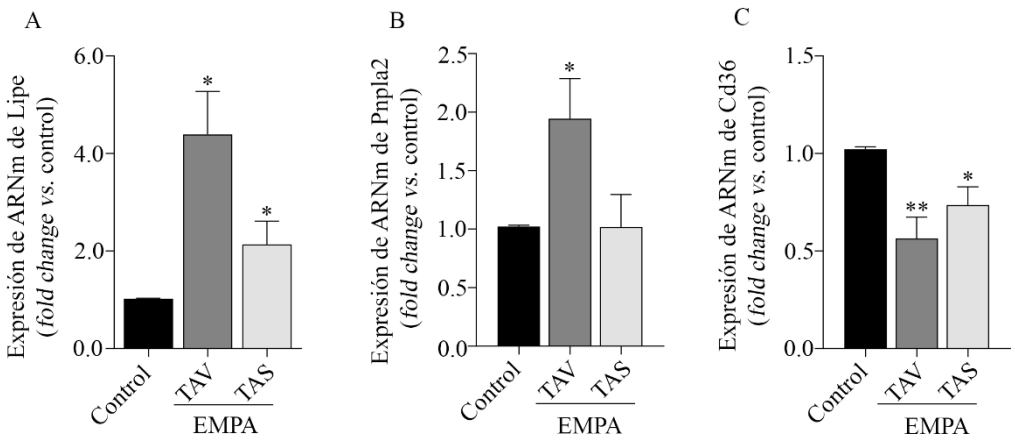


Figura 4.11.: Evaluación mediante RT-PCR de los niveles de expresión génica de enzimas lipolíticas y del transportador de FA Cd36 en el TA de ratas macho ZDF después del tratamiento con EMPA. El tratamiento con EMPA incrementó significativamente los niveles de ARNm de las enzimas lipolíticas lipasa E (Lipe) en ambos TA (n = 8 en el TAV, n = 9 en el TAS) (A), y *patatin-like phospholipase domain containing 2* (Pnpla2) en el TAV (n = 11) (B); y disminuyó significativamente los niveles de ARNm del clúster de diferenciación 36 o translocasa de FA (Cd36) (n = 15 en el TAV, n = 16 en el TAS) en ambos TA en comparación con el grupo control. **p*-valor < 0.05, ***p*-valor < 0.01. Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al control (*fold change vs.* control) en u.a. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL LBQ657 + VALSARTÁN *IN VITRO*

4.2.1. Efecto *in vitro* del LBQ657 + valsartán sobre la viabilidad cardiomiocitaria

El ensayo de MTT permitió evaluar el posible efecto del tratamiento con LBQ657 + VAL 10 y 20 µM durante 24 horas sobre la viabilidad y actividad metabólica de la línea celular HL-1 y de los cardiomiocitos neonatales de rata. Como se puede observar en la Figura 4.12., el tratamiento con las dosis de 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL durante 24 horas no modificó los niveles de actividad metabólica de la línea celular HL-1 (10 µM: *p*-valor = 0.886, n = 4; 20 µM: *p*-valor = 0.486, n = 4) (Fig. 4.12.A) ni del cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata (10 µM: *p*-valor = 0.886, n = 4; 20 µM: *p*-valor = 0.743, n = 4) (Fig. 4.12.B) con respecto a sus respectivos vehículos.

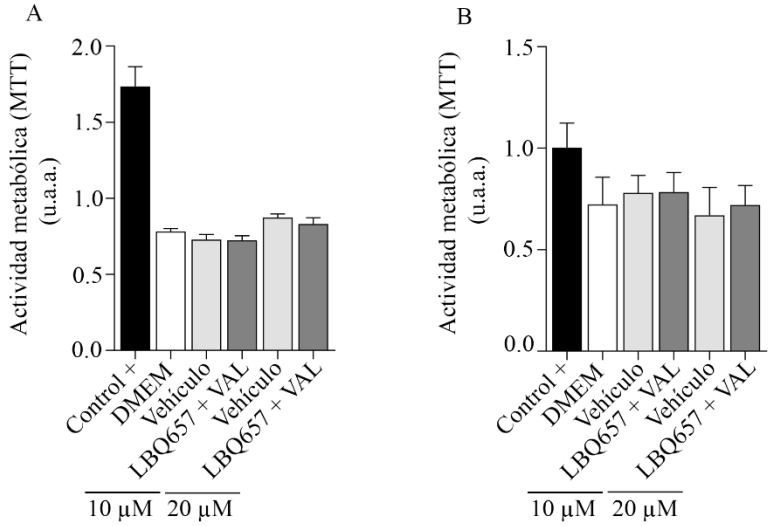


Figura 4.12.: Efecto del LBQ657 + VAL en la viabilidad cardiomiocitaria *in vitro* evaluada como actividad metabólica utilizando el ensayo MTT. Los experimentos de MTT demostraron que el tratamiento con LBQ657 + VAL a dosis de 10 y 20 µM durante 24 horas no tiene efectos sobre la actividad metabólica y, por tanto, sobre la viabilidad de la línea celular HL-1 (A) (n = 4) ni de los cardiomiocitos neonatales de rata (B) (n = 4). Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto su respectivo vehículo en unidades arbitrarias de absorbancia (u.a.a.) a 550 nm. Las comparaciones de las diferentes dosis de tratamiento y el correspondiente vehículo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

4.2.2. Efecto del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la captación de ácidos grasos en la línea celular HL-1

Los ensayos de captación de FA de la línea celular HL-1 permitieron evaluar los posibles efectos del tratamiento con las dosis 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL en la incorporación celular de FA. Una captación excesiva de FA en situaciones donde su oxidación está reducida, como es el caso de la IC, produce acumulación de lípidos en el miocardio incrementando el daño cardíaco [310,652]. Los resultados obtenidos muestran que las dosis de 10 µM (*p*-valor = 0.125, n = 4) y 20 µM (*p*-valor > 0.999, n = 4) de LBQ657 + VAL empleadas no afectaron a la captación de FA por la línea celular HL-1, como se observa en la Figura 4.13.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

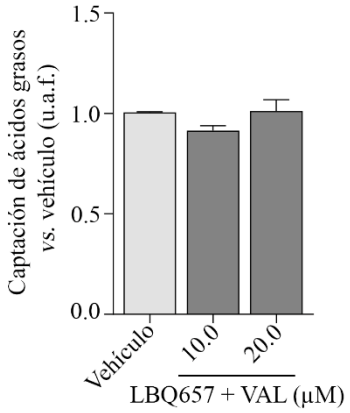


Figura 4.13.: Representación gráfica de la captación del ácido 3-dodecanoico marcado con el fluoróforo BODIPY® en cardiomiocitos atriales de ratón adulto HL-1 tras el tratamiento con LBQ657 + VAL. El tratamiento con 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL no modificó la captación de FA de la línea celular HL-1 en comparación a su respectivo vehículo (n = 4). Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al vehículo (*fold change vs.* vehículo) en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f.). Las comparaciones de las diferentes dosis de tratamiento y el correspondiente vehículo se realizaron mediante el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

4.2.3. Efecto del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la movilización del receptor de glucosa GLUT4 en cardiomiocitos neonatales de rata

Se demostró que el tratamiento durante 30 minutos con las dosis 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL de cardiomiocitos neonatales de rata (10 µM: *p*-valor > 0.999, n = 4; 20 µM: *p*-valor = 0.686, n = 4) no induce la movilización de GLUT4 desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular en comparación a su correspondiente vehículo (Fig. 4.14.A y 4.14.B).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

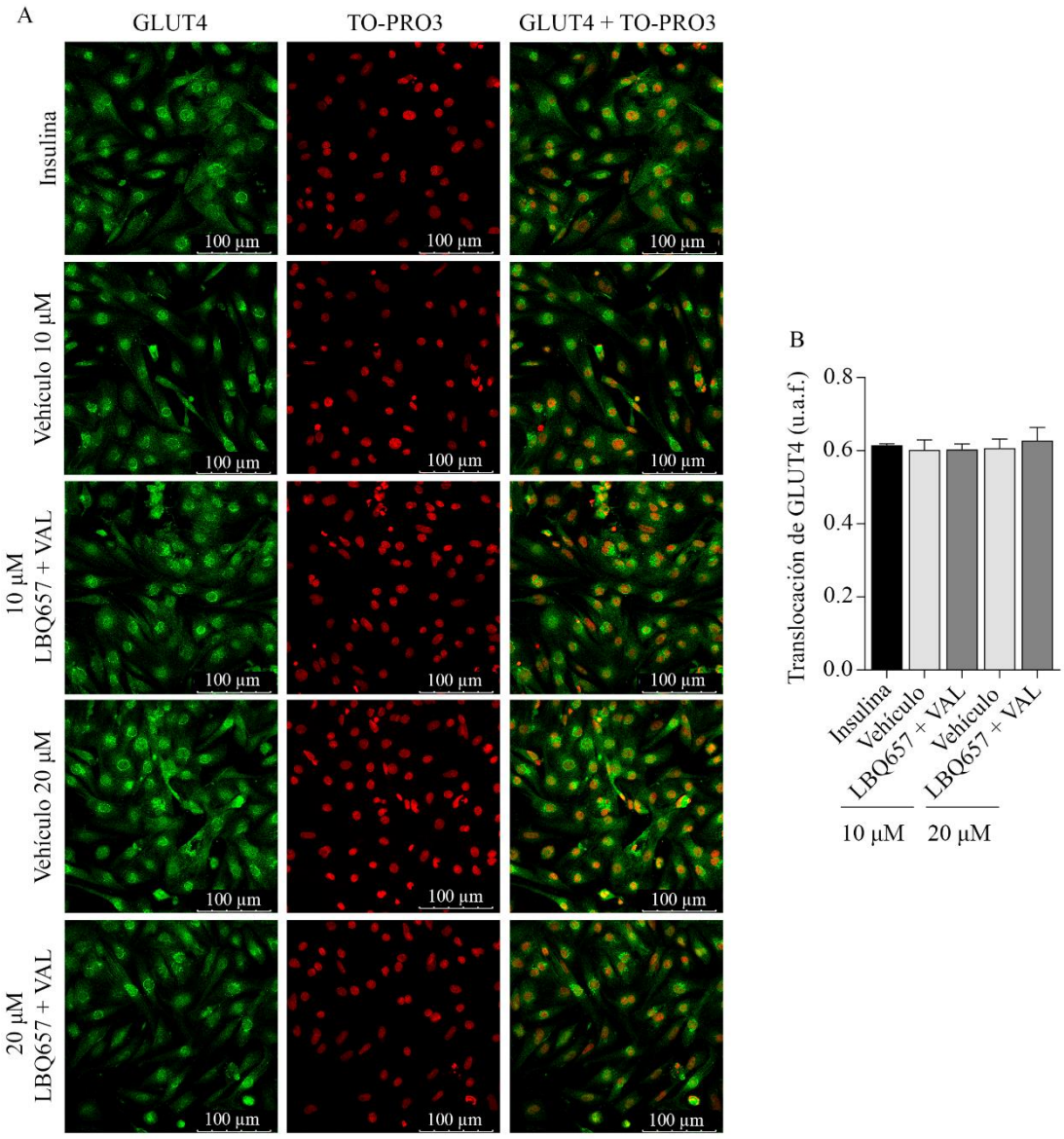


Figura 4.14.: Evaluación de los efectos del tratamiento con LBQ657 + VAL en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 en los cardiomiocitos neonatales de rata. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (aumento x40) de la localización del transportador de glucosa GLUT4 y del núcleo celular tras el tratamiento con LBQ657 + VAL (A). Representación gráfica del cociente entre la fluorescencia de GLUT4 en la periferia celular y las regiones citoplasmáticas perinucleares después del tratamiento de los cardiomiocitos neonatales de rata tratados con las dosis 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL (n = 4) (B). Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al vehículo en u.a.f. Las comparaciones de las diferentes dosis de tratamiento y el correspondiente vehículo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.4. Evaluación de los efectos del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la lipólisis en cardiomiocitos neonatales de rata

Como se describió previamente, la acumulación de lípidos juega un papel importante en la disfunción miocárdica [310,652] por lo que se decidió evaluar si el tratamiento con las dosis 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL tenía algún efecto en los niveles de expresión génica de Lipe y del transportador Cd36, en el cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento, aunque no estadísticamente significativo, de los niveles de expresión génica de Cd36 con la dosis 20 µM de LBQ657 + VAL (*p*-valor = 0.063, n = 5) (Fig. 4.15.A), y de Lipe con ambas dosis del tratamiento con LBQ657 + VAL (10 µM: *p*-valor = 0.313, n = 5; 20 µM: *p*-valor = 0.313, n = 5) (Fig. 4.15.B), en comparación con sus respectivos vehículos.

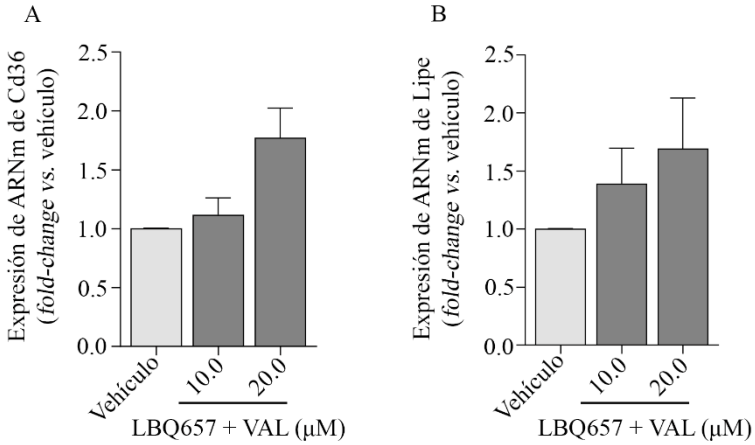


Figura 4.15.: Evaluación mediante RT-PCR de los niveles de expresión génica de la enzima lipolítica Lipe y del transportador de FA Cd36 en cardiomiocitos neonatales de rata después del tratamiento con 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL durante 24 horas en condiciones de medio normales. El tratamiento con LBQ657 + VAL indujo un aumento de los niveles de ARNm del clúster de diferenciación 36 o translocasa de ácidos grasos (Cd36) al emplear la dosis 20 µM (n = 5) (A), y de la enzima lipolítica lipasa E (Lipe) con ambas dosis (n = 5) (B), aunque no de manera significativa, en comparación con sus respectivos vehículos. Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al vehículo (*fold change vs.* vehículo) en u.a. Las comparaciones de las diferentes dosis de tratamiento y el correspondiente vehículo se realizaron mediante test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

4.2.5. Efecto del tratamiento con LBQ657 + valsartán sobre la regulación de la autofagia en cardiomiocitos neonatales de rata

La autofagia es un proceso fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que se encarga de la degradación de proteínas u orgánulos celulares dañados a través de los autofagosomas, y su deterioro en los cardiomiocitos juega un papel fundamental en el desarrollo de ECVs como la IC [653,654]. De los marcadores de autofagia conocidos cabe destacar la proteína 1 de cadena ligera 3 asociada al microtúbulo (LC3, *microtubule associated protein 1 light chain*) y la proteína adaptadora p62 (o *sequestosome-1*, p62/SQTSM-1) [655].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Durante el proceso de autofagia, una membrana de aislamiento o fagoporo se extiende y atrapa ciertos componentes citoplasmáticos como proteínas, orgánulos y ribosomas, formando una estructura esférica de doble capa conocida como autofagosoma [653,656,657]. Paralelamente, durante la autofagia, la proteína citosólica LC3I, obtenida por la proteólisis de su forma no procesada proLC3, es activada por acción de la proteína 7 relacionada con la autofagia (Atg7, *autophagy related 7*), transferida a la proteína 3 relacionada con la autofagia (Atg3, *autophagy related 3*), y finalmente unida a un resto de PE obteniendo la forma conjugada LC3II, la cual se encuentra en las membranas y se asocia con el fagoporo y el autofagosoma [658–660]. La proteína p62 interactúa directamente con LC3 en el fagoporo, y con proteínas poliubiquitiniladas que serán degradadas, lo que favorece su incorporación en el autofagosoma para su posterior degradación [658,661,662]. Por lo tanto, LC3II aporta información acerca del número aproximado de fagosomas formados, mientras que los niveles citoplasmáticos de p62 se correlacionan negativamente con los niveles de autofagia [663,664]. El autofagosoma se une a los lisosomas (autolisosoma), lo que provoca la degradación de su contenido y de la membrana interna por acción de las proteasas ácidas lisosomales, obteniéndose como producto AA, FA, etc. que son liberados en el citoplasma para su reutilización [653,657,665].

Debido a la importancia de la autofagia a nivel cardíaco, hemos decidido evaluar el efecto del tratamiento con las dosis de 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL durante 24 horas sobre los niveles de expresión proteica de los marcadores de autofagia LC3 y p62 de los cardiomiocitos neonatales de rata empleando diferentes condiciones de medio y suero.

Se observó que el tratamiento de los cardiomiocitos neonatales de rata con las dosis de 10 y 20 µM de LBQ657 + VAL en condiciones normales de medio de cultivo produjo un incremento significativo de los niveles de expresión de LC3II/LC3I/α-Tubulina (10 µM: *p*-valor = 0.031, n = 6; 20 µM: *p*-valor = 0.031, n = 6) (Fig. 4.16.A), pero no al realizar una deprivación de suero durante 16 horas (10 µM: *p*-valor = 0.438, n = 5; 20 µM: *p*-valor = 0.156, n = 5) (Fig. 4.16.A), en comparación con sus respectivos vehículos. Por otra parte, el tratamiento con ambas dosis de LBQ657 + VAL no modificó los niveles de expresión proteica de p62/α-Tubulina en ambas condiciones de medio de cultivo (Fig. 4.16.B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

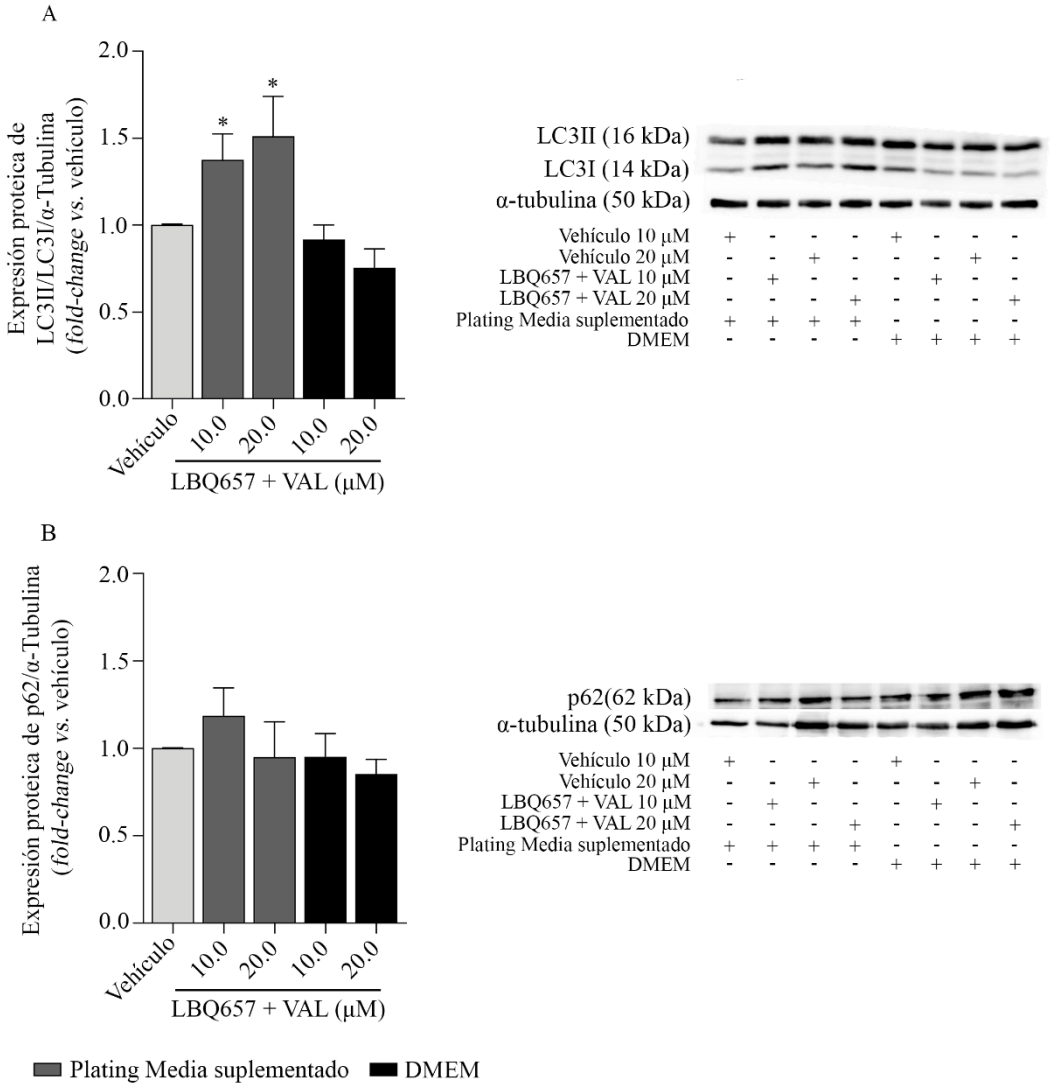


Figura 4.16.: Efecto del tratamiento con LBQ657 + VAL sobre los niveles de expresión proteica de los marcadores de autofagia LC3 y p62 en cardiomiocitos neonatales de rata. Representación gráfica del análisis estadístico e imagen representativa de los resultados obtenidos mediante la técnica de Western Blot, en los cuales se muestra que el tratamiento con las dosis de 10 y 20 μM de LBQ657 + VAL incrementó significativamente los niveles de expresión de LC3II/LC3I/α-Tubulina tras 24 horas de tratamiento en condiciones normales de medio (Plating media) (n = 5-6), pero no al realizar una deprivación de suero de 16 horas con DMEM (n = 5-6) en cardiomiocitos neonatales de rata en comparación con sus respectivos vehículos (A). Representación gráfica del análisis estadístico e imagen representativa de los resultados obtenidos por Western Blot, en los cuales se muestra que el tratamiento con las dosis 10 y 20 μM de LBQ657 + VAL no modificó los niveles de expresión de p62/α-Tubulina tras 24 horas de tratamiento en ambas condiciones de medios (n = 6) en cardiomiocitos neonatales de rata en comparación con sus respectivos vehículos (B). Los datos se expresaron como media ± SEM con respecto al control (*fold change vs.* control) en u.a. Las comparaciones entre diferentes dosis de tratamiento y el correspondiente vehículo se realizaron mediante test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SACUBITRIL/VALSARTÁN EN EL METABOLISMO CARDÍACO DE RATAS ZSF1

4.3.1. El tratamiento con sacubitril/valsartán no modificó los parámetros metabólicos de las ratas ZSF1

Durante las 9 semanas de tratamiento con SAC/VAL se realizó un registro del peso corporal y de la ingesta de comida y bebida de los animales semanalmente. Como era de esperar, el peso de todos los animales obesos fue significativamente mayor en comparación con el grupo no obeso control (*p*-valor < 0.0001, estadística no mostrada en la Figura 4.17.). A medida que avanzó el procedimiento experimental, se produjo un incremento del peso de todos los animales y, aunque se observó un menor incremento del peso corporal del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el grupo obeso control, esta reducción solo resultó ser significativa a la semana 20 de edad de los animales (*p*-valor = 0.036, n = 10) (Fig. 4.17.).

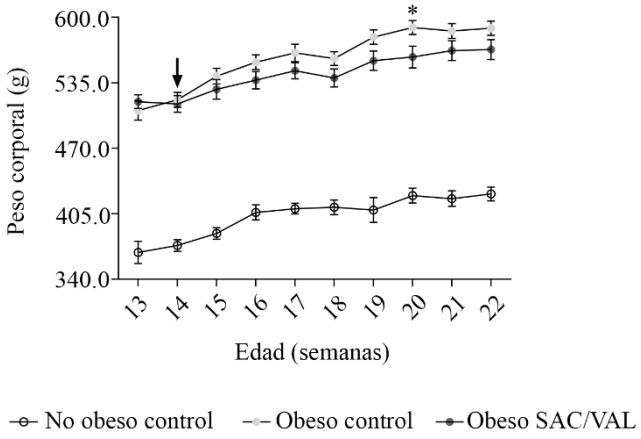


Figura 4.17.: Evaluación del peso corporal de las ratas ZSF1 durante las 9 semanas de tratamiento. Se observó que, durante el procedimiento experimental, el peso corporal del grupo obeso SAC/VAL no aumentó tanto como el del grupo obeso control, aunque esta reducción solo fue estadísticamente significativa tras 6 semanas de tratamiento. **p*-valor < 0.05 (n = 10 para los grupos obesos y n = 9 para el grupo no obeso control). Los datos se expresaron como media ± SEM en g. Las comparaciones entre el grupo SAC/VAL obeso y el grupo control obeso se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

La ingesta de comida y agua de ambos grupos obesos fluctuó de manera aleatoria, aunque siempre fue significativamente mayor que la del grupo no obeso control (*p*-valor < 0.0001, estadística no mostrada en las Figuras 4.18.A y 4.18.B). El tratamiento de las ratas ZSF1 con SAC/VAL redujo significativamente la ingesta de alimentos del grupo obeso SAC/VAL en las primeras 4 semanas de tratamiento en comparación con el grupo obeso control (Fig. 4.18.A); sin embargo, no indujo cambios en la ingesta de bebida de los animales durante el procedimiento experimental (Fig. 4.18.B). Es importante mencionar que las variaciones observadas en los parámetros metabólicos a las 14, 18 y 22 semanas de edad pueden estar alteradas debido a la realización de diversas pruebas durante estas semanas que implicaban el uso de anestésicos o de períodos de ayuno.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

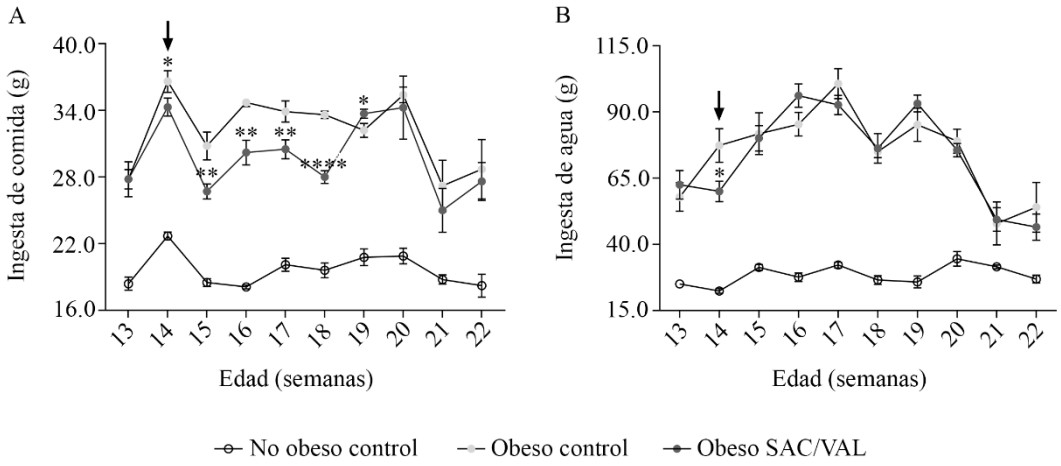


Figura 4.18.: Registro de la ingesta de alimentos y agua de las ratas ZSF1 durante las 9 semanas de tratamiento con SAC/VAL. El SAC/VAL indujo cambios significativos en la ingesta de comida durante las 4 primeras semanas de tratamiento (n = 8-10) (A), pero no tuvo efectos en la ingesta de agua (n = 8-10) (B). **p*-valor < 0.05, ***p*-valor < 0.01, *****p*-valor < 0.0001. Los datos se expresaron como media ± SEM en g. Las comparaciones entre el grupo SAC/VAL obeso y el grupo control obeso se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Como se describió en el apartado 3.2.2. las ratas ZSF1-obesas son un modelo adecuado de SMet que presenta un metabolismo de la glucosa alterado y que termina desarrollando DMT2 [558,560]. Es por esto por lo que durante el procedimiento experimental se realizaron las pruebas de TOG y de RI para evaluar los posibles efectos del tratamiento con SAC/VAL en el metabolismo de la glucosa.

A las 14 semanas de edad de los animales y previamente al inicio del tratamiento con SAC/VAL, ambos grupos de animales obesos presentaron un deterioro significativo de la TOG (grupo obeso control *vs.* no obeso control: *p*-valor < 0.0001, n = 10; grupo obeso SAC/VAL *vs.* no obeso control: *p*-valor < 0.0001, n = 10) (Tabla 4.4. y Fig. 4.19.A) y RI (grupo obeso control *vs.* no obeso control: *p*-valor < 0.0001, n = 10; grupo obeso SAC/VAL *vs.* no obeso control: *p*-valor < 0.0001, n = 10) (Tabla 4.4. y Fig. 4.19.B), indicativos de la presencia de DMT2, en comparación con el grupo no obeso control. A medida que avanzó el tratamiento, se observó una ligera mejora en los valores del AUC obtenidos en el test de la TOG (Tabla 4.4. y Fig. 4.19.A) y de la RI (Tabla 4.4. y Fig. 4.19.B) de los animales obesos SAC/VAL frente al grupo de control obeso, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4.4.: Pruebas de TOG y RI en los diferentes grupos de ratas ZSF1. Análisis del AUC calculada a partir de la respuesta temporal de los niveles de glucosa en sangre de las pruebas TOG e IR (n = 8-10). Grupo no obeso control *vs.* obeso control: $^{\$}p$-valor < 0.01; $^{\$\$\$}p$-valor < 0.001; $^{\$\$\$\$}p$-valor < 0.0001. Grupo no obeso control *vs.* obeso SAC/VAL: $^{\downarrow}p$-valor < 0.05; $^{\downarrow\downarrow}p$-valor < 0.01; $^{\downarrow\downarrow\downarrow}p$-valor < 0.001; $^{\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}p$-valor < 0.0001. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

		No obeso control	Obeso control	Obeso SAC/VAL
14 semanas	**AUC TOG (mg/min/dL)**	$13188 \pm 99.37^{\$\$\$\$,\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}$	43113 ± 2339	38772 ± 2573
	AUC RI (mg/min/dL)	$8321 \pm 481.50^{\$\$\$\$,\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}$	26502 ± 2892	25373 ± 3142
18 semanas	**AUC TOG (mg/min/dL)**	$13261 \pm 336.20^{\$\$\$\$,\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}$	39260 ± 2894	39401 ± 2244
	AUC RI (mg/min/dL)	$6815 \pm 294.70^{\$\$\$\$,\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}$	23029 ± 1850	25053 ± 3286
22 semanas	**AUC TOG (mg/min/dL)**	$12257 \pm 395.20^{\$\$\$\$,\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}$	37118 ± 3089	31715 ± 2296
	AUC RI (mg/min/dL)	$7974 \pm 441.00^{\$\$\$\$,\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow}$	23229 ± 2181	19343 ± 1635

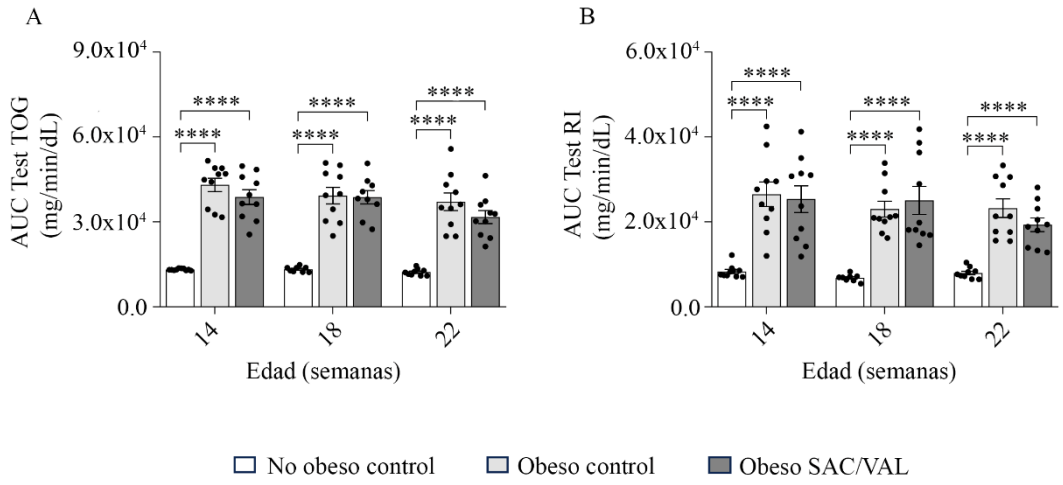


Figura 4.19: Representación gráfica de la respuesta de los animales ZSF1 a los test de TOG y RI durante las 9 semanas de tratamiento con SAC/VAL. El SAC/VAL no modificó significativamente los valores del AUC, calculada a partir de la tiempo-respuesta de los niveles de glucosa en sangre, de los test de TOG (A) y de RI (B) (n = 8-10). ****p-valor < 0.0001. Los datos se expresaron como media ± SEM en mg/min/dL. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Otro paso importante en la caracterización de las ratas ZSF1 y en la evaluación de los efectos del tratamiento con SAC/VAL fue el registro de ciertos parámetros metabólicos antes de la finalización del procedimiento experimental. Para ello, los animales fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas que permitieron evaluar la ingesta calórica (Fig. 4.20.A) y de agua (Fig. 4.20.B), así como la producción de orina (Fig. 4.20.C) y heces (Fig. 4.20.D) durante 24 horas. El grupo control obeso presentó un incremento significativo de la ingesta calórica (p-valor = 0.022, n = 9-10) (Fig. 4.20.A) y de agua (p-valor = 0.004, n = 9-10) (Fig. 4.20.B), y de la producción de orina (p-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.20.C) y heces (p-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.20.D) durante 24 horas en comparación con el grupo no obeso control. Sin embargo, el tratamiento durante 9 semanas con SAC/VAL no modificó ninguno de estos parámetros metabólicos en comparación con el grupo obeso control (Fig. 4.20.).

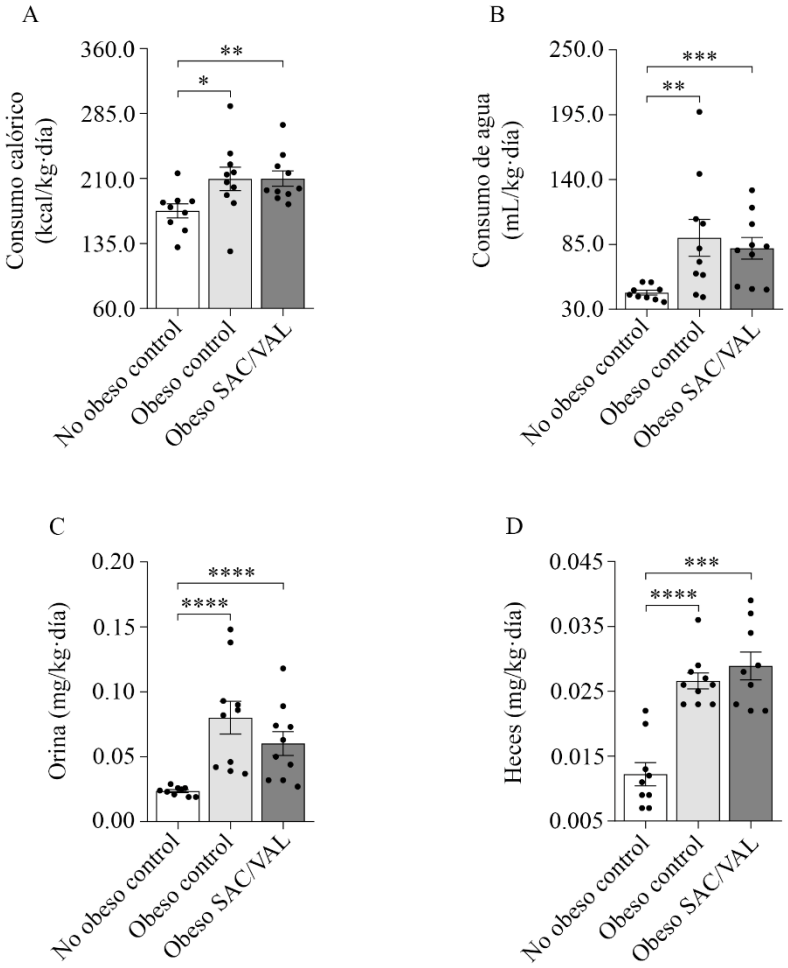


Figura 4.20.: Registro de parámetros metabólicos de las ratas macho ZSF1 al finalizar el tratamiento de 9 semanas con SAC/VAL. El tratamiento con SAC/VAL no tuvo efectos en la ingesta calórica (A) y de agua (B), ni en la producción de orina (C) y heces (D) de las ratas ZSF1 alojadas en jaulas metabólicas durante 24 horas (n = 9-10). *p-valor < 0.05; **p-valor < 0.01; ***p-valor < 0.001; ****p < 0.0001. Los datos se expresaron como media ± SEM en kcal/kg·día, mL/kg·día y mg/kg·día. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.2. Características generales de las ratas ZSF1 tras el tratamiento con sacubitril/valsartán

Previamente a los sacrificios de los animales se registró su peso corporal. Además, debido a las alteraciones en el metabolismo de la glucosa características de las ratas ZSF1-obesas, se midieron los niveles de glucosa y de cetonas en sangre en condiciones normales para observar los posibles efectos del tratamiento con SAC/VAL. En concordancia con los resultados previamente explicados en el apartado 4.3.1 de esta tesis doctoral, el tratamiento con SAC/VAL no modificó el peso corporal (*p*-valor = 0.271, n = 10) (Fig. 4.21.A) de las ratas ZSF1 en comparación con el grupo obeso control tras 9 semanas de tratamiento. Tampoco se observaron modificaciones en los niveles de glucosa (*p*-valor = 0.700, n = 10) (Fig. 4.21.B) y cetonas (*p*-valor = 0.701, n = 10) (Fig. 4.21.C) en sangre del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el grupo obeso control.

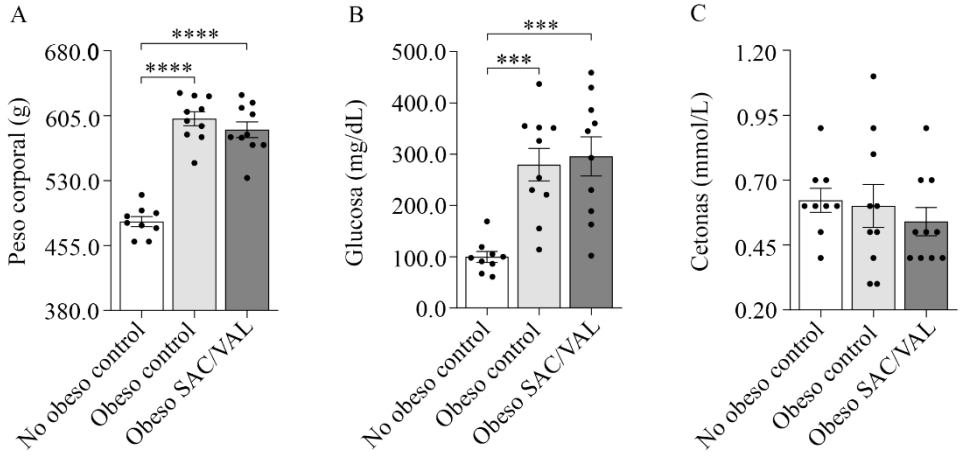


Figura 4.21.: Características generales de las ratas ZSF1 tras el tratamiento con SAC/VAL. El tratamiento con SAC/VAL no modificó el peso corporal (A) ni los niveles de glucosa (B) y cetonas (C) de las ratas ZSF1 antes su sacrificio (n = 9-10). ****p*-valor < 0.001; *****p*-valor < 0.0001. Los datos se expresaron como media ± SEM en g, mg/dL y mmol/L. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

En el momento del sacrificio se registró el peso de todos los órganos extraídos para evaluar los posibles efectos del tratamiento con 68 mg/kg/día/p.o. con SAC/VAL. Se registraron los pesos, normalizado por la LT, del corazón, hígado, bazo, grasa perigonadal, ambos riñones, grasa perirrenal, músculo gastrocnemio, ambos pulmones, y páncreas (Fig. 4.22.).

Se observó que el grupo obeso control presentaba un incremento significativo del peso normalizado por la LT de la mayoría de los órganos evaluados: corazón (*p*-valor = 0.003, n = 9-10) (Fig. 4.22.A), hígado (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.22.B), bazo (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.22.C), grasa perigonadal (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.22.D), riñones (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.22.E), grasa perirrenal (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.22.F); en comparación con el grupo no obeso control. Por el contrario, el peso del gastrocnemio de las ratas ZSF1-obesas era significativamente menor (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.22.G) que en el grupo no

obeso control. El peso de los pulmones (*p*-valor = 0.278, n = 9-10) (Fig. 4.22.H) y del páncreas (*p*-valor = 0.661, n = 9-10) (Fig. 4.22.I), normalizado por la LT, no sufrió variaciones entre ambos grupos.

El tratamiento con SAC/VAL fue capaz de reducir significativamente el peso normalizado por la LT del corazón (*p*-valor < 0.0001, n = 10) (Fig. 4.22.A), hígado (*p*-valor = 0.029, n = 10) (Fig. 4.22.B), bazo (*p*-valor = 0.019, n = 10) (Fig. 4.22.C) y de la grasa perigonadal (*p*-valor = 0.002, n = 10) (Fig. 4.22.D), en comparación con el grupo obeso control. Sin embargo, el peso de los riñones (*p*-valor = 0.393, n = 10) (Fig. 4.22.E), grasa perirrenal (*p*-valor = 0.063, n = 10) (Fig. 4.22.F), gastrocnemio (*p*-valor = 0.853, n = 10) (Fig. 4.22.G), pulmones (*p*-valor = 0.631, n = 10) (Fig. 4.22.H), y páncreas (*p*-valor = 0.481, n = 10) (Fig. 4.22.I) no fuero alterado por el tratamiento con SAC/VAL en comparación con el grupo obeso control.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

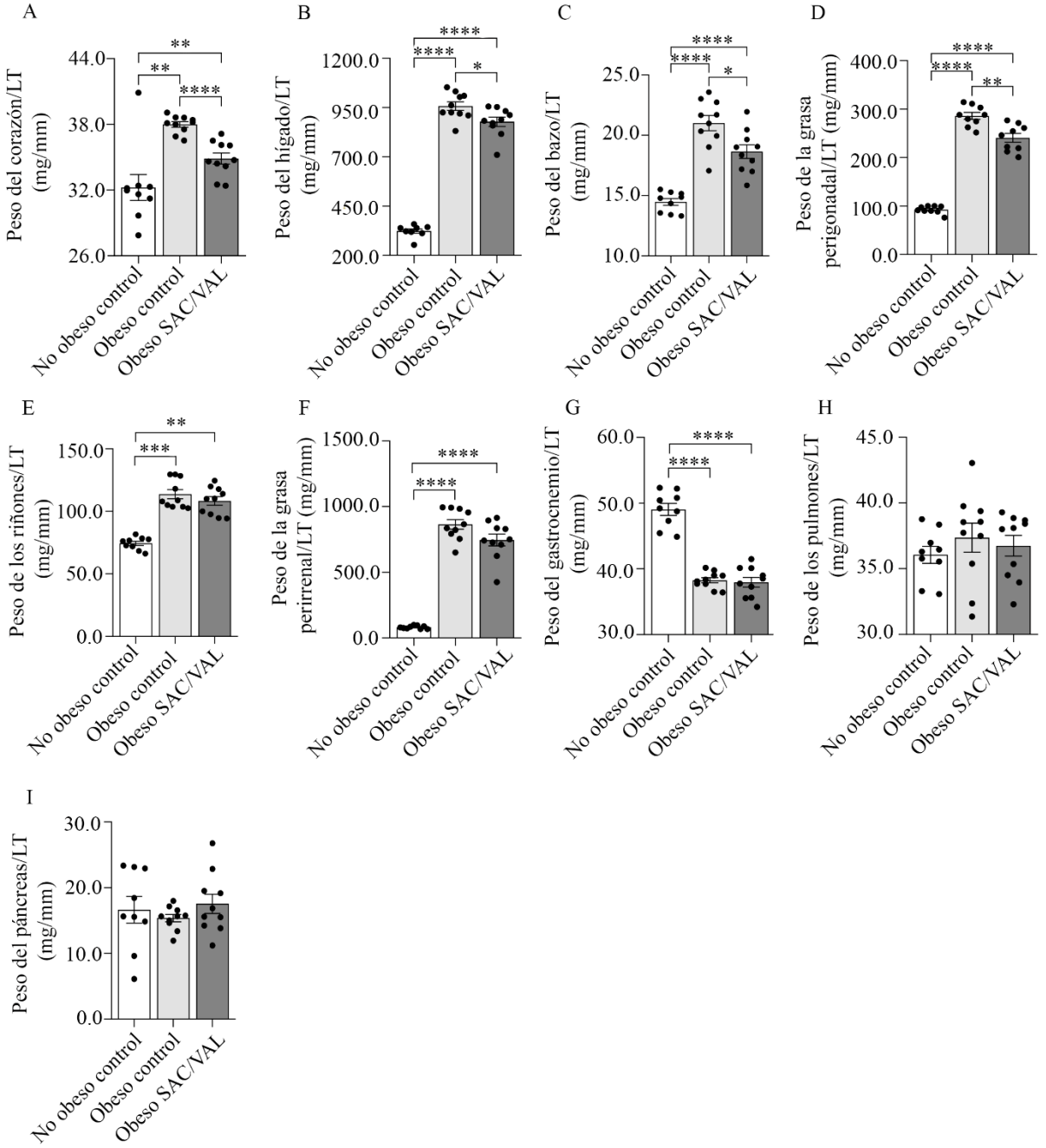


Figura 4.22.: Efectos del tratamiento con SAC/VAL durante 9 semanas en los parámetros morfométricos de las ratas ZSF1. El tratamiento con SAC/VAL redujo significativamente el peso del corazón (A), del hígado (B), del bazo (C) y de la grasa perigonadal (D) normalizado por la LT en comparación con el grupo obeso control. El peso de los riñones (E), la grasa perirrenal (F), el gastrocnemio (G), los pulmones (H), y el páncreas (I) no fue modificado por el tratamiento con SAC/VAL en las ratas ZSF1 (n = 9-10). **p*-valor < 0.05; ***p*-valor < 0.01; ****p*-valor < 0.001; *****p*-valor < 0.0001. Los datos se expresaron como media ± SEM en mg/mm. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los análisis bioquímicos del suero obtenido después del sacrificio de los animales demostraron que las ratas ZSF1-obesas también se caracterizan por la presencia de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y niveles séricos elevados de transaminasas hepáticas (ALT y AST), sodio y urea (Fig. 4.23.). Se había descrito previamente la capacidad del tratamiento con SAC/VAL para reducir la presión arterial de pacientes hipertensos, siendo incluso más eficaz que las terapias clásicas, y sin producir un aumento de los efectos adversos [666]. Aunque en este caso no se ha evaluado la presión sanguínea de los animales, los resultados obtenidos reflejan los efectos beneficiosos del tratamiento con SAC/VAL en la reducción de los niveles de sodio (*p*-valor = 0.005, n = 10) (Fig. 4.23.A) de las ratas ZSF1-obesas en comparación con el grupo obeso control no tratado, manteniendo dichos niveles dentro de los rangos apropiados [667].

Además, el tratamiento con SAC/VAL disminuyó significativamente los niveles séricos de Cho total (*p*-valor = 0.002, n = 10) (Fig. 4.23.B), aunque aumentó significativamente los niveles séricos de ALT (*p*-valor = 0.012, n = 10) (Fig. 4.23. C), AST (*p*-valor = 0.002, n = 10) (Fig. 4.23.D) y creatinina (*p*-valor = 0.014, n = 10) (Fig. 4.23.E) en comparación con el grupo obeso control sin tratar. Sin embargo, el tratamiento de las ratas ZSF1 con SAC/VAL no modificó los niveles séricos de TG (Fig. 4.23.F) y de urea (Fig. 4.23.G).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

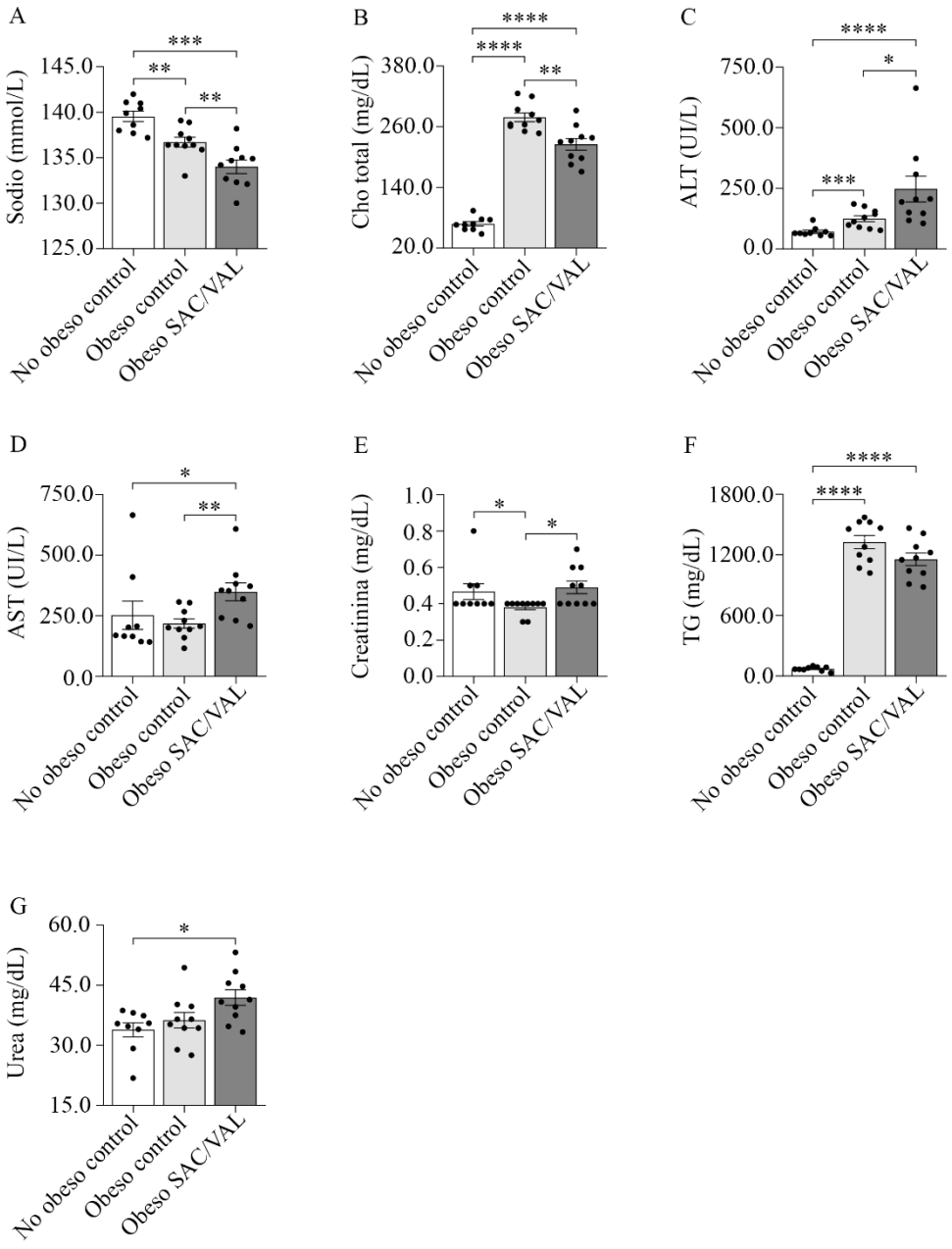


Figura 4.23.: Efecto del tratamiento con SAC/VAL en ratas macho ZSF1-obesas durante 9 semanas en los niveles séricos de sodio, de distintos lípidos, de enzimas hepáticas, de creatinina y de urea. Los resultados obtenidos en los análisis bioquímicos del suero de los animales mostraron la capacidad del tratamiento con SAC/VAL de reducir significativamente los niveles séricos de sodio (A) y Cho total (B), y de incrementar los niveles de las enzimas hepáticas ALT (C) y AST (D), y de la creatinina (E) en comparación con el grupo obeso control. El SAC/VAL no tuvo efecto sobre los niveles séricos de TG (F) y de urea (G) de las ratas ZSF1-obesas. (n = 9-10). **p*-valor < 0.05; ***p*-valor < 0.01; ****p*-valor < 0.001; *****p*-valor < 0.0001. Los datos se expresaron como media ± SEM en mmol/L, mg/dL y unidades internacional (UI)/L. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.3. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre la función diastólica de las ratas ZSF1

Debido al papel fundamental que juega la DD del VI en la fisiopatología de la ICFEp [668,669], uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue la evaluación de la función cardíaca de las ratas ZSF1 mediante ecocardiografía a lo largo del procedimiento experimental. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con una dosis de 68 mg/kg/día/p.o. de SAC/VAL es capaz de mejorar la función diastólica del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el grupo obeso control a las 18 y 22 semanas de edad.

Antes de comenzar el tratamiento (14 semanas de edad) ambos grupos de ratas ZSF1 obesas presentaron valores de IVRT basales significativamente mayores (Obeso control: *p*-valor = 0.015, n = 9-10; Obeso SAC/VAL: *p*-valor = 0.019, n = 9-10) que los animales no obesos (Fig. 4.24.A). Con el progreso de la ICFEp, los valores de IVRT de las ratas obesas y no obesas control aumentaron (Fig. 4.24.A), debido a un mayor deterioro de la función diastólica. Sin embargo, el tratamiento de las ratas ZSF1-obesas con SAC/VAL tuvo un efecto beneficioso sobre el IVRT, al conseguir reducir significativamente su valor en comparación con el grupo obeso control tras 4 semanas de tratamiento (18 semanas de edad) (*p*-valor = 0.002, n = 10) (Fig. 4.24.A), y tras 8 semanas de tratamiento (22 semanas de edad) (*p*-valor < 0.0001, n = 9-10) (Fig. 4.24.A).

Con la progresión de la enfermedad, también se vieron afectados otros parámetros cardíacos relacionados con la función diastólica, como el índice Tei (Fig. 4.24.B), la masa del VI (Fig. 4.24.C), el área de la AI (Fig. 4.24.D) y los ratios E/e’ (Fig. 4.24.E) y E/A (Fig. 4.24.F). Tras 8 semanas de tratamiento (22 semanas de edad) se observó que el SAC/VAL fue capaz de revertir estas alteraciones, al reducir significativamente los valores del índice Tei (*p*-valor = 0.021, n = 9-10) (Fig. 4.24.B) y de la masa del VI (*p*-valor = 0.022, n = 9-10) (Fig. 4.24.C) en comparación con el grupo obeso control. Sin embargo, el tratamiento SAC/VAL no mostró efectos sobre el área de la AI (*p*-valor > 0.999, n = 10) (Fig. 4.24.D), los ratios E/e' (*p*-valor = 0.109, n = 9-10) (Fig. 4.24.E) y E/A (*p*-valor = 0.730, n = 9) (Fig. 4.24.F), la FEVI (*p*-valor = 0.4805, n = 10) (Fig. 4.24.G) y el CO (*p*-valor = 0.684, n = 10) (Fig. 4.24.H) en comparación con el grupo obeso control.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

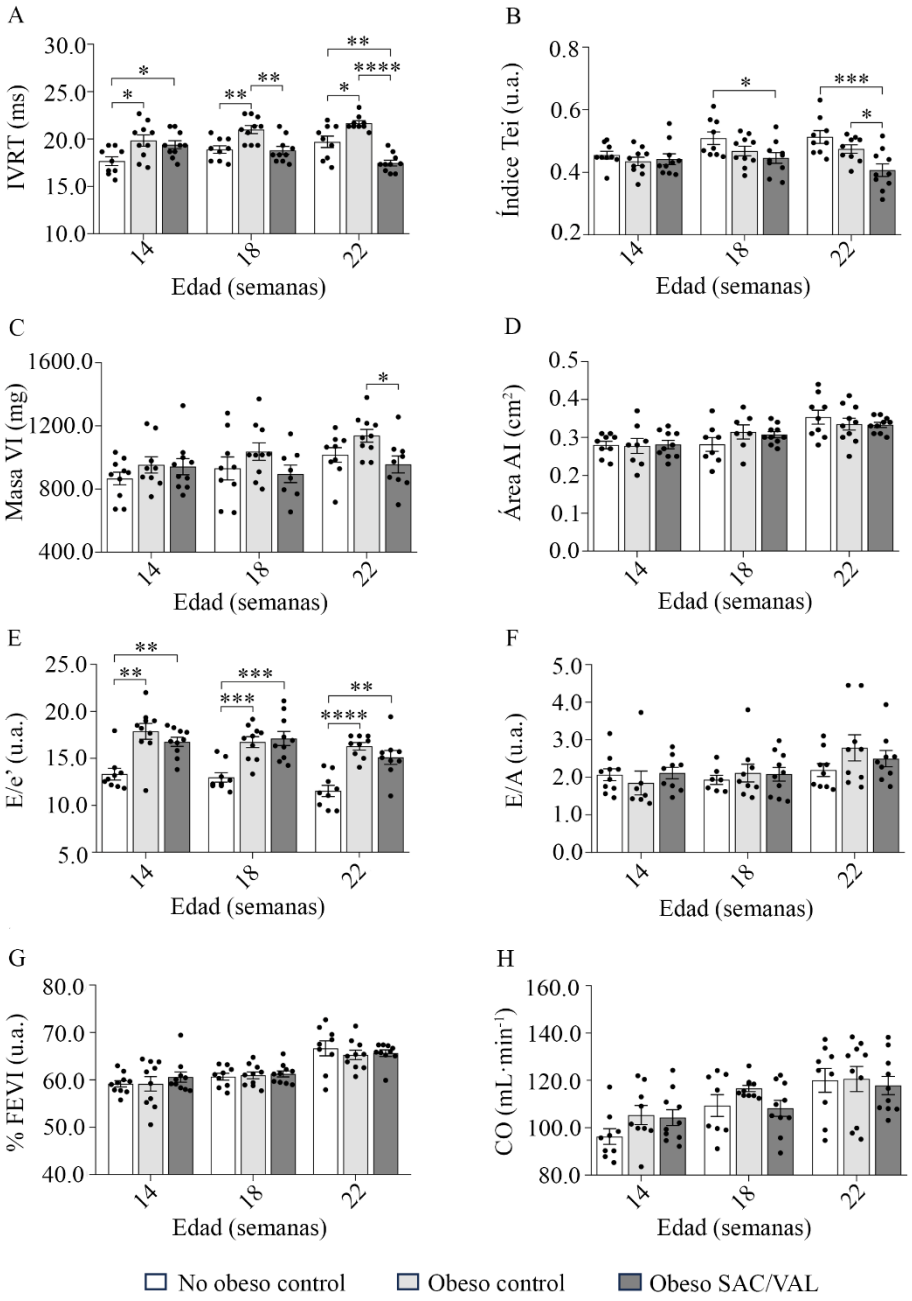


Figura 4.24.: El tratamiento con SAC/VAL durante 9 semanas mejoró la disfunción diastólica de las ratas obesas ZSF1. Representación gráfica del efecto del tratamiento con SAC/VAL sobre los parámetros ecocardiográficos IVRT (A), índice Tei (B), masa del VI (C), área de la AI (D), ratio E/e' (E), ratio E/A (F), % FEVI (G) y CO (H) en ratas ZSF1. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$. Los datos se expresaron como media ± SEM en ms, u.a., mg, cm^2 y mL/min. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.4. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre la tolerancia al ejercicio en ratas ZSF1

Durante el procedimiento experimental, también se evaluó si el tratamiento con SAC/VAL era capaz de mejorar la intolerancia al ejercicio físico que se observa en las ratas ZSF1-obesas, uno de los síntomas esenciales en el diagnóstico de la ICFEp [669].

Nuestros resultados han demostrado que el tratamiento con SAC/VAL es capaz de modificar los valores del RQ de las ZSF1. Tan solo 4 semanas después del inicio del tratamiento (18 semanas de edad), se observó un incremento significativo del valor del RQ del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el grupo no obeso control (*p*-valor < 0.0001, n = 8-10), y con el grupo obeso control (*p*-valor = 0.008, n = 10) (Fig. 4.25.A). Transcurridas 8 semanas, el tratamiento con SAC/VAL fue capaz de revertir este aumento, reduciendo significativamente el RQ del grupo obeso SAC/VAL (*p*-valor = 0.006, n = 10) *vs.* el grupo obeso control hacia los valores del grupo no obeso control (Fig. 4.25.A). Además, la ΔRQ indica una reducción significativa del valor del RQ del grupo obeso SAC/VAL en comparación con los grupos no obeso control (*p*-valor = 0.001, n = 8-10) y obeso control (*p*-valor = 0.0002, n = 10) (Fig. 4.25.B) en las últimas 4 semanas de tratamiento.

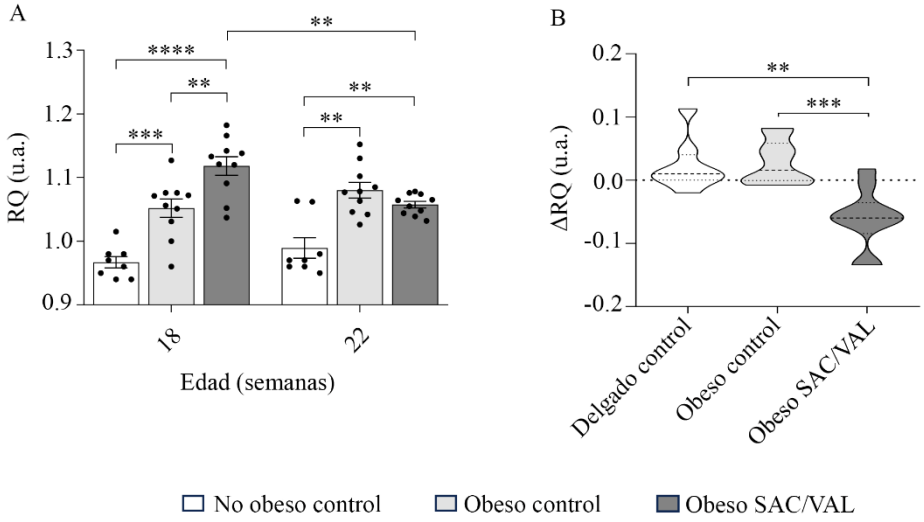


Figura 4.25.: El tratamiento con SAC/VAL modificó el valor del RQ de las ratas ZSF1 durante el ejercicio físico. Representación gráfica de las alteraciones producidas en el valor del RQ (A), y de la ΔRQ (B) de las ratas ZSF1 en comparación con ambos grupos control durante el tiempo de tratamiento con SAC/VAL (n = 8-10). ***p*-valor < 0.01; ****p*-valor < 0.001; *****p*-valor < 0.001. Los datos se expresaron como media ± SEM en u.a. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las comparaciones entre los mismos grupos en momentos diferentes se realizaron mediante el test no paramétrico de los rangos con signo de Wilcoxon.

Durante el tiempo de tratamiento, ambos grupos de ratas ZSF1-obesas mostraron una disminución significativa del VO_2max (Fig. 4.26.A), del VCO_2max (Fig. 4.26.B), del EE (Fig. 4.26.C) y de la velocidad y la distancia recorrida máximas (Fig. 4.26.D y 4.26.E) en comparación con el grupo no obeso control. El tratamiento con SAC/VAL no modificó ninguno de los parámetros estudiados (Fig. 4.26.).

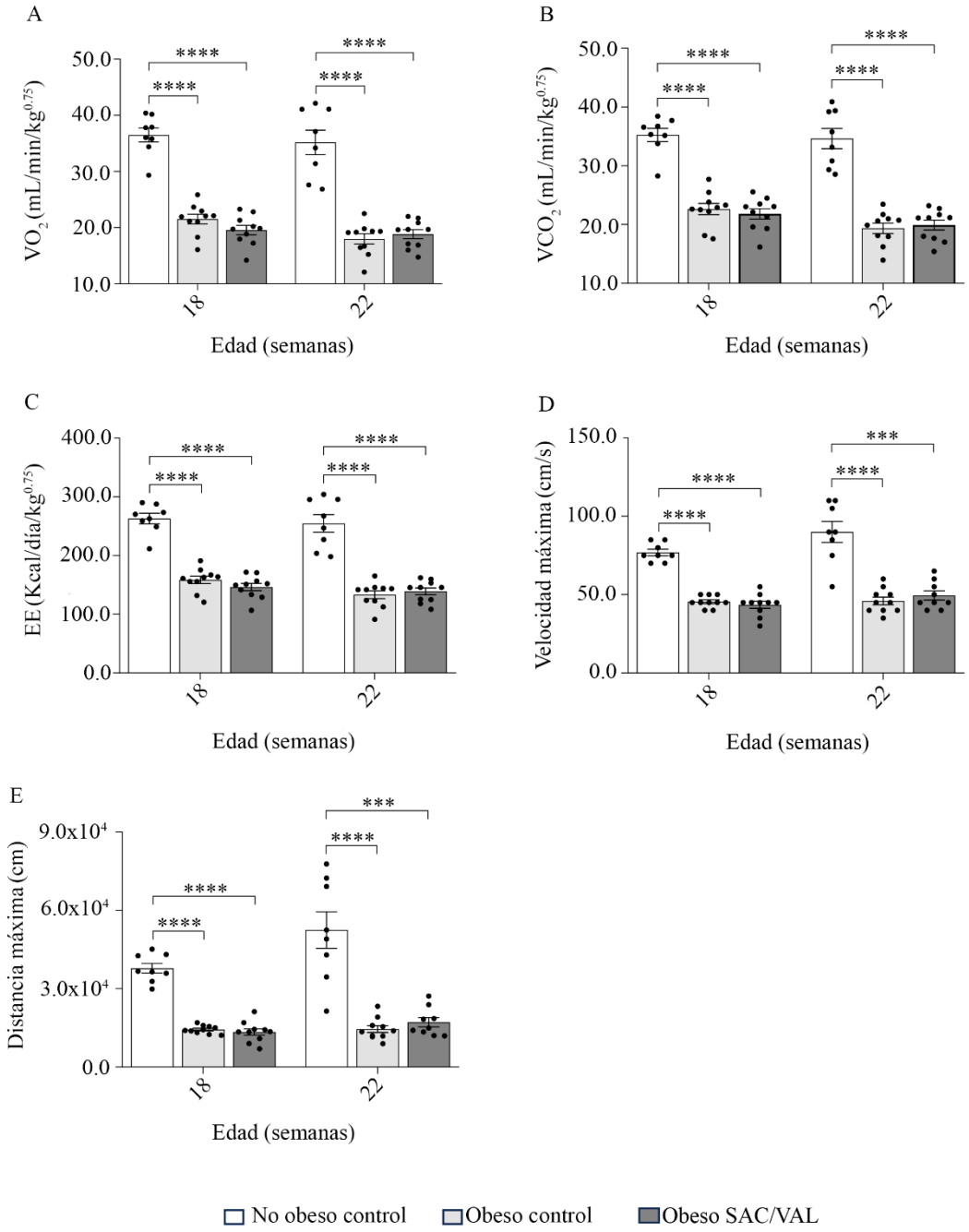


Figura 4.26.: Tolerancia al ejercicio de las ratas ZSF1 durante el tratamiento con SAC/VAL. El tratamiento con SAC/VAL no fue capaz de modificar los valores de VO_2max (A), VCO_2max (B) y EE (C), la velocidad (D) y la distancia máximas (E) de las ratas ZSF1 en comparación con el grupo obeso control (n = 8-10). ****p*-valor < 0.001; *****p*-valor < 0.001. Los datos se expresaron como media ± SEM en mL/min/kg$^{0.75}$, Kcal/día/kg$^{0.75}$, cm/s y cm. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.5. Test de fuerza de agarre de las extremidades anteriores de las ratas ZSF1

La intolerancia al ejercicio en los pacientes con ICFEp se ha relacionado con la disminución de la función muscular, debido a la disfunción mitocondrial y del metabolismo energético del músculo esquelético periférico [354,669,670]. Para evaluar el posible efecto del tratamiento con SAC/VAL en el músculo esquelético de los animales, estos fueron sometidos a una prueba de fuerza de agarre de las extremidades anteriores.

Los animales del grupo no obeso control y los del grupo obeso control presentaron fuerzas de agarre de las extremidades anteriores similares (no obeso control: 428.70 ± 34.83 g.fuerza, n = 9; obeso control: 379.00 ± 30.10 g.fuerza, n = 10; *p*-valor = 0.72) a las 21 semanas de edad. De igual manera, el tratamiento con SAC/VAL no alteró la fuerza de agarre de las ratas ZSF1 (397.20 ± 20.95 g.fuerza, n = 10; *p*-valor = 0.68) en comparación con el grupo obeso control.

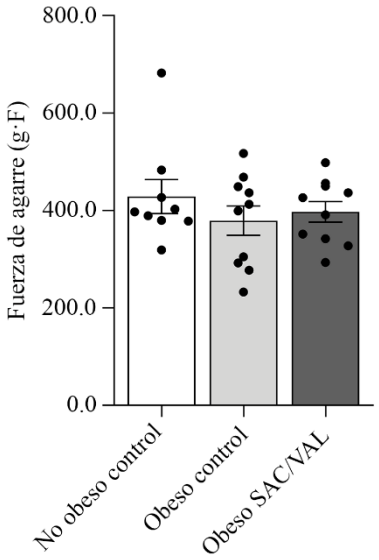


Figura 4.27.: Evaluación de la fuerza de agarre de las ratas ZSF1 tras el tratamiento con SAC/VAL. El tratamiento con SAC/VAL no tuvo efecto sobre la fuerza de agarre de las extremidades anteriores de las ratas ZSF1 (n = 9-10). Los datos se expresaron como media ± SEM en g·F. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

4.3.6. Sacubitril/valsartán disminuye la hipertrofia y la fibrosis del ventrículo izquierdo en ratas ZSF1

Como se mencionó previamente, la hipertrofia y la fibrosis cardíacas son factores fundamentales en el desarrollo de la ICFEp [671]. Recientemente, se ha sugerido que el SAC/VAL podría modular la hipertrofia y fibrosis cardíaca asociadas a ICFEp [521], por lo que hemos decidido confirmar este efecto en nuestro modelo experimental.

Las ratas obesas ZSF1 presentaron un incremento significativo del área de los cardiomiocitos (no obeso control: 571.70 ± 14.05 μm^2, n = 9; obeso control: 994.50 ± 30.44 μm^2, n = 10; *p*-valor < 0.0001) (Fig. 4.28.A y 4.28.B), un indicador de hipertrofia cardíaca, y del porcentaje de fibrosis (no obeso control: 7.64 ± 0.75%, n = 9; obeso

control: 11.69 ± 1.03%, n = 10; *p*-valor < 0.0001) (Fig. 4.28.C y 4.28.D) del VI en comparación con el grupo no obeso control. El tratamiento con SAC/VAL durante 9 semanas fue capaz de reducir significativamente el área de los cardiomiocitos del VI (obeso control: 994.50 ± 30.44 µm^2, n = 10; obeso SAC/VAL: 758.80 ± 14.21 µm^2, n = 10; *p*-valor < 0.0001) (Fig. 4.28.A y 4.28.B) y el porcentaje de fibrosis (obeso control: 11.69 ± 1.03%, n = 10; obeso SAC/VAL: 4.60 ± 0.28%, n = 10; *p*-valor (obeso SAC/VAL *vs.* obeso control) (*p*-valor < 0.0001) (Fig. 4.28.C y 4.28.D) del VI de los animales del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el grupo de control obeso.

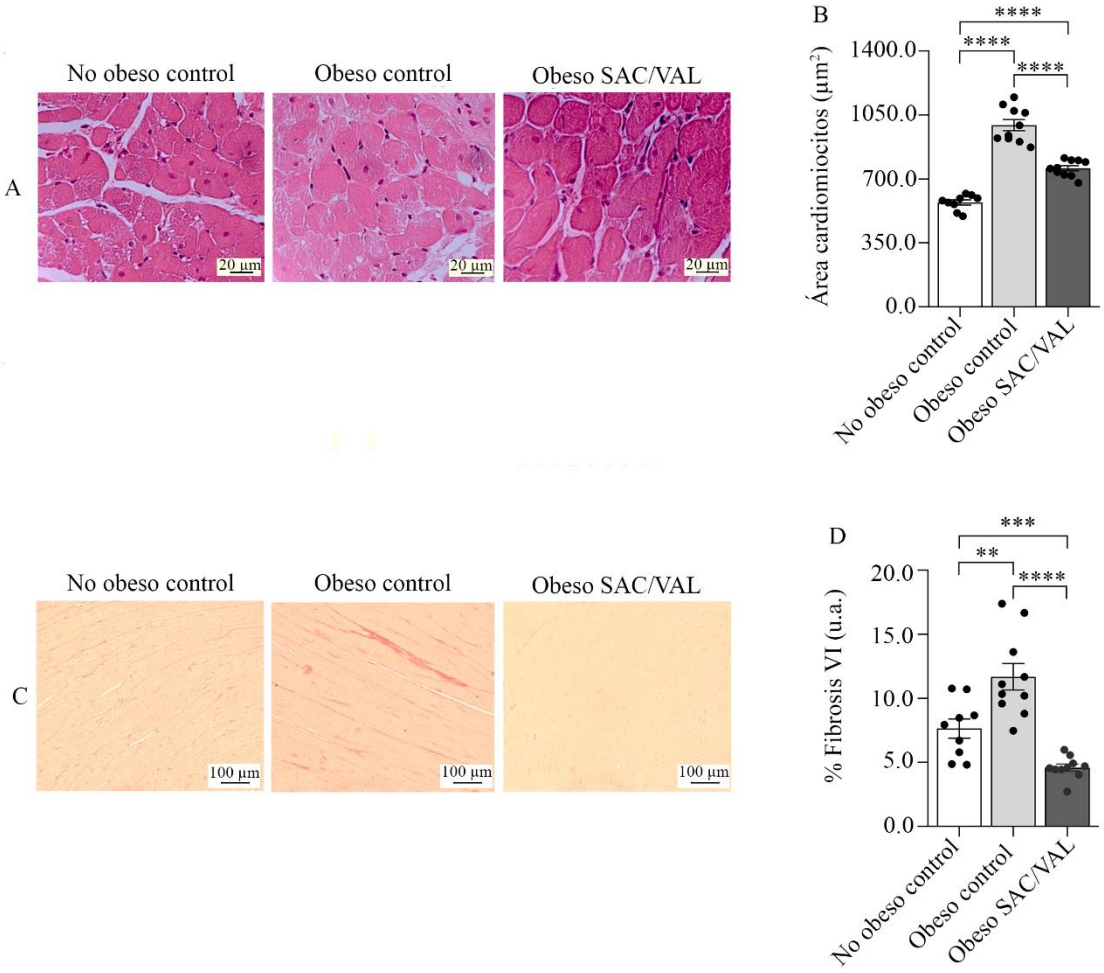


Figura 4.28: El tratamiento con SAC/VAL redujo la hipertrofia y la fibrosis del VI en ratas ZSF1. Imágenes histológicas representativas de la tinción de cardiomiocitos con HE para la evaluación del área de los cardiomiocitos (aumento x40) (A) y representación gráfica del área de los cardiomiocitos (B) en el VI de todos los grupos. Imágenes histológicas representativas de la tinción de cardiomiocitos con rojo Picro-sirio para la determinación de la fibrosis cardíaca (aumento x10) (C) y representación gráfica del porcentaje de fibrosis (D) en el VI de todos los grupos (n = 9-10). ***p*-valor < 0.01; ****p*-valor < 0.001; *****p*-valor < 0.001. Los datos se expresaron como media ± SEM en µm^2 y en u.a. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.7. El tratamiento con sacubitril/valsartán mejora la esteatosis hepática en ratas ZSF1

Junto con la IC, la enfermedad hepática es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad mundial [672]. La principal causa de enfermedad hepática crónica es la MASLD, caracterizada por la presencia de fibrosis, esteatosis y cirrosis hepática, y para la cual no existe una terapia farmacológica específica [672–674]. La MASLD juega un papel fundamental en el desarrollo de DMT2, SMet y ECVs como la IC [675–677]. La ICFEp presenta factores de riesgo comunes a la MASLD y, aunque existe evidencia de que las alteraciones patológicas de la MASLD juegan un papel en el desarrollo de la ICFEp, la asociación entre la ICFEp y la enfermedad hepática todavía no está bien definida [672,678,679]. Por este motivo, junto a los resultados previos en los que se observó una reducción significativa del peso del hígado tras el tratamiento con SAC/VAL, decidimos evaluar los efectos del SAC/VAL sobre la fibrosis y esteatosis hepática.

Los estudios histológicos no revelaron evidencias de fibrosis hepática en ninguno de los grupos de animales (Fig. 4.29.A). Como era de esperar, las ratas del grupo obeso control mostraron un aumento significativo de la infiltración lipídica hepática en comparación con el grupo no obeso control (no obeso: 1.36 ± 0.24 %, n = 9; obeso control: 4.14 ± 0.55 %, n = 10; *p*-valor = 0.0002) (Fig. 4.29.B y 4.29.C). El tratamiento de las ratas ZSF1-obesas con SAC/VAL consiguió reducir significativamente el porcentaje de infiltración lipídica (obeso control: 4.14 ± 0.55 %, n = 10; obeso SAC/VAL: 2.51 ± 0.40 %, n = 10; *p*-valor = 0.04) (Fig. 4.29.B y 4.29.C) en comparación con el grupo obeso control hacia valores próximos a los del grupo no obeso control.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

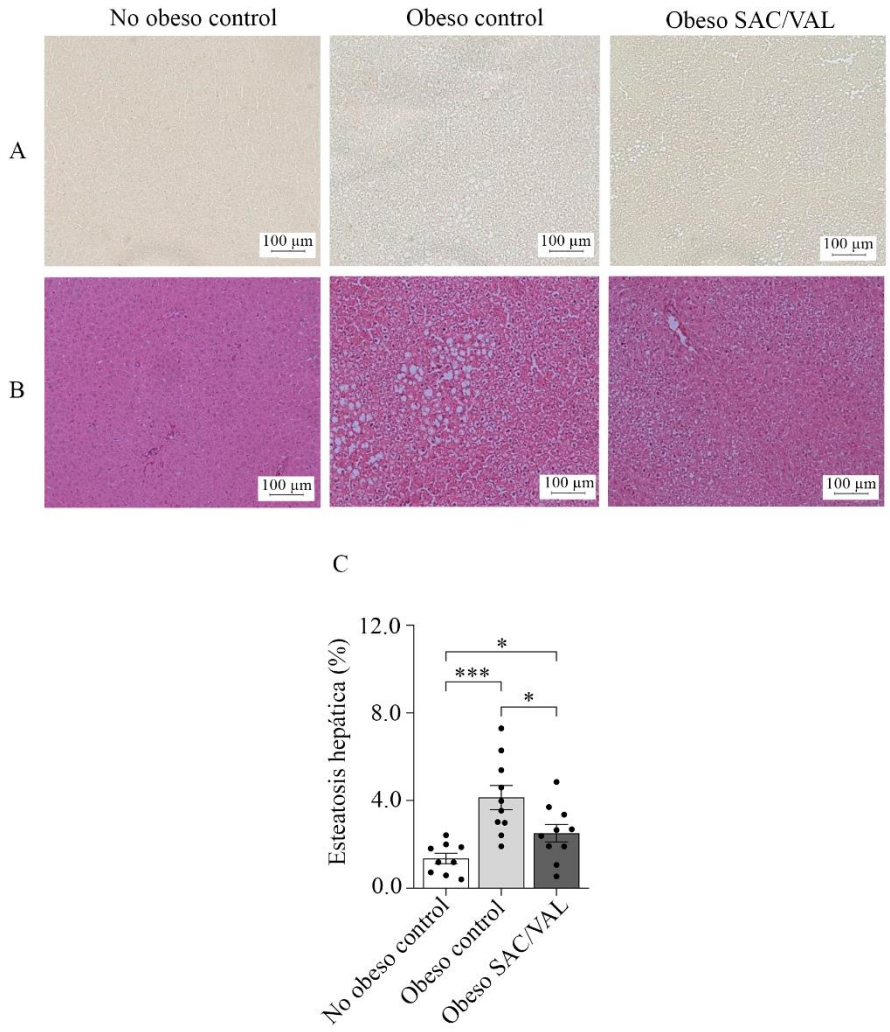


Figura 4.29.: El tratamiento con SAC/VAL mejoró la esteatosis hepática en ratas ZSF1. Imágenes histológicas representativas de la tinción de hepatocitos con Rojo Picro-sirio para la determinación de la fibrosis hepática (aumento x10) (A), y con HE para la determinación de la infiltración lipídica (aumento x10) (B) en todos los grupos. Representación gráfica del porcentaje de esteatosis hepática (C) (n = 9-10). **p*-valor < 0.05; ****p*-valor < 0.001. Los datos se expresaron como media ± SEM en porcentaje. Las comparaciones entre grupos al mismo tiempo se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

4.3.8. Efecto del sacubitril/valsartán sobre la respiración mitocondrial del tejido cardíaco y hepático de las ratas ZSF1

El papel del metabolismo energético y la función mitocondrial en la fisiopatología de la ICFEp sigue sin estar claro, aunque recientemente se descrito que el músculo esquelético de pacientes con ICFEp presenta marcadas anomalías en la función mitocondrial, que la expresión génica y la función mitocondriales están altamente correlacionadas con la función diastólica, y que la reprogramación metabólica cardiaca, caracterizada por un metabolismo oxidativo mitocondrial alterado, contribuye a la disfunción cardiaca, al remodelado patológico y a la ICFEp [426,429,680–682].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además, la disfunción mitocondrial también afecta a la función hepática, al tener un rol crítico en la fisiopatología de la MASLD [683]. Se ha observado que los pacientes con DM, RI y esteatosis hepática presentan un deterioro de la función de las mts en el hígado [684]. Actualmente, existe una gran cantidad de agentes terapéuticos cuya capacidad para mejorar la función mitocondrial está siendo evaluada en diferentes ensayos clínicos [685–687], por este motivo hemos decidido evaluar los posibles efectos del tratamiento con SAC/VAL en la función mitocondrial a nivel cardíaco y hepático de las ratas ZSF1.

Después de 9 semanas de tratamiento con 68 mg/kg/día/p.o. de SAC/VAL, se observó una ligera modulación de la respiración mitocondrial del VI (Fig. 4.30.) y del tejido hepático (Fig. 4.31.) del grupo obeso SAC/VAL durante la respiración basal (Fig. 4.30.A y 4.31.A), el estado LEAK (Fig. 4.30.B y 4.31.B), el estado OXPHOS (Fig. 4.30.C y 4.31.C) y el estado de transferencia de e^- (Fig. 4.30.D y 4.31.D), en comparación con el grupo obeso control, alcanzando valores similares a los del grupo no obeso control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

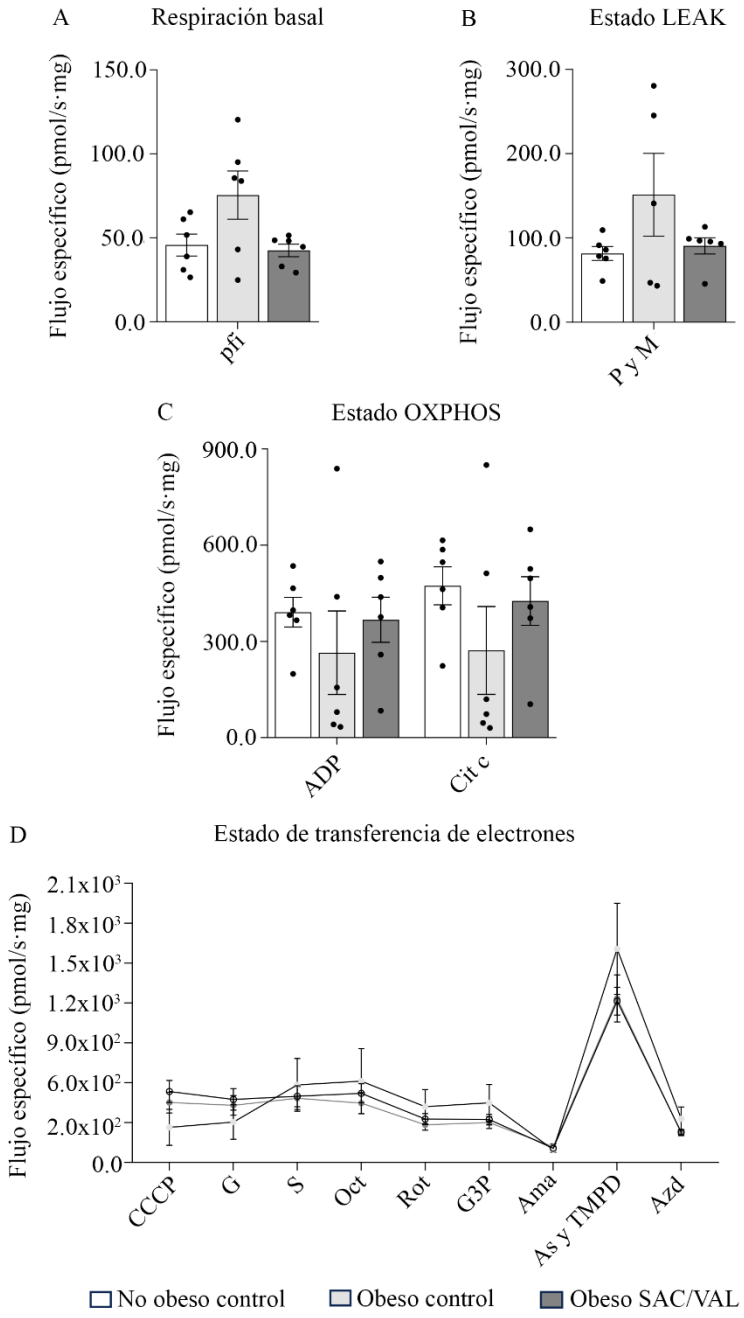


Figura 4.30.: Evaluación de la función mitocondrial del VI de ratas macho ZSF1 tras el tratamiento con SAC/VAL durante 9 semanas. Representación gráfica de los valores de flujo específico de las mts de las pfi del VI durante la respiración basal (A), el estado LEAK (B), el estado OXPHOS (C) y el estado de transferencia de electrones (D) (n = 6). Los datos se expresaron como media ± SEM en pmol/s·mg. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

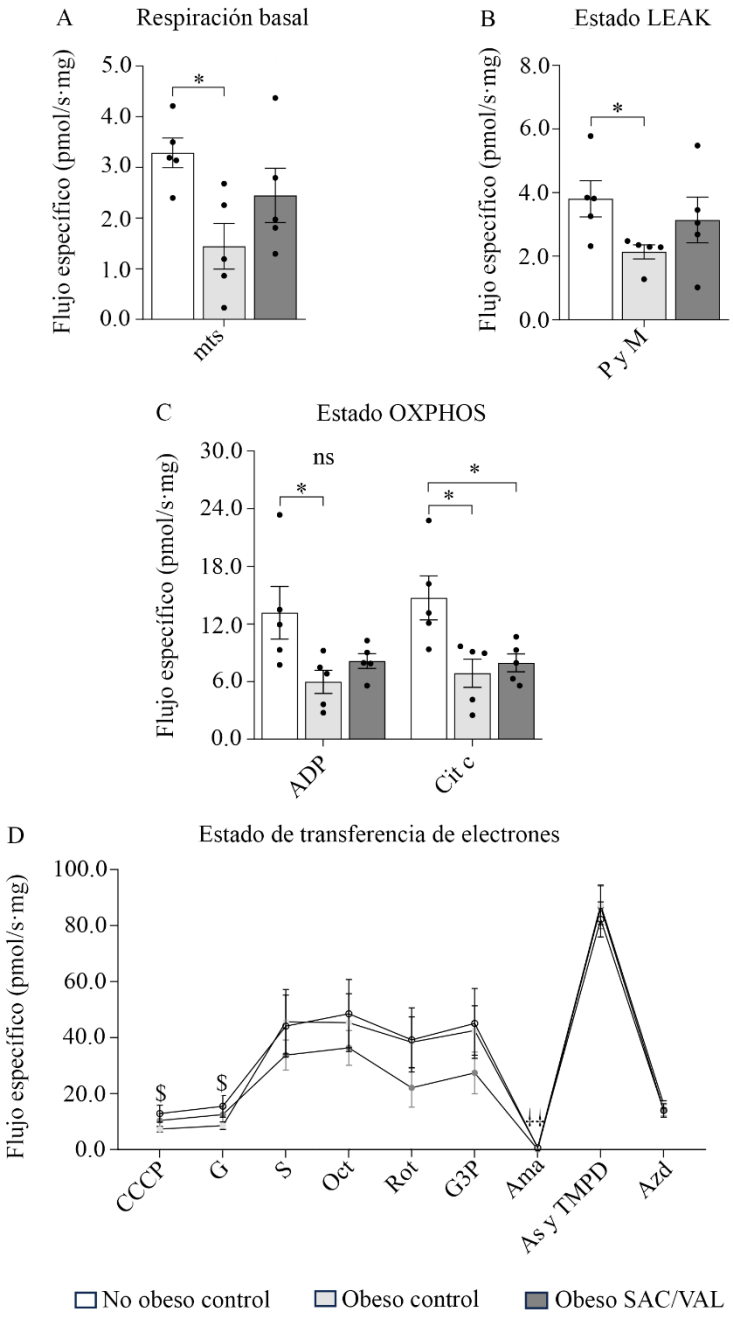


Figura 4.31.: Evaluación de la función mitocondrial hepática de ratas macho ZSF1 tratadas con 68 mg/kg/día/p.o. de SAC/VAL durante 9 semanas. Representación gráfica de los valores de flujo específico de las mts aisladas del tejido hepático durante la respiración basal (A), el estado LEAK (B), el estado OXPHOS (C) y el estado de transferencia de electrones (D) (n = 5). **p*-valor < 0.05; grupo no obeso control *vs.* obeso control: $p-valor < 0.05; grupo no obeso control *vs.* obeso SAC/VAL: ↓↓p-valor < 0.01. Los datos se expresaron como media ± SEM en pmol/s·mg. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.9. Análisis del perfil metabólico del ventrículo izquierdo de las ratas ZSF1 tras el tratamiento con sacubitril/valsartán

El análisis del perfil metabolómico del VI de las ratas ZSF1, realizado mediante UHPLC-MS, identificó 416 metabolitos, de los cuales 4 se encontraban fuera de correspondiente intervalo de detección lineal, y fueron eliminados de los sucesivos análisis estadísticos multivariantes y univariantes. Al igual que para el análisis del lipidoma del TA de las ratas ZDF, en este caso también se generó un *heatmap* (Fig. 4.32), en el que se representa el $\log_2$ (*fold change*) de los 412 metabolitos analizados junto a los *p*-valor del test t de Student o de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon obtenidos al comparar el tejido cardíaco de los 3 grupos de ratas ZSF1. El tratamiento SAC/VAL durante 9 semanas modificó significativamente el metaboloma del VI en comparación con el grupo obeso control, afectando principalmente a la composición lipídica cardíaca. De forma complementaria, para facilitar la visualización de los datos, se generó un gráfico tipo *volcano* de los metabolitos más significativos considerados individualmente presentes en el VI de cada uno de los grupos objeto de estudio (Fig. 4.33.A, 4.33.B y 4.33.C).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

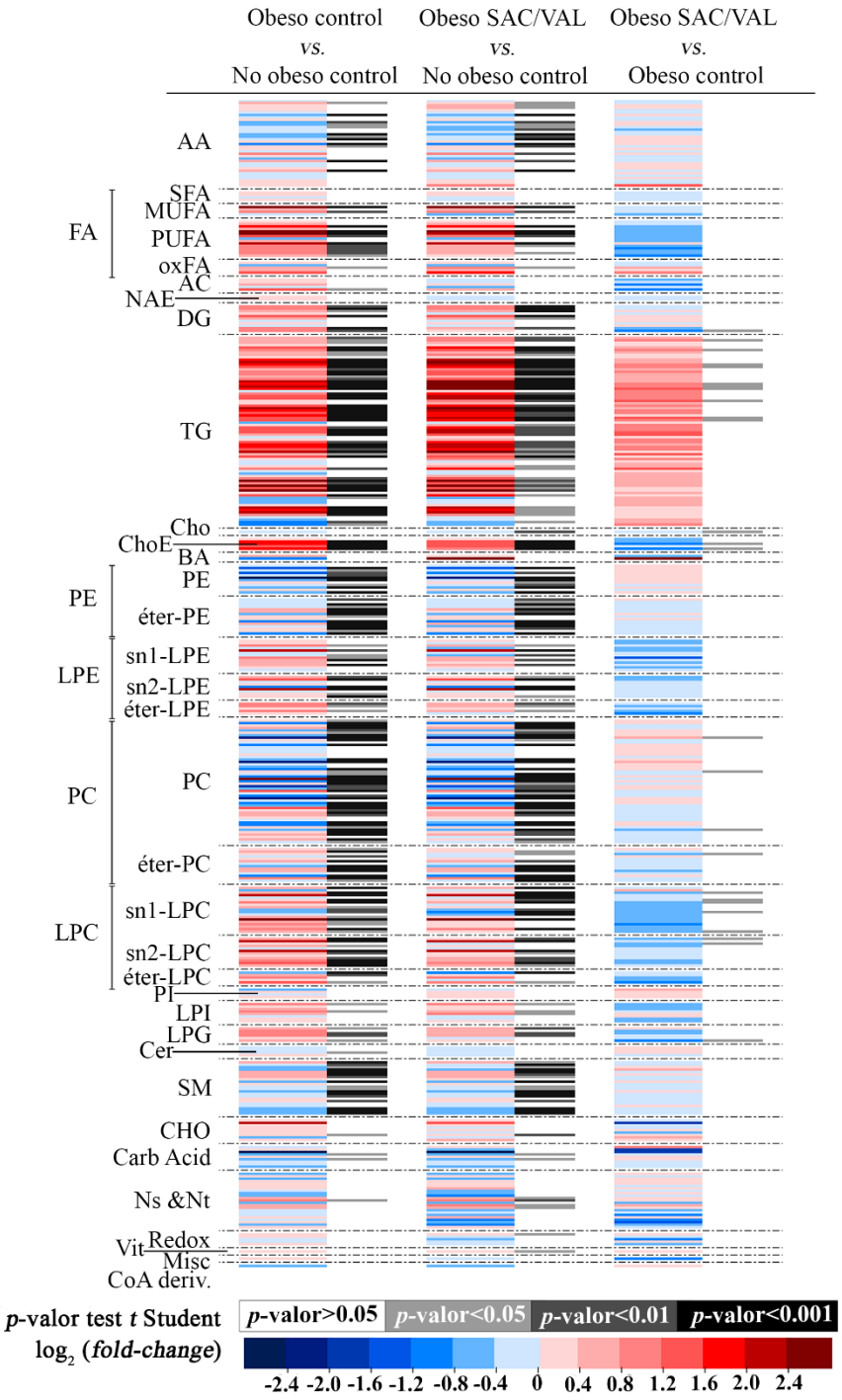
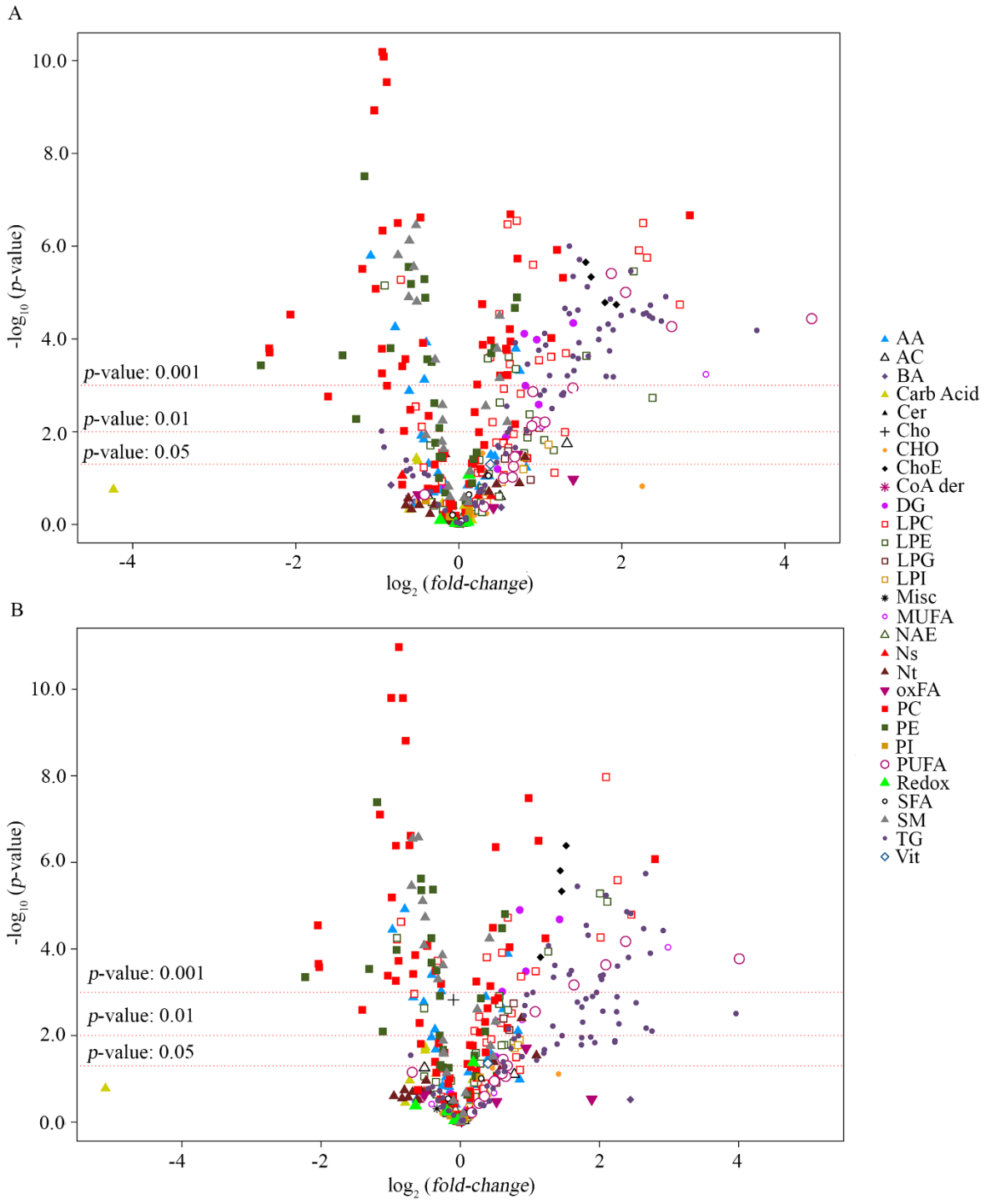


Figura 4.32.: *Heatmap* de los metabolitos modificados en tejido del ventrículo izquierdo de las ratas macho ZSF1 tratadas con SAC/VAL durante 9 semanas. Los metabolitos aparecen ordenados según la clase metabólica a la que pertenecen y, a su vez, según el número de carbonos e insaturaciones que presentan sus cadenas acilo. Los valores del $\log_2$ (*fold change*) y los *p*-valor obtenidos en el análisis con el test t de Student o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon se representaron siguiendo el código de color que aparece en la leyenda de la figura. El color azul representa una disminución ($\log_2$ (*fold change*) negativos) mientras que el color rojo indica el aumento ($\log_2$ (*fold change*) positivos) de los niveles de los metabolitos, siendo mayor la modificación cuanto más oscuros sean los colores. Por otra parte, las líneas

grises/negras representan el nivel de significancia de los *p*-valor de la prueba t de Student o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (gris claro, $p < 0.05$; gris oscuro, $p < 0.01$; negro, $p < 0.001$). AC: acilcarnitinas; Carb: ácidos carboxílicos; CHO: derivados de carbohidratos; CoA deriv: derivados de la coenzima A; Misc: varios, NAE: N-aciletanolaminas, Ns: nucleósidos; Nt; nucleótidos; Vit: vitaminas.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

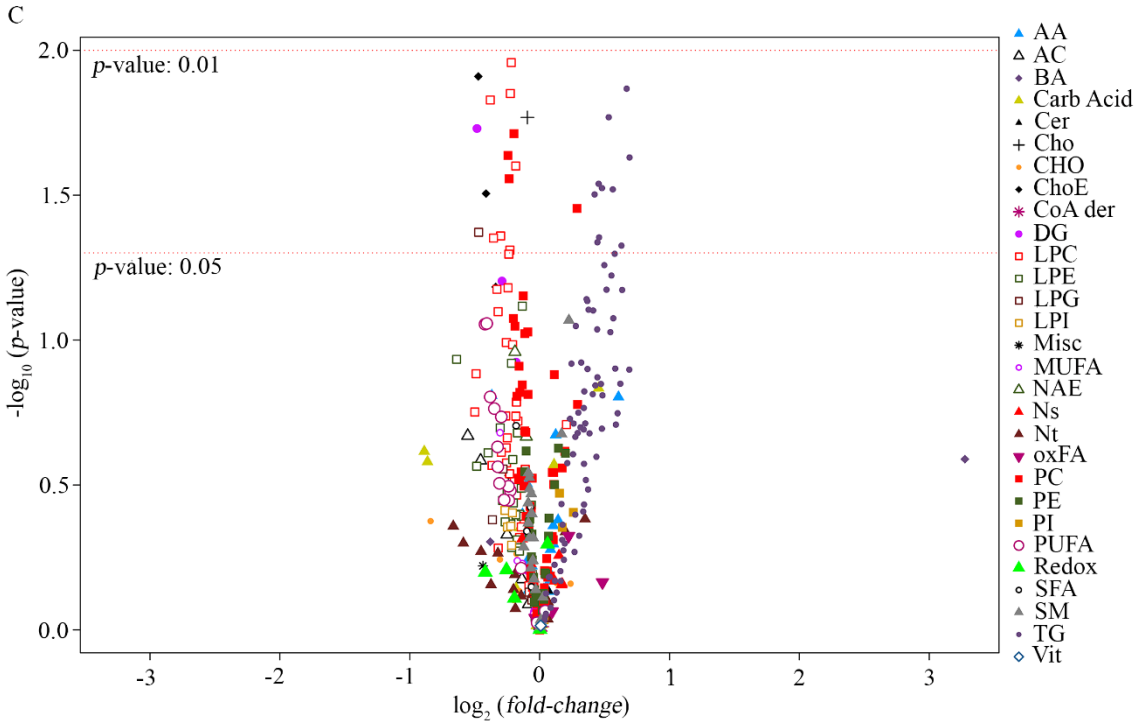


Figura 4.33.: Gráficos tipo *volcano* [-$\log_{10}$ (*p*-valor) con respecto al $\log_2$ (*fold change*)]. Representación gráfica de los metabolitos, considerados de manera individual, que presentaron las modificaciones más significativas en el tejido del ventrículo izquierdo al comparar los grupos obeso control *vs.* no obeso control (*p*-valor < 0.05, *p*-valor < 0.01 y *p*-valor < 0.001) (A), obeso SAC/VAL *vs.* no obeso control (*p*-valor < 0.05, *p*-valor < 0.01 y *p*-valor < 0.001) (B) y obeso SAC/VAL *vs.* obeso control (*p*-valor < 0.05 y *p*-valor < 0.01) (C) de las ratas ZSF1 tratadas con SAC/VAL durante 9 semanas.

El tratamiento con una dosis de 68 mg/kg/día/p.o. de SAC/VAL durante 9 semanas modificó significativamente los niveles de 26 metabolitos en el VI de las ratas ZSF1 (Tabla 4.5 y Fig. 4.34.). El SAC/VAL indujo un incremento significativo de los niveles de 10 TG cardíacos, siendo esta la clase química alterada más notable, y de 1 PE (Tabla 4.5 y Fig. 4.34.). Además, el tratamiento con SAC/VAL disminuyó significativamente los niveles de 1 DG, 1 Cho y 2 ChoE, y de un total de 11 clases diferentes de glicerofosfolípidos; 7 LPC, 3 PC y 1 LPG; en comparación con el grupo obeso control (Tabla 4.5 y Fig. 4.34.).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4.5.: Metabolitos significativamente alterados en el VI de las ratas ZSF1 al comparar el grupo obeso SAC/VAL y el grupo obeso control. Se indican los valores del log_2 (*fold change*) y los *p*-valor de la prueba t de Student no emparejada o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

Clase	Metabolito	log_2 (*fold change*)	Test t de Student *p*-valor
DG	DG(38:6)	-0.482	0.019
TG	TG(44:1)	0.445	0.046
	TG(46:2)	0.423	0.031
	TG(48:2)	0.532	0.017
	TG(48:3)	0.454	0.029
	TG(50:2)	0.458	0.044
	TG(50:3)	0.563	0.030
	TG(50:4)	0.692	0.023
	TG(51:4)	0.670	0.014
	TG(52:5)	0.630	0.047
	TG(52:6)	0.480	0.030
Col	Colesterol	-0.094	0.017
ColE	ChoE(22:4)	-0.413	0.031
	ChoE(16:0) + ChoE(18:1) + ChoE(20:2)	-0.472	0.012
PE	PC(33:2)	0.288	0.035
PC	PC(36:0)	-0.198	0.019
	PC(40:4)	-0.244	0.023
	PC(O-16:0/22:4)	-0.234	0.028
LPC	PC(16:0/0:0)	-0.218	0.011
	PC(18:0/0:0)	-0.184	0.025
	PC(18:1/0:0)	-0.229	0.049
	PC(20:0/0:0)	-0.380	0.015
	PC(22:6/0:0)	-0.356	0.044
	PC(0:0/16:0)	-0.225	0.014
	PC(0:0/18:0)	-0.300	0.044
LPG	LPG(22:6)	-0.469	0.043

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

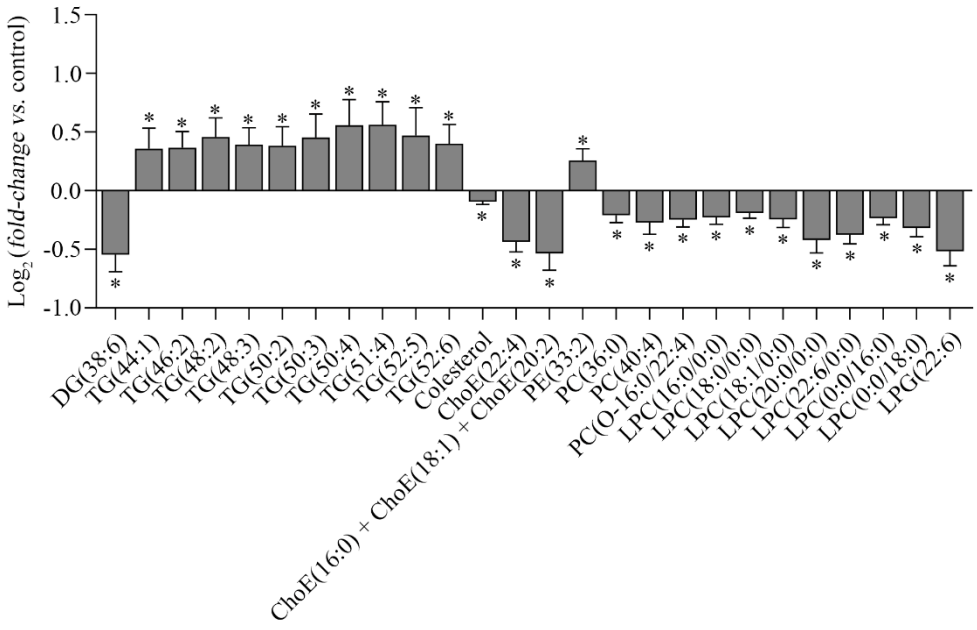


Figura 4.34.: Análisis metabolómico del tejido del VI del grupo obeso SAC/VAL en comparación al grupo obeso control. Representación gráfica del $\log_2$ (*fold change*) de los metabolitos modificados significativamente en el tejido del VI de las ratas tratadas con SAC/VAL en comparación a las ratas control. El tratamiento con SAC/VAL de las ratas macho ZSF1 incrementó significativamente los niveles de varios TG y un PE, y disminuyó significativamente los niveles de Cho, ChoE y de varios tipos de glicerolípidos como PC, LPC y un LPG en comparación con el grupo control (n = 10). **p*-valor < 0.05. Los datos se expresan como media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test t de Student no pareado o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN

5.1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON EMPAGLIFLOZINA EN UN MODELO ANIMAL DE OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

En los últimos años, de entre la gran variedad de fármacos para el tratamiento de la DMT2 disponibles en el mercado, los antidiabéticos orales pertenecientes al grupo de los iSGLT2 destacan especialmente por su gran versatilidad ya que, además de regular los niveles de glucosa en sangre, presentan efectos cardioprotectores y renoprotectores, y también son capaces de regular la homeostasis energética [189,219,220,688,689]. Dentro de los iSGLT2 sobresale la EMPA, uno de los más potentes y selectivos, altamente eficaz en la regulación de los niveles de HbA1c de pacientes con DMT2 e incluso con DMT1 [230,248,249,251]. Además, varios ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento de pacientes con IC, independientemente del valor de la FEVI, con EMPA conseguía una reducción significativa de la mortalidad por causas CV y/o hospitalizaciones por IC [253–257]. Nuestro grupo de investigación había evaluado previamente a este trabajo de tesis los efectos de la EMPA a nivel cardíaco y hepático en un modelo animal de obesidad y diabetes, ratas ZDF, observando que el tratamiento con EMPA mejoraba la inflamación cardíaca y hepática, estimulaba la autofagia y la activación del AMPK, principal regulador de la homeostasis energética, y modificaba los metabolomas cardíacos y hepáticos, respectivamente, hacia un perfil protector [307,308]. Debido a esos resultados prometedores, en esta tesis doctoral se decidió evaluar los posibles efectos del tratamiento con EMPA en la estructura, la inflamación y el lipidoma del TAS y TAV de las ratas ZDF.

5.1.1. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre los niveles circulantes de fructosamina y albúmina en ratas ZDF

Son numerosos los ensayos clínicos y estudios *in vivo* que han demostrado la capacidad de la EMPA para reducir los niveles de glucosa y HbA1c tanto en sangre de pacientes con DMT2 [230,248,251,690] como en modelos animales [272,691–693]. Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio para tratar de elucidar los efectos del tratamiento con EMPA en el metabolismo cardíaco en las ratas ZDF, un modelo animal de obesidad y DMT2, demostraron que 30 mg/kg/día de EMPA hacía descender significativamente los niveles de glucosa en ayunas desde la primera semana de tratamiento [308]. De manera complementaria a estos resultados, y ante la imposibilidad de evaluar los niveles sanguíneos de HbA1c en el plasma de estos animales debido a al agotamiento de las muestras de sangre con anticoagulante disponibles, en el trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral se evaluaron los niveles plasmáticos de fructosamina y albúmina, biomarcadores para el diagnóstico y el seguimiento de la DMT2, y se calculó el porcentaje de albúmina glucosilada, parámetro de control glucémico [694,695], de las ratas ZDF tras el tratamiento con EMPA durante 6 semanas. Nuestros datos confirman la capacidad de la EMPA para reducir de manera significativa el porcentaje de albúmina glucosilada plasmática, así como los niveles plasmáticos de fructosamina. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Klimontov y col. (2020) [696], los cuales describieron que el tratamiento de ratones diabéticos db/db con 10

USC DE COMPOSTELA

mg/kg de EMPA durante 8 semanas también disminuían los niveles plasmáticos de fructosamina y de albúmina glucosilada.

5.1.2. Efecto del tratamiento de la empagliflozina sobre la fibrosis e hipertrofia en el tejido adiposo de las ratas ZDF

Como se explicó previamente en el apartado 1.2.1.3 de la introducción, la expansión del TAB se caracteriza por la hipertrofia de los adipocitos, es decir, un incremento disfuncional de su tamaño que induce estrés en el RE, la desregulación de la secreción de adipoquinas y la pérdida de la vasculatura, causando un incremento de la lipólisis, la angiogénesis, y la infiltración de células del sistema inmune en el TA, lo que deriva en una situación de hipoxia, fibrosis, inflamación crónica de bajo grado y disfunción metabólica [88,98–100]. Los resultados obtenidos en el estudio realizado por Kusaka y col. (2016) [273] demostraron que el tratamiento con EMPA de un modelo animal de SMet con prediabetes durante 10 semanas fue capaz de reducir significativamente la hipertrofia del de los adipocitos del TAV, al disminuir el estrés oxidativo producido por la oxidación de lípidos, y la inflamación. Sin embargo, los análisis histológicos del TAV y TAS de las ratas ZDF tratadas durante 6 semanas con EMPA realizados en este trabajo de tesis no mostraron diferencias en el área de los adipocitos en comparación con el grupo control. Las diferencias observadas en los resultados obtenidos en nuestro estudio y en el realizado por Kusaka y col. (2016) [273] pueden deberse al uso de diferentes modelos animales, ya que el nuestro es un modelo animal de DMT2 ya establecida mientras que el empleado en el trabajo de Kusaka y col. todavía no la ha desarrollado, y al uso de posologías y tiempos de tratamientos diferentes.

Se ha establecido que el estado hipóxico del TA, característico de la fisiopatología de la obesidad debido a la desmesurada expansión de los adipocitos, activa la expresión de factores que, entre otras funciones, estimulan la síntesis del colágeno que rodea a los adipocitos, produciendo un incremento perjudicial de la fibrosis del TA que se relaciona con una pérdida de la flexibilidad, un aumento de la inflamación sistémica y, en última instancia, la muerte celular [93,98,100,114–117]. Estudios *in vivo* previos demostraron que el tratamiento con EMPA es capaz de reducir la fibrosis en órganos como el corazón, el hígado y los riñones, al regular la vía de señalización celular TGF-β/Smad y reducir la expresión de diferentes tipos de colágeno [269,271–273,697]. Nuestros resultados demuestran por primera vez la capacidad del tratamiento con EMPA de reducir de manera significativa la expresión génica de los marcadores de fibrosis col1a1 y col6a3 en el TAV de las ratas ZSF en comparación con los animales que no recibieron el tratamiento. Sin embargo, la EMPA no fue capaz de modificar la expresión de Tgfb1 en el TA, por lo que los efectos antifibróticos observados en el TAV podrían ser independientes a la vía de señalización del TGF-β/Smad, aunque son necesarios más estudios para comprobar esta hipótesis.

5.1.3. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre los niveles de biomarcadores de inflamación en el tejido adiposo de las ratas ZDF

Como se explicó previamente, la inflamación crónica de bajo grado del TA, especialmente del TAV, es uno de los procesos característicos de la fisiopatología de la

obesidad y otras enfermedades metabólicas [104,108]. Brevemente, la expansión disfuncional del TAB en la obesidad conduce a un acúmulo de lípidos perjudicial, a la muerte celular y a un incremento del reclutamiento de células del sistema inmune, como macrófagos M2 y linfocitos [91,93,118–120]. La polarización de los Macrófagos M2 a M1 estimula la secreción de factores proinflamatorios y el reclutamiento de células del sistema inmune, reduciendo la producción de factores antiinflamatorios, y activando las células del endotelio, lo que se relaciona con el desarrollo de una gran variedad de ECVs [91,93,118,698,699]. Como mecanismo compensatorio, los macrófagos M2 secretan citoquinas antiinflamatorias (IL-10, etc.) aunque, en ciertas condiciones, también producen elevadas concentraciones de mediadores proinflamatorios, contribuyendo, por ejemplo, al desarrollo de la RI [699–701]. La reducción de los depósitos de TAV, ya sea mediante dieta y ejercicio físico, terapia farmacológica o cirugía bariátrica, es por lo tanto crucial para la regulación de estos procesos inflamatorios [131-134,140,698,699].

Los últimos estudios realizados por nuestro grupo de investigación [307,308] y otros integrantes de la comunidad científica [702–706] han descrito los potenciales efectos antiinflamatorios de los iSGLT2 en una gran variedad de órganos y tejidos, como el corazón, el hígado, los riñones, la vasculatura y el músculo esquelético. Sin embargo, los efectos antiinflamatorios del tratamiento con EMPA en el TA casi no se han estudiado. Las investigaciones realizadas por Takano y col. (2023) [707] en un cultivo de preadipocitos procedentes del TAE de humanos, demostraron que el tratamiento con EMPA redujo la expresión génica de Il-1α, Il-1β, Il-6, Tgfb11 y Mcp-1 de manera dosis dependiente, al mismo tiempo que produjo una disminución significativa de los niveles de las adipoquinas Il-6 y Mcp-1 secretadas. Además, Haan y col. (2017) [708] demostraron que el tratamiento con EMPA en un modelo de aterosclerosis espontánea, los ratones ApoE($^{-/-}$), redujo significativamente los niveles de expresión de Tnf, Il-6 y Mcp-1en el TAV abdominal de los animales en comparación con su control. En esta tesis doctoral hemos demostrado por primera vez la capacidad de la EMPA para reducir significativamente los niveles de expresión génica de los marcadores proinflamatorios Il-1β, Il-6, Tnfα y Mcp-1 en el TAV de las ratas ZDF en comparación con el grupo control. Estos efectos antiinflamatorios concuerdan con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio al evaluar el tejido cardíaco y hepático de las ratas ZDF tratadas con EMPA [307,308], así como con los resultados obtenidos en los estudios realizados por otros investigadores, en los que se observó que el tratamiento con EMPA disminuía los niveles de adipoquinas proinflamatorias en el tejido cardíaco y el plasma de un modelo animal de miocarditis autoinmune experimental [709], atenuaba la infiltración de macrófagos en el tejido cardíaco en un modelo animal de prediabetes y SMet [273], y reducía los niveles de expresión de Mcp-1 y F4/80 en el tejido hepático de ratones ApoE($^{-/-}$) [290]. Trnovska y col. (2021) [710] y Vallon y col. (2014) [711] demostraron la capacidad del tratamiento con EMPA para atenuar la expresión de varias citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en el riñón de ratas con hipertrigliceridémia hereditaria y de ratones diabéticos, respectivamente. Además, el tratamiento de un cultivo de células tubulares proximales humanas de riñón con EMPA inhibía la respuesta inflamatoria mediada por IL-1β [712].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estudios recientes han sugerido que la EMPA podría ser capaz de revertir el acúmulo de macrófagos M1 y estimular el fenotipo antiinflamatorio M2 en TA y hepático [292,303,713]. Nuestros resultados muestran una expresión de los marcadores de macrófagos M1 y M2 cd86 y cd163, respectivamente, y de la Il-10 significativamente menor en el TAV de las ratas ZDF tratadas con EMPA en comparación al grupo control, lo que concuerda con la ausencia de macrófagos en las muestras histológicas del TA analizadas, y con la menor expresión génica del Mcp-1 que, como se explicó previamente, estimula el reclutamiento de células inmunes, como los macrófagos, en el TAB durante el desarrollo de la obesidad [100,120]. Es importante tener en cuenta que, debido a la complejidad de la respuesta inmune, y a la gran variedad de modelos animales y de dietas especiales empleadas, todavía no existe un consenso acerca de la activación y función de los macrófagos en la obesidad y la DMT2, y serán necesarios más estudios para llegar a comprender bien este proceso [714].

5.1.4. Efecto del tratamiento con empagliflozina sobre el metabolismo energético del tejido adiposo en ratas ZDF

Además de regular la entrada de Ca^{+2} mitocondrial, y jugar un papel fundamental en el metabolismo aeróbico cardíaco estimulando la producción de ATP, el complejo del MCU también desempeña otras funciones de vital importancia en el TA [647,715]. En el TAM la subunidad EMRE del complejo del MCU recluta a la proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*), también llamada termogenina, un transportador localizado en la MMI que desacopla el gradiente de H^+ mitocondrial de la síntesis de ATP, y libera la energía generada en forma de calor, para conformar el termoportador, un uniportador termogénico que promueve la termogénesis y cuya actividad puede resultar crucial contra el desarrollo de la obesidad y de los trastornos metabólicos asociados [647,716–718]. Además, se sabe que existe un aumento de la expresión de las subunidades que conforman el complejo del MCU y, por lo tanto, de la absorción de Ca^{+2} mitocondrial, en los adipocitos que presentan RI y en el TAV, pero no el TAS, de humanos y ratones obesos y diabéticos, y que la inhibición del MCU en el hígado es capaz de reducir la infiltración lipídica [715,719–721]. Aunque diversos estudios han demostrado la existencia de una relación entre la actividad del complejo del MCU y el metabolismo lipídico, se necesitan más estudios para intentar elucidar los mecanismos implicados en estos procesos [715]. Los datos obtenidos en nuestro trabajo han demostrado por primera vez que el tratamiento de ratas ZDF durante 6 semanas con EMPA es capaz de disminuir significativamente los niveles de expresión génica de Mcu y Micur1, 2 de las subunidades que conforman el complejo del MCU, lo que podría implicar una reducción de la actividad del este complejo, que se ha demostrado que se encuentra incrementada en situaciones de obesidad y de DMT2 [715].

Las alteraciones producidas en la distribución y composición lipídica (lipidoma) de los adipocitos, así como la disfunción del metabolismo de los lípidos en el TA durante la obesidad, afectan de manera negativa a procesos como la diferenciación de los adipocitos, la lipólisis y la sensibilidad a la insulina, favoreciendo el desarrollo de la DMT2, ECVs, cáncer, trastornos neurológicos y del sistema inmune, etc. [722–724]. En los últimos años la lipidómica, una rama de la metabolómica que permite identificar y

cuantificar las diferentes clases de lípidos presentes en un tejido o células, ha ganado popularidad y se ha convertido en una herramienta fundamental para la identificación de los mecanismos bioquímicos implicados en a las enfermedades metabólicas [723–725]. La ausencia de datos sobre los efectos del tratamiento con EMPA en la composición de los lípidos del TA, junto con los hallazgos realizados por nuestro grupo, que demuestran la capacidad del tratamiento con EMPA para modificar el lipidoma cardíaco y hepático de un modelo animal de obesidad y diabetes hacia un perfil protector [307,308], nos han llevado a evaluar los posibles cambios del lipidoma del TAV y del TAS. Los resultados obtenidos demuestran que las alteraciones producidas en el lipidoma del TA de las ratas ZDF tras el tratamiento con 30 mg/kg/día/p.o de EMPA durante 6 semanas, son diferentes en función de la localización de los depósitos del TA.

El tratamiento con EMPA modificó significativamente los niveles de 18 metabolitos del TAV en las ratas ZDF. La clase química más afectada por el tratamiento ha sido la de los DG, observándose el incremento significativo de los niveles de 13 de los 14 DG detectados en el análisis lipidómico del TAV de las ratas tratadas en comparación con las ratas control. Estas modificaciones están acompañadas de un aumento de los niveles del ácido gadoleico, un MUFA, del ácido linoleico, un PUFA, y de 3 oxFA, en comparación con el TAV de las ratas ZDF no tratadas. El conjunto de estos hallazgos sugiere la capacidad de la EMPA para aumentar el gasto energético al estimular la lipólisis en el TAV de nuestro modelo animal de obesidad y DMT2. De manera similar, Lu y col. (2017) [726] han descrito como parte fundamental de la termogénesis inducida por el frío la existencia de un mayor acúmulo de DG en el TAM debido a la estimulación de la lipólisis.

La lipólisis (hidrólisis de los TG en FA y glicerol) junto con la lipogénesis (síntesis de TG) son los procesos fundamentales del ciclo de los glicerolípidos/FA libres, una ruta metabólica fundamental en la regulación de la homeostasis energética, cuya disfunción está estrechamente relacionada con el desarrollo de la obesidad, la DMT2 y el SMet [727–730]. La lipólisis es un proceso que consta de una serie de reacciones enzimáticas, la primera de las cuales consiste en la hidrólisis de los TG por acción de la ATGL, enzima limitante de la reacción, para producir una molécula de ácido graso y DG los cuales, a continuación, son hidrolizados de nuevo por la enzima lipolítica HSL, liberando otra molécula de ácido graso y monoglicéridos que, finalmente, son degradados a glicerol por acción de la monoglicérido lipasa (MGL), liberando otra molécula de ácido graso [729–732]. Además de su actividad lipolítica, recientemente se ha demostrado que la ATGL del TA presenta actividad transacilasa (esterificación de hidroxiácidos grasos con otros FA para producir ésteres de FA de hidroxiácidos grasos), la cual se parece estar relacionada con una reducción de la inflamación y un incremento de la sensibilidad a la insulina [733]. Diferentes estudios han relacionado el aumento de la expresión de ATGL en el TA, no solo con la estimulación de la lipólisis, sino también con una mayor β-oxidación, sensibilidad a la insulina y protección frente a la obesidad [734–737]. El aumento del contenido en DG del TAV de las ratas ZDF tratadas con EMPA, y la relevancia de los procesos lipolíticos en la homeostasis del metabolismo energético del TA, nos llevaron a evaluar la expresión génica de las enzimas lipolíticas

USC
DE COMPOSTELA

en el TA de los animales. Los datos obtenidos apuntan a que el tratamiento con EMPA podría ser capaz de estimular la lipólisis al incrementar la expresión del ARNm de las enzimas ATGL y HSL en el TAV, y HSL en el TAS de las ratas ZDF, lo que sugeriría que la estimulación de la expresión génica de ATGL en el TA de este modelo animal de obesidad y DMT2 por la EMPA podría favorecer la movilización de FA en condiciones de RI. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos recientemente por Yang y col. (2021) [738], los cuales confirmaron que el tratamiento con otro iSGLT2, la canagliflozina, estimula la lipólisis y la termogénesis en el tejido adiposo de ratones al incrementar la expresión génica de las enzimas lipolíticas ATGL y HSL. Los modelos murinos con deficiencia de ATGL muestran un acúmulo excesivo de lípidos en tejidos como el corazón, el hígado y el TA, lo que provoca el desarrollo de obesidad y muerte prematura debido a disfunción cardíaca y hepática [731]. Además, distintos ensayos clínicos han demostrado que la expresión génica y proteica de la ATGL está reducida en el TA de pacientes con RI, y que la expresión y actividad de HSL se encuentra alterada en el TA de pacientes obesos y diabéticos [739]. En un estudio realizado por Lauritsen y col. (2022) [740], el tratamiento con EMPA no fue capaz de modificar los niveles de expresión de estas enzimas lipolíticas en TA de pacientes con DMT2; sin embargo, hay que tener en cuenta que, a diferencia de nuestro estudio, Lauritsen y col. incluyeron en este ensayo muestras de TA de pacientes que habían sido tratados previamente y durante todo el estudio con otros antidiabéticos orales además de la EMPA, por lo que los resultados no son comparables a los obtenidos en nuestro modelo experimental.

Por otra parte, el tratamiento de las ratas ZDF con EMPA indujo cambios significativos en 14 metabolitos del TAS, siendo la clase química más modificada la de los glicerofosfolípidos. Concretamente, se produjo un descenso significativo de los niveles de diferentes LPE, LPC y LPI, y un incremento de los niveles de 2 PC, en concreto la PC(40:0) y la PC(P-16:0/20:4), metabolitos cuyos niveles en el TA se regulan en función de las modificaciones, fisiológicas y/o fisiopatológicas, producidas en el metabolismo energético [741]. Estos resultados coinciden con los previamente publicados por nuestro grupo de investigación sobre el estudio del tejido cardíaco auricular de los animales, en el que se había observado una disminución significativa de los niveles de LPE, LPC y LPI inducida por la EMPA [308].

Se ha descrito previamente que el ejercicio físico es capaz de reducir los niveles totales de LPG y LPI en TAB inguinal de ratones macho C57BL/6 J jóvenes (10 semanas de edad) [745], mientras que el envejecimiento aumenta el contenido total de LPC en estos depósitos de TAV de ratones macho C57BL/6 J de 10-12 meses de edad [722,743]. Las LPC, componentes principales de las LDL oxidadas, están involucradas en diferentes procesos como, por ejemplo, la captación de glucosa en el TA, la regulación de la expresión endotelial de quimioquinas proinflamatorias, el incremento del estrés oxidativo y la supresión de la división y movilización de las células endoteliales en modelos animales de DMT1 y DMT2 [744,745]. Además, los resultados obtenidos en diferentes análisis lipidómicos han demostrado que el aumento de los niveles de LPC se asocia positivamente con los depósitos de grasa visceral y cardíaca [742,743,746]. Por

USC DE COMPOSTELA

ejemplo, se ha observado que la especie de LPC PC(0:0/20:3), cuyos niveles en el TAS de nuestro modelo animal han sido reducidos por la EMPA, se encuentra incrementada en el TA de ratones alimentados con dieta alta en grasas en comparación con los que recibieron una dieta estándar, lo que concuerda con el incremento de las concentraciones de LPC y de LPE en la adipogénesis [746]. Aunque se ha establecido que existe una relación entre los niveles de LPC y las comorbilidades asociadas a la fisiopatología de la obesidad, los hallazgos recogidos en la literatura científica no son consistentes [744]. Por otra parte, se ha descrito un incremento de los niveles circulantes de LPI en pacientes con obesidad, en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y en ratones db/db en comparación con los ratones db/m; por lo que se considera un biomarcador de pronóstico de la obesidad y otras patologías inflamatorias [747–749]. Los LPI son los ligandos endógenos del receptor 55 acoplado a proteína G (GPR55, *G-protein coupled receptor 55*), un nuevo receptor endocannabinoide y, aunque también ejercen sus efectos a través de mecanismos independientes, la activación de este receptor mediante la interacción con los LPI provoca alteraciones del metabolismo energético, al estimular la diferenciación de los adipocitos y la expresión de genes lipogénicos en el TAV y TAS [749,750]. Además, se ha visto que la estimulación de la vía de señalización GPR55/p38 por los LPI incrementa la secreción de citoquinas proinflamatorias en el TA de ratones db/db [748]. Por estos motivos, se ha propuesto al sistema LPI/GPR55 como una posible diana farmacéutica para el tratamiento de la obesidad y la DMT2 [749].

La glucoproteína de 88 kDa CD36 es un transportador de FA de cadena larga que participa en el proceso de la lipólisis, y que se expresa en la membrana plasmática de cardiomiocitos, adipocitos, hepatocitos, células renales, plaquetas, eritrocitos inmaduros, células endoteliales microvasculares, células del duodeno y del yeyuno (mayor absorción de grasas a nivel del intestino), células del sistema inmune como los macrófagos o células epiteliales intestinales [751–754]. Los estudios realizados en personas obesas han demostrado un incremento de los niveles de expresión génica de CD36 en el TAV y TAS, así como de los niveles circulantes de CD36 (CD36 soluble), lo que se relaciona con la RI, la acumulación de lípidos, los procesos inflamatorios, el estrés oxidativo, la apoptosis y el desarrollo de trastornos metabólicos como la DMT2 y la esteatosis hepática [755–758]. En concordancia con esos hallazgos, los datos obtenidos en modelos animales con deficiencia de CD36 ($CD36^{-/-}$) o en los que se ha inhibido el receptor, muestran un aumento de la lipólisis y de la sensibilidad a la insulina y una reducción del tamaño de los depósitos de TAV [751,759,760]. Nuestro grupo y otros autores hemos demostrado previamente la capacidad de la EMPA para reducir los niveles de expresión génica de Cd36 en el tejido cardíaco auricular de las ratas ZDF [308] y en células del túbulo proximal renal de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasas [761], respectivamente. En el trabajo realizado en esta tesis doctoral hemos descrito por primera vez la capacidad de la EMPA para reducir los niveles de expresión del ARNm de Cd36 en el TAV y TAS de las ratas ZDF en comparación a su control no tratado, lo cual podría sugerir un muevo mecanismo mediante el cual la EMPA ejerce su efecto protector al regular la homeostasis de los FA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON SACUBITRIL/VALSARTÁN EN UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDÍACA CON FRACCIÓN DE EYECCIÓN PRESERVADA Y EN CARDIOMIOCITOS EN CULTIVO

La obesidad, la DMT2, el SMet y la HTA son los principales factores implicados en el desarrollo de la ICFEp, un síndrome caracterizado por DD, procesos inflamatorios, disfunción neurohormonal (modificaciones del SNS, SRAA y del sistema de PN) y alteraciones del metabolismo energético cardiaco y función mitocondrial que en la actualidad afecta a casi la mitad del cómputo total de los pacientes con IC [333,336,353,354,358,398]. La heterogeneidad y variedad fenotípica de la ICFEp dificultan su diagnóstico, y limitan las opciones terapéuticas que, en la actualidad, y a pesar de haber demostrado sus beneficios a la hora de reducir las hospitalizaciones y la mortalidad de los pacientes con ICFEr, en el caso del tratamiento con ICFEp se limitan a paliar los síntomas de la patología [309,353,354]. Entre la farmacoterapia disponible, los diuréticos, el iSGLT2 EMPA y los ARNi son, en la actualidad, los principales fármacos empleados en el tratamiento de la ICFEp [234,253,309,450].

El ARNi SAC/VAL, un inhibidor dual del receptor AT1 y de la NEP, ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con IC, independientemente del valor de la FEVI, aunque su capacidad para reducir las hospitalizaciones y la mortalidad por IC solo se observa en pacientes con ICFER [309,484,485]. Además de los numerosos ensayos clínicos realizados, de los cuales los más conocidos son el PARADIGM-HF, PIONEER-HF, PARAMOUNT y PARAGON-HF, los efectos de SAC/VAL también se han evaluado en diferentes modelos animales de ICFEr e ICFEp y de otras ECVs, como por ejemplo la HTA y el IM [521,524,528–530,538]. Estos estudios demostraron los efectos antihipertróficos, antifibróticos y antihipertensivos del SAC/VAL, su eficacia para mejorar la función cardíaca, e incluso su capacidad para proteger frente a los efectos secundarios producidos por el tratamiento con ciertos agentes quimioterapéuticos a nivel cardíaco [521–524,541]. Sin embargo, ante la escasez de estudios en los que se hayan evaluado los efectos metabólicos del tratamiento con SAC/VAL, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido analizar las posibles modificaciones inducidas por el SAC/VAL en el metabolismo cardíaco, tanto *in vitro* como *in vivo*, empleando para ello cultivos celulares y un modelo animal de ICFEp con obesidad y SMet.

5.2.1. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre las características generales de las ratas ZSF1

El incremento de los depósitos de TAV en la obesidad debido a una ingesta calórica excesiva, junto con la DMT2, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la ICFEp [335,337]. Actualmente, los datos recogidos en la bibliografía acerca de los efectos de SAC/VAL sobre el peso corporal y la ingesta de alimentos son escasos, y difieren en función del modelo animal utilizado [522–524,545,762] e incluso entre pacientes según sus características clínicas [551,763–766]. Recientemente, Abo-khookh y col. (2023) [762] demostraron que el tratamiento con SAC/VAL de ratas con DMT2 inducida por una dieta rica en grasas y fructosa producía una reducción

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

significativa de la ingesta de alimentos, lo que se veía reflejado en una disminución significativa del peso corporal de los animales en comparación al grupo control de la dieta alta en grasas e incluso al grupo control con dieta estándar. Sin embargo, en otros modelos animales de prediabetes e HFpEF no se observaron modificaciones en la ingesta de alimentos ni en el peso corporal de los animales tratados con SAC/VAL [522,524,545,767]. Un análisis *post hoc* del ensayo PARADIGM-HF mostró además que el tratamiento con SAC/VAL de pacientes obesos con ICFEp aumentaba significativamente el índice de masa corporal en comparación con enalapril [551]. Por otra parte, mientras que en un estudio observacional retrospectivo realizado en el Instituto Internacional del Corazón (IHI, *International Heart Institute*) de la Universidad de Loma Linda (USA) no se observaron cambios en el peso corporal de los pacientes con ICFEr tratados con SAC/VAL [763] en el ensayo clínico NATRIUM-HF se demostró que el tratamiento de pacientes con ICFEr fue capaz de reducir significativamente su peso corporal en comparación de con los valores basales [765].

Semanalmente, a lo largo de todo el procedimiento experimental, se evaluó la evolución del peso corporal, la ingesta de comida y el consumo de agua de todos los animales y se observó que, durante las 4 primeras semanas del tratamiento con SAC/VAL, se produjo una reducción significativa de la ingesta de alimento de las ratas ZSF1-obesas en comparación con los animales obesos control. Durante las 9 semanas de tratamiento se observó que el peso de las ratas ZSF1-obesas tratadas con SAC/VAL fue moderadamente inferior al de las obesas control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, a excepción de la semana 20 de edad, en la que se observó una reducción significativa del peso de los animales del grupo obeso SAC/VAL en comparación al grupo obeso control, lo que creemos que podría estar relacionado con la reducción de la ingesta de comida que tuvo lugar en las semanas previas. Nuestros resultados concuerdan con los previamente observados en el estudio realizado por Schauer y col. (2021) [524], en el que el tratamiento de ratas hembra ZSF1-obesas con 60 mg/kg/día de SAC/VAL durante 12 semanas tampoco modificó el peso corporal de los animales. En cuanto a las modificaciones observadas en la ingesta de comida, la investigación realizada por Abo-khookh y col. (2023) [762] demostró que los cambios observados en el grupo tratado con SAC/VAL no se observaban en el grupo tratado exclusivamente con VAL, por lo que la reducción de la ingesta de comida debe estar relacionada, principalmente, con la inhibición de la NEP por el sacubitril. Como se explicó previamente en el apartado 1.3.4.1.3. de la introducción, la inhibición de la NEP impide la degradación de los PN como, por ejemplo, el ANP y el BNP, lo que favorece que ejerzan sus efectos a través de su unión con los receptores NPR-A y NPR-B [359,399, 401,405]. Además de favorecer la vasodilatación, la natriuresis, la diuresis, etc., diferentes estudios han demostrado las propiedades saciantes del BNP mediante la disminución de los niveles circulantes de grelina, una hormona orexigénica que transmite la información acerca del estado de ingesta al cerebro, estimulando el apetito y la adiposidad [768,769]. Además, la NEP también degrada la secretina, una hormona gástrica secretada en respuesta a la presencia de FA y a una disminución del pH (pH < 4.5), la cual, al contrario que la grelina, produce una sensación de saciedad mediante la activación de las neuronas de proopiomelanocortina (POMC), neuronas anorexigénicas

que se localizan en el hipotálamo, y que, además, regula la termogénesis en el TAM [770–773]. Otro factor que podría estar implicado en la reducción de la ingesta observada es la inhibición del AT1R por el VAL, que produce un incremento de los niveles de Ang II que es convertida en Ang-(1-7) por acción de la ECA2, la cual puede estimular la disminución del peso corporal a través de la activación del receptor Mas [397,398,762,774–776]. Sin embargo, Müller-Fielitz y col. (2011) [777], han propuesto que, en la pérdida de peso estimulada por la Ang-(1-7), estaría implicado algún mecanismo dependiente de la leptina, por lo que, en animales como los ZSF1, que presentan mutaciones del receptor de leptina, no se observarían estos cambios [776,777].

A pesar de la ausencia de cambios en el peso corporal total, el tratamiento con SAC/VAL de las ratas ZSF1-obesas fue capaz de reducir de manera significativa el peso normalizado por la LT de órganos como el corazón, el hígado, el bazo (estos resultados serán discutidos con mayor detalle en los próximos apartados) y el TA perigonadal. Este es el primer estudio *in vivo* en el que se ha descrito la capacidad del SAC/VAL para reducir el peso de los depósitos de grasa perigonadal de las ratas ZSF1-obesas, un depósito típico de TAV en roedores [102,778,779].

En cuanto al posible impacto del tratamiento con SAC/VAL en el consumo de agua, los datos recogidos en la literatura científica son prácticamente inexistentes. En la actualidad solamente existen 2 estudios *in vivo* en los que el tratamiento con SAC/VAL de un modelo animal de enfermedad renal y de ratas hipertensas hizo descender ligeramente, sin ser un cambio significativo, la ingesta de agua en comparación con el grupo control [780,781]. En concordancia con estos hallazgos, nuestros resultados mostraron que, como era de esperar, ambos grupos de animales obesos presentaban un consumo de agua mucho mayor que el de las ratas no obesas, y que el tratamiento con SAC/VAL no tuvo ningún efecto sobre este valor. Otro de los efectos característicos del SAC/VAL es la estimulación de la diuresis mediante la inhibición de la actividad de la NEP y la potenciación de la actividad de los PN [359,499]; sin embargo, nuestros resultados no muestran variaciones en la producción de orina entre los grupos obeso SAC/VAL y obeso control.

Además de la obesidad y la DMT2, la dislipemia y la HTA también son factores importantes en la fisiopatología de la ICFEp [336]. En los ensayos clínicos realizados con pacientes con IC, independientemente del valor de la FEVI, tratados con SAC/VAL, se observó una reducción en los niveles séricos de TG y/o Cho total [782–784]. También se observó una disminución de los niveles de Cho total tras la administración de SAC/VAL en diferentes modelos animales de DM [785,786]. En nuestro modelo experimental, después de 9 semanas de tratamiento con SAC/VAL, hemos observado un descenso significativo de los niveles séricos de Cho total, aunque no de TG. Además, había un descenso significativo de los niveles séricos de sodio, cuyo incremento suele estar relacionado con el desarrollo de la HTA [787,788]. Por otra parte, la ERC es una comorbilidad característica de todo el espectro de la FE en la IC [789,790]. Los niveles de creatinina sérica son un biomarcador de disfunción renal [791,792] y diferentes estudios *in vivo* han demostrado que el tratamiento con SAC/VAL de varios modelos animales de DM fue capaz de reducir los niveles séricos de este marcador, lo que puede

relacionarse con un efecto renoprotector de la combinación de fármacos [548,793,794]. Por el contrario, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con SAC/VAL de las ratas ZSF1-obesas produjo un aumento significativo de los niveles séricos de creatinina, lo que puede indicar un empeoramiento de la función renal por lo que sería necesario realizar más estudios. Esta discrepancia con respecto a los resultados obtenidos en modelos animales con DM puede deberse a la concomitancia de otras enfermedades como la ICFEp, la HTA, etc., lo que provoca un empeoramiento del estado de los animales. Por otro lado, los efectos del tratamiento con SAC/VAL en los niveles circulantes de creatinina de pacientes con IC y daño renal son bastante variados ya que, mientras en algunos grupos de pacientes no se observaron cambios [795], en otros se observó que es capaz de frenar el aumento de los niveles séricos de la creatinina después de 12 semanas de tratamiento [796].

5.2.2. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre la función cardíaca de las ratas ZSF1

Como se explicó previamente en el apartado 1.3.4. de la introducción, en las primeras etapas del desarrollo de la ICFEp tiene lugar la DD del VI, al producirse el deterioro de la capacidad de relajación y de la elasticidad de las paredes, junto con un incremento de las presiones de llenado del VI, lo que, en última instancia, da lugar a la aparición de síntomas como el edema, la disnea, la pérdida de TE y el aumento del número de hospitalizaciones y muertes debido a ICFEp [355–357]. Es importante tener en cuenta que el deterioro de la elasticidad y de la relajación del VI no siempre implica la presencia de ICFEp, sino que también se ha demostrado su relación con la existencia de ciertas comorbilidades como la obesidad, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, la RI, la HTA y/o con procesos naturales como el envejecimiento [356]. La evaluación de la DD no solo permite realizar un diagnóstico, sino que proporciona información acerca del pronóstico de la patología y de qué terapia farmacológica puede ser la más adecuada [357,358]. Parámetros ecocardiográficos como el IVRT (tiempo transcurrido desde el cierre de la válvula aórtica hasta la apertura de la válvula mitral), el área de la AI y los ratios E/e' (medida de la presión de llenado del VI) y E/A (medida de la velocidad de llenado del VI) permiten evaluar de la DD en los modelos animales de ICFEp [341,356,560]. Otras anomalías cardíacas, como la disfunción sistólica del VI, las modificaciones de la AI, etc., juegan un papel importante en el desarrollo de la ICFEp [355], por lo que también es importante la evaluación de parámetros como la FEVI, la masa del VI, el CO y el índice Tei [341,355].

Los datos de estudios previos realizados en pacientes con ICFEr [797] y en modelos animales de diferentes ECVs [521,522,524,798–800] que aparecen recogidos en la bibliografía científica describen la capacidad del SAC/VAL para producir una mejora, no solo de la función diastólica, sino también de la función cardiaca global. Nuestros resultados han demostrado que el tratamiento de ratas ZSF1-obesas con 68 mg/kg/día/p.o. de SAC/VAL disminuyó significativamente el IVRT en comparación con el grupo obeso control a partir de las 4 semanas (18 semanas de edad) de tratamiento, manteniéndose este efecto hasta la finalización del experimento. Además, al terminar el tratamiento (22 semanas de edad) también se observó una disminución significativa del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

valor del índice Tei y de la masa del VI en comparación con el grupo obeso control, lo que parece indicar que el tratamiento con SAC/VAL provoca una mejora de la estructura y de la función diastólica del VI de las ratas ZSF1-obesas. Adicionalmente, aunque este cambio no fue estadísticamente significativo, se observó una ligera reducción de los ratios E/e' y E/A frente al grupo obeso control al final del tratamiento con SAC/VAL. Todos estos datos concuerdan con los obtenidos previamente por Shi y col. (2023) [521], que observaron que la administración de 18 mg/kg/día de SAC/VAL a un modelo animal de ICFEp inducida por estreptozotocina (STZ) durante 6 semanas provocaba una reducción significativa del IVRT y de la masa del VI en comparación con los animales no tratados. Además, la reducción del índice Tei y/o del IVRT tras el tratamiento con SAC/VAL también se observó en un modelo animal de obesidad y DM, y en un modelo murino de ICFEp inducida mediante constricción aórtica transversal, respectivamente [522,799]. En cuanto a los efectos del tratamiento con SAC/VAL sobre los ratios E/e' y E/A, todavía no existe un consenso. Los resultados obtenidos por Aroor y col. (2021) [522], al igual que los nuestros, encuentran que el tratamiento de un modelo animal de obesidad y diabetes con 68 mg/kg/día de SAC/VAL durante 10 semanas no modifica los valores de los ratios E/e' y E/A. Sin embargo, Shi y col. (2023) [521], y Schauer y col. (2021) [524] observaban que el tratamiento con SAC/VAL de ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR, *spontaneously hypertensive rats)* que desarrollaron ICFEp tras la administración de STZ y de ratas hembra ZSF1 obesas, fue capaz de reducir significativamente la relación E/e'.

Dos procesos implicados en los cambios estructurales que sufre el miocardio y que, por lo tanto, contribuyen al desarrollo de la DD durante la ICFEp, son la hipertrofia y la fibrosis del VI [354,521,801]. Al igual que en los estudios previos realizados en humanos con ICFEr [530,531], así como en modelos animales de obesidad y prediabetes, IM, ICFEp, y ERC [521–524,536,537] el tratamiento de las ratas ZSF1-obesas con 68 mg/kg/día de SAC/VAL durante 9 semanas mejoró significativamente la hipertrofia y fibrosis del VI en comparación con el grupo obeso control, lo que puede estar relacionado con la reducción significativa del peso del corazón/TL de las ratas ZSF1-obesas tratadas con SAC/VAL.

5.2.3. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre el metabolismo de la glucosa en las ratas ZSF1

En algunos de los ensayos clínicos en los que se evaluaron los efectos del tratamiento de pacientes con IC con SAC/VAL, se observó una disminución moderada de los niveles circulantes de glucosa y HbA1c, así como una menor necesidad de administrar dosis elevadas de insulina a los pacientes [549,551,802,803]. Estos efectos beneficiosos no son exclusivos de las personas que padecen IC, sino que el tratamiento de pacientes obesos con HTA o diabéticos con SAC/VAL también mejoró la sensibilidad a la insulina [550,804]. Se ha descrito que estos efectos del SAC/VAL podrían deberse al incremento de los niveles de PN, los cuales han demostrado participar en la regulación del metabolismo energético y la homeostasis de la glucosa (disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa, aumentan la captación de glucosa por los cardiomiocitos en condiciones de hipoxia y favorecen el metabolismo de la glucosa en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

los adipocitos) mediante un mecanismo que implica la activación de AMPK [805,806]. Además, la capacidad del SAC/VAL para regular el metabolismo de la glucosa se comprobó *in vitro* en diferentes modelos animales de hiperglucemia, DM, y enfermedad renal diabética [548,762,786,793,807].

Las ratas ZSF1-obesas presentan niveles de glucosa en sangre muy elevados, que triplican los valores detectados en los animales ZSF1-no obesos. Debido a los datos recogidos en la literatura científica, decidimos evaluar los efectos del SAC/VAL en la homeostasis de la glucosa de este modelo animal. A lo largo del período de tratamiento (antes de comenzar con la administración del tratamiento y a las 18 y 22 semanas de edad), se evaluó la capacidad del SAC/VAL para mejorar la TOG y la RI de las ratas ZSF1, observándose una ligera mejora, aunque no significativa, de la TOG y de la RI del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el grupo obeso control. Al finalizar el tratamiento no se observaron modificaciones en los niveles circulantes de glucosa y de cetonas de las ratas ZSF1-obesas tratadas con SAC/VAL en comparación con las ratas obesas no tratadas. Nuestros hallazgos concuerdan con los obtenidos por Schauer y col. (2021) [524], en los que el tratamiento con SAC/VAL durante 12 semanas no modificaba los niveles séricos de glucosa de las ratas hembra ZSF1-obesas. Además, la ausencia de cambios en los niveles de glucosa tras el tratamiento con SAC/VAL también fue observado por Habibi y col. (2019) [785] en un modelo animal de obesidad y DMT2.

5.2.4. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre el metabolismo cardiomiocitario *in vitro*

Los ensayos de actividad metabólica realizados en la línea celular HL-1 de cardiomiocitos atriales murinos y en cardiomiocitos neonatales de rata, demostraron que el tratamiento *in vitro* con ambas dosis de LBQ657 + VAL en ausencia de suero no tiene ningún efecto sobre la actividad metabólica y, por lo tanto, la viabilidad cardiomiocitaria. Aunque actualmente hay pocos datos recogidos acerca de los efectos del tratamiento con LBQ657 + VAL *in vitro*, nuestros hallazgos concuerdan con los obtenidos por Wu y col. (2022) [542], en los que el tratamiento de cardiomioblastos de rata H9c2 con LBQ657 + VAL no modificaba la viabilidad celular en comparación con el control. Sin embargo, el cotratamiento de agentes quimioterapéuticos (DOXO o trióxido de arsénico) con LBQ657 + VAL si ha probado ser capaz de revertir el daño provocado por estos fármacos cardiotóxicos en la viabilidad de los cardiomioblastos de rata [542,544,545].

La IC, concretamente la ICFEp, se caracteriza por el deterioro del metabolismo energético cardiaco, lo que supone una producción de ATP insuficiente para el correcto funcionamiento del corazón debido a una serie de procesos como, por ejemplo el incremento de la producción de EROs, la desregulación de las concentraciones de Ca^{+2} mitocondrial, etc., que provocan el daño y mal uso de los sustratos energéticos disponibles y la disfunción de las mitocondrias del miocardio, encargadas de la producción del ATP necesario mediante la OXPHOS [310,428,808]. Actualmente, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos clínicos y en los estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito una gran variedad de efectos beneficiosos del SAC/VAL a nivel cardíaco [492–494,521,524]. Sin embargo, su posible efecto en el metabolismo cardiomiocitario

durante la ICFEp todavía no se ha definido completamente, y requiere de más investigación.

El primer paso, debido a la ausencia de datos bibliográficos, fue evaluar los posibles efectos del SAC/VAL en la incorporación de FA y glucosa en los cardiomiocitos. El tratamiento de la línea celular HL-1 y de los cardiomiocitos neonatales de rata con LBQ657 + VAL no modificó la captación de FA por los cardiomiocitos ni la traslocación de GLUT4 (el principal transportador de glucosa expresado a nivel cardíaco) hacia la membrana plasmática para favorecer la incorporación de la glucosa, respectivamente [809,810]. Sin embargo, aunque no es un cambio estadísticamente significativo, se observó que el tratamiento del cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata con LBQ657 + VAL daba lugar a un ligero incremento de la expresión de Cd36 y de Lipe (HSL), lo que podría estar relacionado con un moderado aumento del almacenamiento de FA como TG en los cardiomiocitos y su posterior degradación mediante el proceso de lipólisis [649–651]. Recientemente, se ha descrito que el tratamiento con SAC/VAL no modificaba los niveles de expresión proteica y/o la activación mediante fosforilación de las enzimas lipolíticas HSL y ATGL en el TA subcutáneo de pacientes con HTA y obesidad [811].

En esta tesis doctoral también se ha evaluado el efecto del SAC/VAL en los procesos autofágicos que tienen lugar en los cardiomiocitos neonatales de rata. La autofagia juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y función cardíaca, al encargarse de eliminar los orgánulos dañados y las proteínas plegadas de forma incorrecta, y al mismo tiempo generar diferentes sustratos energéticos que serán utilizados para la producción de ATP (Fig. 5.1.) [812,813].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

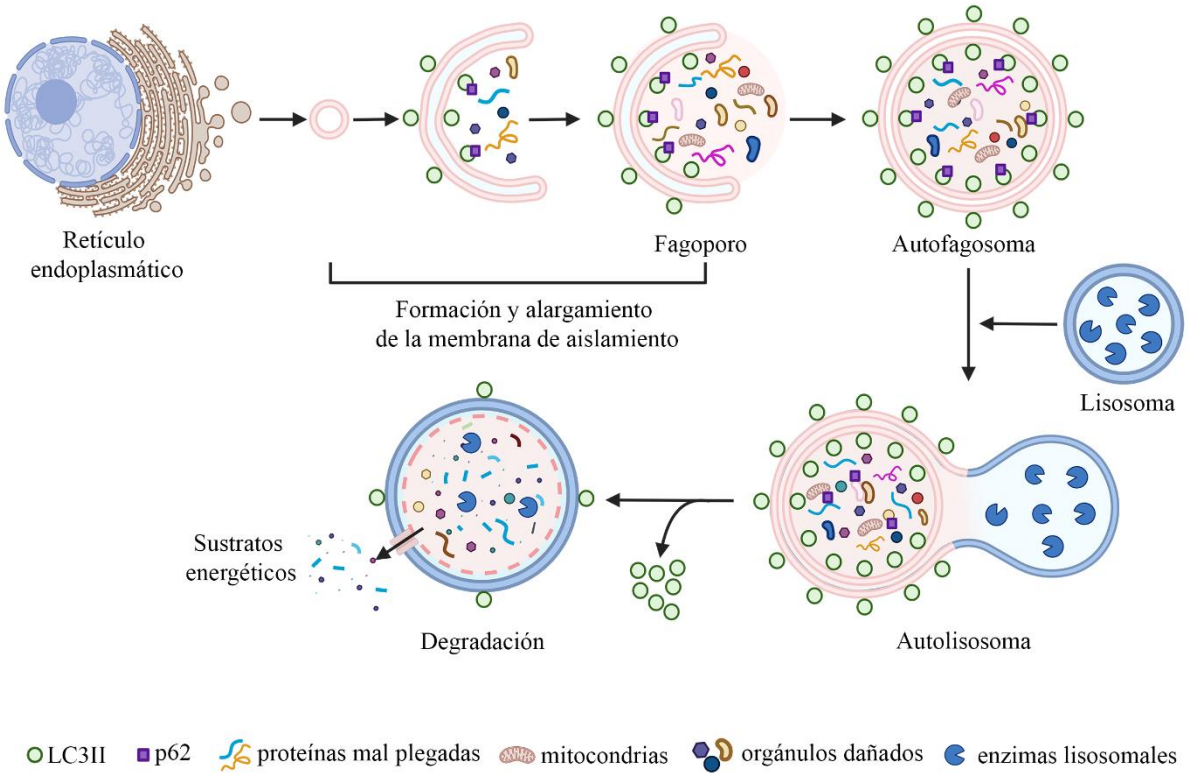


Figura 5.1.: Representación esquemática del proceso de autofagia. Imagen de autoría propia con elementos de BioRender®.com.

La autofagia desempeña un papel crucial en la renovación mitocondrial, al eliminar las mts dañadas o disfuncionales mediante un proceso conocido como mitofagia [814]. En situaciones patológicas como, por ejemplo, el remodelado cardíaco, se produce una mayor activación de la autofagia para intentar contrarrestar el estrés oxidativo, disfunción del metabolismo energético, muerte celular y sobrecarga de presión [812,813,815,816]. Sin embargo, el papel de la autofagia en la IC, especialmente en la ICFEp, no está claro ya que, aunque se ha observado que ciertos modelos animales de obesidad, DMT2 y SMet muestran una atenuación de los procesos autofágicos, lo que conduce a la acumulación de moléculas, proteínas y orgánulos dañados que contribuyen al desarrollo de la IC, otros estudios *in vivo* han mostrado que un exceso de autofagia también participa en la fisiopatología de la IC [308,817,818]. A pesar de estas discrepancias, se ha propuesto la regulación de la autofagia a nivel cardíaco como una diana terapéutica para la prevención y tratamiento de cardiomiopatías e IC [812].

Actualmente solo aparecen recogidos en la literatura científica 3 estudios en los que se evalúan los efectos del SAC/VAL en la modulación de la autofagia, los cuales muestran resultados contradictorios. Yang y col. (2019) [819] demostraron que el tratamiento de un modelo animal de síndrome cardiorrenal con SAC/VAL reducía la autofagia renal, al disminuir la expresión proteica del ratio LC3II/LC3I, así como de otros biomarcadores de autofagia (Beclina-1 y proteína 5 relacionada con la autofagia (Atg5, *autophagy related 5*)). Sin embargo, los estudios realizados por Khamis y col.

(2022) [820] en un modelo animal de hipertrofia cardíaca inducida por hipertiroidismo, mostraron que el tratamiento con SAC/VAL incrementaba la expresión proteica de LC3 y de Beclina y reducía la expresión de p62. Finalmente, un estudio *in vitro* realizado en la línea celular de macrófagos J774A.1, mostró un incremento de los niveles de expresión proteica de LC3II, pero también de los niveles proteicos de p62 tras el tratamiento con LBQ657 + VAL [821]. Nuestros resultados muestran que el tratamiento del cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata con ambas dosis de LBQ657 + VAL durante 24 horas induce un incremento de la expresión proteica del ratio LC3II/LC3I, un biomarcador de autofagia. Sin embargo, no se observaban cambios en la expresión proteica de p62, por lo que no podemos considerar que el tratamiento con LBQ657 + VAL produzca un incremento del flujo autofágico cardiomiocitario.

5.2.5. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán sobre el metabolismo cardíaco de las ratas ZSF1

Además de los estudios *in vitro* realizados en cultivos de una línea celular de cardiomiocitos atriales murinos y en cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata, los posibles efectos del tratamiento con SAC/VAL en el metabolismo cardíaco también se evaluaron *in vivo* en un modelo animal de ICFEp con obesidad y DMT2.

Como se explicó en el apartado 1.3.4.4. de la introducción las mts son las encargadas de generar la energía necesaria, a partir de la OXPHOS, para el correcto funcionamiento del corazón, y su disfunción juega un papel fundamental en la fisiopatología de la ICFEp por lo que, a día de hoy, se busca que las nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento de la ICFEp también sean capaces de regular la función mitocondrial [310,349,422,423,425,669]. Investigaciones previas en las que se evaluaron los posibles efectos del tratamiento con SAC/VAL, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre la función mitocondrial describieron que el SAC/VAL es capaz de producir una mejora de la función mitocondrial a través de diferentes mecanismos [546,821–825]. Por ejemplo, Vergaro y col. (2024) [822] describieron como el tratamiento de un modelo murino de disfunción del VI inducida por isoproterenol con SAC/VAL consiguió revertir las alteraciones morfológicas mitocondriales (tamaño, forma de las crestas y aspecto de la MM) y restaurar los niveles de expresión de diferentes genes implicados en el mantenimiento de la función mitocondrial. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de las ratas ZSF1 obesas con SAC/VAL durante 9 semanas indujo una mejora, aunque no estadísticamente significativa, de la función mitocondrial cardíaca del estado OXPHOS y de transferencia de electrones, al producir un moderado incremento de la tasa de respiración mitocondrial del tejido del VI en comparación al grupo obeso control, alcanzando niveles de respiración mitocondrial similares a los de los animales no obesos. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Li y col. (2021) [824], los cuales mostraron que el tratamiento de un modelo animal de sobrecarga persistente de presión del VI con SAC/VAL fue capaz de incrementar la capacidad respiratoria mitocondrial máxima y adicional de los cardiomiocitos.

Debido a que la disfunción del metabolismo cardíaco es la base de casi todas las ECVs (particularmente la IC), los estudios metabólicos se han convertido en una herramienta fundamental que permiten estudiar y definir las modificaciones que tienen

lugar en los metabolitos cardíacos, mejorar la comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades y elucidar los mecanismos alterados por la terapia farmacológica [616,826,827]. Sin embargo, a pesar de su utilidad, actualmente solo se ha publicado un estudio en el que se evaluó el metaboloma del suero de un modelo de rata con IC post IM tras el tratamiento con SAC/VAL [828]. Por este motivo, decidimos emplear la metabolómica descriptiva para realizar la caracterización de los metabolitos presentes en el tejido del VI después de 9 semanas de tratamiento con 68 mg/kg/día de SAC/VAL en ratas ZSF1 obesas. El perfil metabólico del tejido cardíaco demostró que el SAC/VAL es capaz de alterar la composición lipídica del VI al reducir de manera significativa los niveles de glicerofosfolípidos (7 LPC, 3 PC y 1 LPG), 1 DG, 1 Cho y 2 ChoE del VI, e incrementar significativamente los niveles de 10 TG y una PE en comparación con el grupo obeso control. Los glicerofosfolípidos son unos lípidos bioactivos, que conforman las membranas celulares, actúan como sitios de unión para proteínas y participan en el metabolismo y la señalización celular [829]. Las alteraciones de la membrana lipídica de células como los cardiomiocitos parecen estar relacionadas con procesos inflamatorios y con el desarrollo de ECVs; de hecho, el acúmulo de glicerofosfolípidos en el tejido cardíaco, debido a una dieta elevada en grasas, se asocia el desarrollo de DD [308,830]. Han y col. (2018) [831], demostraron que niveles cardíacos elevados de Cho en un modelo animal de hiperlipidemia se relacionaban con un incremento de la fibrosis y apoptosis, que finalmente derivaba en daño miocárdico; por lo que la disminución de la acumulación de este metabolito en el tejido cardíaco de las ratas ZSF1 obesas tras el tratamiento con SAC/VAL, podría ser beneficiosa a nivel miocárdico. Estos resultados concuerdan con la disminución estadísticamente significativa de los niveles de Cho circulantes que hemos observado en las ratas ZSF1 obesas tratadas con SAC/VAL.

Por otra parte, las lipoproteínas circulantes, como el LDL, son modificadas en la MEC de diferentes tejidos, produciendo un incremento significativo de los niveles de ChoE, cuya acumulación en miocardio provoca alteraciones en el metabolismo cardíaco alteraciones en la expresión de los receptores de insulina y GLUT4 en el miocardio), y juega un papel fundamental en el remodelado del VI y en la fisiopatología de la DD, por lo que una reducción de los niveles de ChoE cardíacos podría tener un impacto terapéutico relevante en ECVs relacionadas con alteraciones metabólicas (obesidad, DMT2, dislipemia) como es el caso de la ICFEp [832–837]. Estos hallazgos resultan fundamentales para ayudarnos a comprender los posibles efectos beneficiosos del tratamiento con SAC/VAL en la función, estructura y metabolismo cardíacos, así como a dilucidar los posibles mecanismos implicados.

También observamos que el tratamiento con SAC/VAL generaba un aumento significativo de la acumulación de TG cardíacos. En condiciones normales, una gran parte de los FA circulantes (aproximadamente el 75%) son oxidados en la mitocondria para producir las cantidades de ATP necesarias para mantener el funcionamiento cardíaco, y el resto de los FA se acumulan en el miocardio como TG a modo de reserva energética [310,349,425]. Sin embargo, en condiciones patológicas como la obesidad, la DMT2 y la ICFEp, la β-oxidación de los FA es deficiente, y se produce una

USC
DE COMPOSTELA

acumulación patológica de TG en el miocardio conocida como esteatosis miocárdica, que juega un papel fundamental en el desarrollo de la disfunción cardíaca [310,349,425]. En el año 2008 Rijzewijk y col. [838] demostraron que los pacientes con DMT2 presentaban niveles elevados de TG en el tejido cardíaco, y que esta acumulación excesiva podría estar relacionada con la DD del VI. Posteriormente se propuso que la esteatosis miocárdica puede ser empleada como un indicador de las primeras fases de la cardiomiopatía diabética [839]. Sin embargo, a pesar de que la acumulación miocárdica de TG se considera fundamental en el desarrollo de la lipotoxicidad y la disfunción cardíaca, Listenberger y col. (2003) [840] han propuesto que el incremento del contenido de TG en cardiomiocitos puede presentar efectos protectores frente a la lipotoxicidad inducida por los FA.

5.2.6. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán en el músculo esquelético de las ratas ZSF1

Los procesos y comorbilidades característicos de la fisiopatología de la ICFEp como el estrés oxidativo, la inflamación sistémica, los cambios hormonales, la DMT2, la inactividad física y los cambios moleculares en el músculo esquelético, que afectan a las fibras que lo componen y al metabolismo energético, conducen al desarrollo de la sarcopenia, una patología caracterizada por la reducción de la cantidad, calidad y fuerza muscular [841–843]. Todas estas alteraciones también están relacionadas con el desarrollo de otro de los síntomas característicos de la ICFEp, la intolerancia al ejercicio físico, que se relaciona con una peor calidad de vida del paciente [349,524,669,841]. Es importante destacar que los pacientes con ICFEp y DMT2 presentan una mayor reducción de la TE en comparación con aquellos que no presentan esta comorbilidad [844]. Por este motivo, uno de los objetivos de la terapia para el tratamiento de la ICFEp es la mejora de la función y de la fuerza del músculo esquelético y de la TE en combinación con el entrenamiento físico [524].

Aunque diferentes autores han descrito la capacidad del SAC/VAL para mejorar la TE de pacientes y de modelos animales de ICFEr, estos resultados no se han podido reproducir en pacientes con ICFEp debido a la ausencia de estudios [845–848]. Por lo tanto, todavía es necesario realizar investigaciones que permitan evaluar los posibles beneficios clínicos del SAC/VAL sobre la capacidad del ejercicio físico de los pacientes con ICFEp. Como las ratas ZSF1 obesas presentan alteraciones en el músculo esquelético e intolerancia al ejercicio físico [524,561,849], síntomas característicos de los pacientes con ICFEp, decidimos evaluar los posibles efectos del SAC/VAL sobre la fuerza generada por el músculo esquelético y la TE en estos animales. Nuestros resultados no mostraron modificaciones en el peso del músculo de las extremidades inferiores gastrocnemio, ni en la fuerza ejercida por las extremidades anteriores de las ratas ZSF1, tras ser tratadas con 68 mg/kg/día/p.o. de SAC/VAL. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Schauer y col. [524], los cuales evaluaron los efectos del SAC/VAL en los músculos tibial anterior, sóleo y extensor largo, y observaron que, aunque el tratamiento con SAC/VAL incrementaba ligeramente la masa del extensor largo de las ratas hembra ZSF1 obesas en comparación con las ratas no obesas, no se observaban modificaciones en la fuerza absoluta y específica ejercida por estos

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

músculos, la cual está reducida en los animales obesos en comparación con las ratas no obesas.

Es importante destacar que la evaluación de la TE de las ratas ZSF1 realizada presenta ciertas limitaciones, debido a la ausencia de valores basales previos al inicio del tratamiento, ya que solo fue posible realizar la prueba de ET a la mitad (18 semanas de edad) y al final del tratamiento (22 semanas de tratamiento); sin embargo, asumiremos que los valores iniciales de los parámetros medidos en los 2 grupos de animales obesos deberían de ser similares antes de iniciar el tratamiento con SAC/VAL.

Como era de esperar, los tests realizados para la evaluación de la TE, mostraron que las ratas ZSF1 obesas presentan valores reducidos de VO_2max, VCO_2max y EE, y que la velocidad alcanzada y la distancia recorrida es muy inferior a la de las ratas no obesas. Tras 8 semanas de tratamiento no se observaron modificaciones en los valores de VO_2max, VCO_2max y EE en el grupo obeso SAC/VAL y, aunque se produjo un ligero incremento en la velocidad y la distancia recorrida por estos animales en comparación con el grupo obeso control, estas modificaciones no fueron estadísticamente significativas. Al evaluar la TE de los animales también se obtuvieron los valores del RQ, el cual, como se explicó previamente en el apartado 3.16. de materiales y métodos, aporta información sobre cuáles son los sustratos energéticos utilizados por el organismo al realizar ejercicio físico [584]. Después de 4 semanas de tratamiento (18 semanas de edad), se observó un incremento significativo del valor del RQ en el grupo obeso control en comparación con el grupo no obeso control y en el grupo obeso SAC/VAL en comparación con ambos grupos control. Si asumimos que los valores basales (antes de la administración del SAC/VAL) del RQ de todas las ratas ZSF1 obesas deberían de ser similares, este incremento significativo del RQ del grupo obeso SAC/VAL podría indicar un mayor uso de la glucosa como sustrato energético, para intentar suplir la elevada demanda energética de las ratas al realizar ejercicio físico. Sin embargo, después de 8 semanas de tratamiento (22 semanas de edad), se produjo una reducción significativa del valor del RQ del grupo obeso SAC/VAL en comparación con el obtenido en el test previo de TE, alcanzando valores similares a los del grupo obeso control, y siendo este ΔRQ significativamente inferior en comparación con el ΔRQ de ambos grupos controles.

Debido a los efectos beneficiosos a nivel cardíaco previamente descritos que observamos al finalizar las 9 semanas de tratamiento con SAC/VAL, una posible explicación para las modificaciones producidas en el RQ de las ratas ZSF1 obesas tratadas podría ser que se ha pasado de un consumo excesivo de glucosa para la obtención de la energía necesaria, al uso de otros sustratos más energéticos como lípidos y/o FA (a pesar de que los valores del RQ todavía son superiores a 1), para una producción más eficiente de ATP durante el ejercicio físico [310,583,584,850].

5.2.7. Efecto del tratamiento con sacubitril/valsartán en el hígado de las ratas ZSF1

El eje cardiaco-hepático juega un papel muy importante en el desarrollo de las ECVs debido a la interacción bidireccional que existe entre ambos órganos [851,852].

USC DE COMPOSTELA

La MASLD (antiguamente NAFLD) es una enfermedad caracterizada por un acúmulo patológico de TG en los hepatocitos y un incremento de los niveles de enzimas hepáticas, de los procesos inflamatorios, de la fibrosis y de la muerte celular, que puede derivar en el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular [349,625,854–857], y que está estrechamente relacionada con el desarrollo y la progresión del ICFEp [672,679]. Nuestros resultados demuestran por primera vez que el tratamiento con SAC/VAL de ratas ZSF1-obesas disminuyó significativamente el peso del hígado/LT y la infiltración de lípidos en los hepatocitos, o esteatosis hepática, en comparación con el grupo obeso control, un efecto que puede ser crucial para prevenir y/o frenar el desarrollo de la MASLD en pacientes obesos con ICFEp. Asimismo, como se explicó previamente en el apartado 4.3,8 de resultados, las alteraciones metabólicas y la esteatosis hepática provocan la disfunción de las mts hepáticas, proceso fundamental en la fisiopatología de la MASLD [858–860]. La evaluación de la función de las mts hepáticas de las ratas ZSF1 demostró, por primera vez, que el tratamiento durante 9 semanas con SAC/VAL daba lugar a una moderada mejoría, aunque no estadísticamente significativa, de la tasa de respiración mitocondrial basal, del estado LEAK y del estado OXPHOS del tejido hepático en comparación al grupo obeso control. Por otra parte, la patología de la MASLD también está estrechamente relacionada con el bazo, un órgano linfático periférico implicado en la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa [861]. En respuesta a los procesos que se producen durante la disfunción hepática, como el incremento de la inflamación, la fibrosis y de la presión de la vena portal, la cual está conectada con la vena esplénica, diferentes estudios han descrito que tiene lugar un aumento del tamaño y el volumen del bazo, incluso en las primeras etapas de la MASLD [861–863]. Tras el tratamiento de las ratas ZSF1-obesas con SAC/VAL, observamos un efecto que no se había descrito previamente, que era la reducción significativa del peso del bazo/LT en comparación con el grupo obeso control, lo que podría tener implicaciones en la mejora de la función hepática.

Un efecto del SAC/VAL en el tejido hepático que ha sido previamente descrito es la posible capacidad de esta combinación de fármacos para reducir los niveles circulantes de las transaminasas ALT y AST en pacientes con ICFEr [864] y en modelos animales de DM y de hipertensión portal [786,865,866]. Sin embargo, el modelo animal empleado en nuestro estudio presenta un daño hepático bastante avanzado por lo que, aunque los efectos beneficiosos del tratamiento con SAC/VAL a nivel hepático, previamente mencionados, deberían reflejarse en una reducción de los niveles séricos de ALT y AST, en esta ocasión el grupo obeso SAC/VAL presentó un incremento significativo los niveles de estas transaminasas, en comparación con el grupo obeso control. Una posible hipótesis que podría explicar este hallazgo es que el aumento de las transaminasas podría estar relacionado con la metabolización y la eliminación hepática del SAC/VAL en animales con el hígado dañado, ya que, como se explicó previamente, el sacubitril es un profármaco que tiene que ser metabolizado por el hígado para obtener su metabolito activo, el LBQ657 [487,488]. Asimismo, el VAL se elimina por aclaramiento hepático, el cual está reducido en pacientes con IC [867,868].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONS

1. The treatment with empagliflozin *in vivo* is able to regulate the levels of fructosamine and glycated albumin, biomarkers for diagnosis and glycemic control in type 2 diabetes mellitus, in the serum of ZDF rats.
2. Empagliflozin induces a strong anti-inflammatory effect in rat visceral fat. The treatment *in vivo* with this drug down-regulates the mRNA expression of cytokines (interleukin-1 beta, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, monocyte-chemotactic protein, and interleukin-10), and M1 and M2 macrophage markers (Cd86 and Cd163) in visceral adipose tissue, while decreasing the levels of interleukin-1β in subcutaneous adipose tissue of ZDF.
3. In our animal model of obesity and type 2 diabetes mellitus, empagliflozin treatment is not able to induce changes in adipocyte hypertrophy in visceral and subcutaneous adipose tissue.
4. Empagliflozin treatment *in vivo* downregulates the gene expression of profibrotic markers in the visceral adipose tissue of ZDF rats.
5. The treatment with empagliflozin *in vivo* is capable to modify the gene expression pattern of the subunits conforming the mitochondrial calcium uniporter complex, the master regulator of mitochondrial calcium uptake, in visceral adipose tissue of ZDF rats.
6. Empagliflozin treatment of ZDF rats regulates in a different manner the lipidomic profiles of both visceral and subcutaneous adipose tissues. Empagliflozin induces significant changes in the composition of diglycerides and fatty acids in visceral adipose tissue, and of glycerophospholipids in subcutaneous adipose tissue of ZDF rats.
7. The treatment with empagliflozin *in vivo* increases the gene expression of lipolytic enzymes while reducing the Cd36 fatty acid transporter expression levels in adipose tissue of ZDF rats.
8. LBQ657 + valsartan treatment *in vitro* does not modify either fatty acid uptake in murine HL-1 cardiomyocyte cell line, or glucose receptor GLUT4 translocation, autophagy or lipolysis in neonatal rat cardiomyocytes.
9. The treatment with sacubitril/valsartan *in vivo* is able to regulate serum biochemical parameters (total cholesterol, sodium, creatinine and transaminases) in obese ZSF1 rats.
10. In our animal model of heart failure with preserved ejection fraction and obesity, the treatment with sacubitril/valsartan ameliorates the respiratory quotient during exercise.
11. The treatment with sacubitril/valsartan *in vivo* reduces heart weight and left ventricle fibrosis and hypertrophy, and ameliorates left ventricle diastolic dysfunction in obese ZSF1 rats.
12. The treatment with sacubitril/valsartan diminishes hepatic steatosis and liver, spleen and perigonadal fat weights in obese ZSF1 rats.
13. In our animal model of heart failure with preserved ejection fraction, the treatment with sacubitril/valsartan induces significant changes in the cardiac

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lipidome, mainly in glycerophospholipids, cholesterol, cholesteryl esters and triglycerides, all of them metabolites tightly involved in the proper functioning of the myocardium.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. BIBLIOGRAFÍA

[1] N. Townsend, D. Kazakiewicz, F. Lucy Wright, A. Timmis, R. Huculeci, A. Torbica, et al., Epidemiology of cardiovascular disease in Europe, Nat Rev Cardiol 19 (2022) 133–143. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00607-3.

[2] F.A. Chapman, J.J. Maguire, D.E. Newby, A.P. Davenport, N. Dhaun, Targeting the apelin system for the treatment of cardiovascular diseases, Cardiovasc Res 119 (2023) 2683–2696. https://doi.org/10.1093/cvr/cvad171.

[3] World Health Organization (WHO), Cardiovascular diseases (CVDs), (2021). https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds) (Acceso el 15 de junio del 2024).

[4] D.P. Leong, P.G. Joseph, M. McKee, S.S. Anand, K.K. Teo, J.-D. Schwalm, et al., Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 2, Circ Res 121 (2017) 695–710. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311849.

[5] L.A. Kaminsky, C. German, M. Imboden, C. Ozemek, J.E. Peterman, P.H. Brubaker, The importance of healthy lifestyle behaviors in the prevention of cardiovascular disease, Prog Cardiovasc Dis 70 (2022) 8–15. https://doi.org/10.1016/j.pcad.2021.12.001.

[6] J. Soppert, M. Lehrke, N. Marx, J. Jankowski, H. Noels, Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting, Adv Drug Deliv Rev 159 (2020) 4–33. https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.019.

[7] A.A. Armoundas, S.M. Narayan, D.K. Arnett, K. Spector-Bagdady, D.A. Bennett, L.A. Celi, P.A. et al., Use of Artificial Intelligence in Improving Outcomes in Heart Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association, Circulation 149 (2024) e1028-e1050. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001201.

[8] J.M. Castellano Vázquez, J.M. Fernández Alvira, V. Fuster, Primordial prevention: paramount in cardiovascular prevention, Rev Esp Cardiol (Engl Ed) 73 (2020) 194–196. https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.09.017.

[9] D.K. Arnett, R.S. Blumenthal, M.A. Albert, A.B. Buroker, Z.D. Goldberger, E.J. Hahn, et al., 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines, Circulation 140 (2019) e596-e646. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678.

[10] K.K. Teo, T. Rafiq, Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries, Can J Cardiol 37 (2021) 733–743. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2021.02.009.

[11] B. V. Reamy, P.M. Williams, D.P. Kuckel, Prevention of Cardiovascular Disease, Prim Care 45 (2018) 25–44. https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.11.003.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[12] S.S. Mahmood, D. Levy, R.S. Vasan, T.J. Wang, The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective, Lancet 383 (2014) 999–1008. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61752-3.

[13] T.R. Dawber, G.F. Meadors, F.E. Moore, Epidemiological Approaches to Heart Disease: The Framingham Study, Am J Public Health Nations Health 41 (1951) 279–286. https://doi.org/10.2105/AJPH.41.3.279.

[14] C. Andersson, M. Nayor, C.W. Tsao, D. Levy, R.S. Vasan, Framingham Heart Study, J Am Coll Cardiol 77 (2021) 2680–2692. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.01.059.

[15] M.J. O'Donnell, S.L. Chin, S. Rangarajan, D. Xavier, L. Liu, H. Zhang, et al., Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study, Lancet 388 (2016) 761–775. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30506-2.

[16] S. Yusuf, S. Hawken, S. Ôunpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, et al., Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study, Lancet 364 (2004) 937–952. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9.

[17] K.E. Joynt Maddox, M.S.V. Elkind, H.J. Aparicio, Y. Commodore-Mensah, S.D. de Ferranti, W.N. Dowd, et al., Forecasting the Burden of Cardiovascular Disease and Stroke in the United States Through 2050—Prevalence of Risk Factors and Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association, Circulation 150 (2024) e65-e88. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001256.

[18] L. Ciumărnean, M.V. Milaciu, V. Negrean, O.H. Orășan, S.C. Vesa, O. Sălăgean, et al., Cardiovascular Risk Factors and Physical Activity for the Prevention of Cardiovascular Diseases in the Elderly, Int J Environ Res Public Health 19 (2021) 207. https://doi.org/10.3390/ijerph19010207.

[19] N. Sattar, I.J. Neeland, D.K. McGuire, Obesity and Cardiovascular Disease: A New Dawn, Circulation 149 (2024) 1621–1623. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.123.065485.

[20] A. Preda, F. Carbone, A. Tirandi, F. Montecucco, L. Liberale, Obesity phenotypes and cardiovascular risk: From pathophysiology to clinical management, Rev Endocr Metab Disord 24 (2023) 901–919. https://doi.org/10.1007/s11154-023-09813-5.

[21] S. Feijóo-Bandín, A. Aragón-Herrera, S. Moraña-Fernández, L. Anido-Varela, E. Tarazón, E. Roselló-Lletí, et al., Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases, Int J Mol Sci 21 (2020) 7711. https://doi.org/10.3390/ijms21207711.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[22] P. Joseph, D. Leong, M. McKee, S.S. Anand, J.-D. Schwalm, K. Teo, et al., Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1, Circ Res 121 (2017) 677–694. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.308903.

[23] A. Elagizi, S. Kachur, S. Carbone, C.J. Lavie, S.N. Blair, A Review of Obesity, Physical Activity, and Cardiovascular Disease, Curr Obes Rep 9 (2020) 571–581. https://doi.org/10.1007/s13679-020-00403-z.

[24] S. Misra, C. Ke, S. Srinivasan, A. Goyal, M.J. Nyriyenda, J.C. Florez, et al., Current insights and emerging trends in early-onset type 2 diabetes, Lancet Diabetes Endocrinol 11 (2023) 768–782. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(23)00225-5.

[25] J.-S. Yun, S.-H. Ko, Current trends in epidemiology of cardiovascular disease and cardiovascular risk management in type 2 diabetes, Metabolism 123 (2021) 154838. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154838.

[26] Y. Fan, Z. Yan, T. Li, A. Li, X. Fan, Z. Qi, et al., Primordial Drivers of Diabetes Heart Disease: Comprehensive Insights into Insulin Resistance, Diabetes Metab J 48 (2024) 19–36. https://doi.org/10.4093/dmj.2023.0110.

[27] S. Martín-Peláez, M. Fito, O. Castaner, Mediterranean Diet Effects on Type 2 Diabetes Prevention, Disease Progression, and Related Mechanisms. A Review, Nutrients 12 (2020) 2236. https://doi.org/10.3390/nu12082236.

[28] R. Hariharan, E.N. Odjidja, D. Scott, N. Shivappa, J.R. Hébert, A. Hodge, et al., The dietary inflammatory index, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular risk factors and diseases, Obesity Reviews 23 (2022). https://doi.org/10.1111/obr.13349.

[29] A. Rosengren, P. Dikaiou, Cardiovascular outcomes in type 1 and type 2 diabetes, Diabetologia 66 (2023) 425–437. https://doi.org/10.1007/s00125-022-05857-5.

[30] S.S. Martin, A.W. Aday, Z.I. Almarzooq, C.A.M. Anderson, P. Arora, C.L. Avery, et al., 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association, Circulation 149 (2024). https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001209.

[31] M. Rabiee Rad, G. Ghasempour Dabaghi, B. Darouei, R. Amani-Beni, The association of atherogenic index of plasma with cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis, Cardiovasc Diabetol 23 (2024) 119. https://doi.org/10.1186/s12933-024-02198-y.

[32] M.J. Chapman, J.L. Zamorano, K.G. Parhofer, Reducing residual cardiovascular risk in Europe: Therapeutic implications of European medicines agency approval of icosapent ethyl/eicosapentaenoic acid, Pharmacol Ther 237 (2022) 108172. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108172.

[33] A. Pirillo, M. Casula, E. Olmastroni, G.D. Norata, A.L. Catapano, Global epidemiology of dyslipidaemias, Nat Rev Cardiol 18 (2021) 689–700. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00541-4.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[34] F.H. Messerli, S.F. Rimoldi, S. Bangalore, The Transition From Hypertension to Heart Failure, JACC Heart Fail 5 (2017) 543–551. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.04.012.

[35] R.M. Carey, A.E. Moran, P.K. Whelton, Treatment of Hypertension, JAMA 328 (2022) 1849. https://doi.org/10.1001/jama.2022.19590.

[36] American Heart Association (AHA), Understanding Blood Pressure Readings, (2024). https://www.heart.org/en/health-topics/high-blood-pressure/understanding-blood-pressure-readings (Acceso el 23 de agosto del 2024).

[37] F. Ferrari, R.F. Villa, Brain bioenergetics in chronic hypertension: Risk factor for acute ischemic stroke, Biochem Pharmacol 205 (2022) 115260. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115260.

[38] X. Sun, M. Zhou, G. Wen, Y. Huang, J. Wu, L. Peng, et al., Paroxetine Attenuates Cardiac Hypertrophy Via Blocking GRK2 and ADRB1 Interaction in Hypertension, J Am Heart Assoc 10 (2021). https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016364.

[39] V.J. Dzau, C.P. Hodgkinson, Precision Hypertension, Hypertension 81 (2024) 702–708. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21710.

[40] C.J. Lavie, C. Ozemek, S. Carbone, P.T. Katzmarzyk, S.N. Blair, Sedentary Behavior, Exercise, and Cardiovascular Health, Circ Res 124 (2019) 799–815. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312669.

[41] A. Elagizi, S. Kachur, S. Carbone, C.J. Lavie, S.N. Blair, A Review of Obesity, Physical Activity, and Cardiovascular Disease, Curr Obes Rep 9 (2020) 571–581. https://doi.org/10.1007/s13679-020-00403-z.

[42] A.S. Perry, E.E. Dooley, H. Master, N.L. Spartano, E.L. Brittain, K. Pettee Gabriel, Physical Activity Over the Lifecourse and Cardiovascular Disease, Circ Res 132 (2023) 1725–1740. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.322121.

[43] Z. Chen, N. Khandpur, C. Desjardins, L. Wang, C.A. Monteiro, S.L. Rossato, et al., Ultra-Processed Food Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: Three Large Prospective U.S. Cohort Studies, Diabetes Care 46 (2023) 1335–1344. https://doi.org/10.2337/dc22-1993.

[44] A. Herforth, M. Arimond, C. Álvarez-Sánchez, J. Coates, K. Christianson, E. Muehlhoff, A Global Review of Food-Based Dietary Guidelines, Adv Nutr 10 (2019) 590–605. https://doi.org/10.1093/advances/nmy130.

[45] M. Calvo-Malvar, A.J. Benítez-Estévez, J. Sánchez-Castro, R. Leis, F. Gude, Effects of a Community-Based Behavioral Intervention with a Traditional Atlantic Diet on Cardiometabolic Risk Markers: A Cluster Randomized Controlled Trial ("The GALIAT Study"), Nutrients 13 (2021) 1211. https://doi.org/10.3390/nu13041211.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[46] K.J. Biddinger, C.A. Emdin, M.E. Haas, M. Wang, G. Hindy, P.T. Ellinor, et al., Association of Habitual Alcohol Intake With Risk of Cardiovascular Disease, JAMA Netw Open 5 (2022) e223849. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.3849.

[47] A.G. Hoek, S. van Oort, K.J. Mukamal, J.W.J. Beulens, Alcohol Consumption and Cardiovascular Disease Risk: Placing New Data in Context, Curr Atheroscler Rep 24 (2022) 51–59. https://doi.org/10.1007/s11883-022-00992-1.

[48] D. Martínez-Urbistondo, N. Perez-Diaz-del-Campo, M.F. Landecho, J.A. Martínez, Alcohol Drinking Impacts on Adiposity and Steatotic Liver Disease: Concurrent Effects on Metabolic Pathways and Cardiovascular Risks, Curr Obes Rep (2024). https://doi.org/10.1007/s13679-024-00560-5.

[49] M. Cecchini, T. Filippini, P.K. Whelton, I. Iamandii, S. Di Federico, G. Boriani, et al., Alcohol Intake and Risk of Hypertension: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Nonexperimental Cohort Studies, Hypertension (2024). https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.124.22703.

[50] N.L. Benowitz, E. Liakoni, Tobacco use disorder and cardiovascular health, Addiction 117 (2022) 1128–1138. https://doi.org/10.1111/add.15703.

[51] S.S. Martin, A.W. Aday, Z.I. Almarzooq, C.A.M. Anderson, P. Arora, C.L. Avery, et al., 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association, Circulation 149 (2024). https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001209.

[52] N.S. Wilcox, U. Amit, J.B. Reibel, E. Berlin, K. Howell, B. Ky, Cardiovascular disease and cancer: shared risk factors and mechanisms, Nat Rev Cardiol (2024). https://doi.org/10.1038/s41569-024-01017-x.

[53] World Health Organization (WHO), WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000–2025, (2021). https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/348537/9789240039322-eng.pdf?sequence=1 (Acceso el 28 de junio del 2024).

[54] G. Reaven, P.S. Tsao, Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, J Am Coll Cardiol 41 (2003) 1044–1047. https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02982-0.

[55] G. Gallucci, A. Tartarone, R. Lerose, A.V. Lalinga, A.M. Capobianco, Cardiovascular risk of smoking and benefits of smoking cessation, J Thorac Dis 12 (2020) 3866–3876. https://doi.org/10.21037/jtd.2020.02.47.

[56] M. Ishida, C. Sakai, Y. Kobayashi, T. Ishida, Cigarette Smoking and Atherosclerotic Cardiovascular Disease, J Atheroscler Thromb 31 (2024) RV22015. https://doi.org/10.5551/jat.RV22015.

[57] H. Zhang, R. Cherian, K. Jin, Systemic milieu and age-related deterioration, Geroscience 41 (2019) 275–284. https://doi.org/10.1007/s11357-019-00075-1.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[58] S. Jaiswal, P. Libby, Clonal haematopoiesis: connecting ageing and inflammation in cardiovascular disease, Nat Rev Cardiol 17 (2020) 137–144. https://doi.org/10.1038/s41569-019-0247-5.

[59] A.J. Donato, D.R. Machin, L.A. Lesniewski, Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease, Circ Res 123 (2018) 825–848. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312563.

[60] M.R. Hamczyk, R.M. Nevado, A. Barettino, V. Fuster, V. Andrés, Biological Versus Chronological Aging, J Am Coll Cardiol 75 (2020) 919–930. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.11.062.

[61] V. Regitz-Zagrosek, C. Gebhard, Gender medicine: effects of sex and gender on cardiovascular disease manifestation and outcomes, Nat Rev Cardiol 20 (2023) 236–247. https://doi.org/10.1038/s41569-022-00797-4.

[62] M.L. Lindsey, C.W. Usselman, C.M. Ripplinger, J.R. Carter, K.Y. DeLeon-Pennell, Sex as a biological variable for cardiovascular physiology, Am J Physiol Heart Circ Physiol 326 (2024) H459–H469. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00727.2023.

[63] J.Y. Chyou, H. Qin, J. Butler, A.A. Voors, C.S.P. Lam, Sex-related similarities and differences in responses to heart failure therapies, Nat Rev Cardiol 21 (2024) 498–516. https://doi.org/10.1038/s41569-024-00996-1.

[64] A.K. McClain, P.P. Monteleone, J. Zoldan, Sex in cardiovascular disease: Why this biological variable should be considered in in vitro models, Sci Adv 10 (2024). https://doi.org/10.1126/sciadv.adn3510.

[65] S.K. Sidhu, J.O. Aleman, S.P. Heffron, Obesity Duration and Cardiometabolic Disease, Arterioscler Thromb Vasc Biol 43 (2023) 1764–1774. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319023.

[66] A. Yasin, M. Nguyen, A. Sidhu, P. Majety, J. Spitz, A. Asgharpour, et al., Liver and cardiovascular disease outcomes in metabolic syndrome and diabetic populations: Bi-directional opportunities to multiply preventive strategies, Diabetes Res Clin Pract 211 (2024) 111650. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2024.111650.

[67] P. Campbell, F.H. Rutten, M.M. Lee, N.M. Hawkins, M.C. Petrie, Heart failure with preserved ejection fraction: everything the clinician needs to know, Lancet 403 (2024) 1083–1092. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02756-3.

[68] N.W.S. Chew, X.H. Pan, B. Chong, C. Chandramouli, M. Muthiah, C.S.P. Lam, Type 2 diabetes mellitus and cardiometabolic outcomes in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease population, Diabetes Res Clin Pract 211 (2024) 111652. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2024.111652.

[69] J.Y. Zhao, L.J. Zhou, K. Le Ma, R. Hao, M. Li, MHO or MUO? White adipose tissue remodeling, Obes Rev 25 (2024). https://doi.org/10.1111/obr.13691.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[70] World Health Organization (WHO), Obesity and overweight, (2024). https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=Obesity%20is%20a%20chronic%20complex,the%20risk%20of%20certain%20cancers. (Acceso el 15 junio del 2024).

[71] X. Zhang, S. Ha, H.C.-H. Lau, J. Yu, Excess body weight: Novel insights into its roles in obesity comorbidities, Semin Cancer Biol 92 (2023) 16–27. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.03.008.

[72] M. Blüher, Obesity: global epidemiology and pathogenesis, Nat Rev Endocrinol 15 (2019) 288–298. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8.

[73] G. Targher, C.D. Byrne, H. Tilg, MASLD: a systemic metabolic disorder with cardiovascular and malignant complications, Gut (2024) gutjnl-2023-330595. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330595.

[74] Q. Zhao, Y. Deng, Comparison of mortality outcomes in individuals with MASLD and/or MAFLD, J Hepatol 80 (2024) e62–e64. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.08.003.

[75] M.J. Müller, C. Geisler, Defining obesity as a disease, Eur J Clin Nutr 71 (2017) 1256–1258. https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.155.

[76] A.W. Tutor, C.J. Lavie, S. Kachur, R. V. Milani, H.O. Ventura, Updates on obesity and the obesity paradox in cardiovascular diseases, Prog Cardiovasc Dis 78 (2023) 2–10. https://doi.org/10.1016/j.pcad.2022.11.013.

[77] M.-E. Piché, A. Tchernof, J.-P. Després, Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases, Circ Res 126 (2020) 1477–1500. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101.

[78] V.S. Balakrishnan, Europe's obesity burden on the rise: WHO report, Lancet Diabetes Endocrinol 10 (2022) 488. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00165-6.

[79] World Health Organization (WHO), WHO European Regional Obesity Report 2022, (2022). https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289057738l. (Acceso el 16 de junio del 2024).

[80] L. Feijoo, J. Rey-Brandariz, C. Guerra-Tort, C. Candal-Pedreira, M.I. Santiago-Pérez, A. Ruano-Ravina, et al., Prevalence of obesity in Spain and its autonomous communities, 1987-2020, Rev Esp Cardiol (Engl Ed) (2024). https://doi.org/10.1016/j.rec.2023.12.018.

[81] K. Nimptsch, S. Konigorski, T. Pischon, Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine, Metabolism 92 (2019) 61–70. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.006.

[82] Y.C. Chooi, C. Ding, F. Magkos, The epidemiology of obesity, Metabolism 92 (2019) 6–10. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[83] Sociedad Española de Obesidad (SEEDO), IMC. https://www.seedo.es/index.php/herramientas-seedo/calculo-de-imc (Acceso el 29 del junio del 2024).

[84] National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Food and Nutrition Board; Roundtable on Obesity Solutions, Translating Knowledge of Foundational Drivers of Obesity into Practice: Proceedings of a Workshop Series, The Science, Strengths, and Limitations of Body Mass Index, Chapter 10, 2023, ISBN-13: 978-0-309-70203-4, https://doi.org/ 10.17226/26942

[85] M.G. Haufs, Y.F. Zöllner, Waist–Hip Ratio More Appropriate Than Body Mass Index, Dtsch Arztebl Int (2020). https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0659a.

[86] C. Kim, S. Youm, Development of an Obesity Information Diagnosis Model Reflecting Body Type Information Using 3D Body Information Values, Sensors 22 (2022) 7808. https://doi.org/10.3390/s22207808.

[87] A. Gilani, L. Stoll, E.A. Homan, J.C. Lo, Adipose Signals Regulating Distal Organ Health and Disease, Diabetes 73 (2024) 169–177. https://doi.org/10.2337/dbi23-0005.

[88] A. Sakers, M.K. De Siqueira, P. Seale, C.J. Villanueva, Adipose-tissue plasticity in health and disease, Cell 185 (2022) 419–446. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016.

[89] P. Cohen, S. Kajimura, The cellular and functional complexity of thermogenic fat, Nat Rev Mol Cell Biol 22 (2021) 393–409. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00350-0.

[90] E.K. Oikonomou, C. Antoniades, The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease, Nat Rev Cardiol 16 (2019) 83–99. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0097-6.

[91] C.M. Perdomo, I. Avilés-Olmos, D. Dicker, G. Frühbeck, Towards an adiposity-related disease framework for the diagnosis and management of obesities, Rev Endocr Metab Disord 24 (2023) 795–807. https://doi.org/10.1007/s11154-023-09797-2.

[92] A. Santoro, T.E. McGraw, B.B. Kahn, Insulin action in adipocytes, adipose remodeling, and systemic effects, Cell Metab 33 (2021) 748–757. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.019.

[93] A. Vegiopoulos, M. Rohm, S. Herzig, Adipose tissue: between the extremes, EMBO J 36 (2017) 1999–2017. https://doi.org/10.15252/embj.201696206.

[94] B. Niemann, S. Haufs-Brusberg, L. Puetz, M. Feickert, M.Y. Jaeckstein, A. Hoffmann, et al., Apoptotic brown adipocytes enhance energy expenditure via extracellular inosine, Nature 609 (2022) 361–368. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05041-0.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[95] K. Ziqubu, P. V. Dludla, S.E. Mabhida, B.U. Jack, S. Keipert, M. Jastroch, et al., Brown adipose tissue-derived metabolites and their role in regulating metabolism, Metabolism 150 (2024) 155709. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155709.

[96] B.M. Meister, S.-G. Hong, J. Shin, M. Rath, J. Sayoc, J.-Y. Park, Healthy versus Unhealthy Adipose Tissue Expansion: the Role of Exercise, J Obes Metab Syndr 31 (2022) 37–50. https://doi.org/10.7570/jomes21096.

[97] F.T. Yang, K.I. Stanford, Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review), Curr Obes Rep 11 (2022) 1–9. https://doi.org/10.1007/s13679-021-00465-7.

[98] G. Marcelin, E.L. Gautier, K. Clément, Adipose Tissue Fibrosis in Obesity: Etiology and Challenges, Annu Rev Physiol 84 (2022) 135–155. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060721-092930.

[99] L. Vishvanath, R.K. Gupta, Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity, J Clin Invest 129 (2019) 4022–4031. https://doi.org/10.1172/JCI129191.

[100] G. Marcelin, A.L.M. Silveira, L.B. Martins, A.V.M. Ferreira, K. Clément, Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis, J Clin Invest 129 (2019) 4032–4040. https://doi.org/10.1172/JCI129192.

[101] Y. Heo, H. Kim, J. Lim, S.S. Choi, Adipocyte differentiation between obese and lean conditions depends on changes in miRNA expression, Sci Rep 12 (2022) 11543. https://doi.org/10.1038/s41598-022-15331-2.

[102] Q. Luong, J. Huang, K.Y. Lee, Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity, Biology (Basel) 8 (2019) 23. https://doi.org/10.3390/biology8020023.

[103] J. Herold, J. Kalucka, Angiogenesis in Adipose Tissue: The Interplay Between Adipose and Endothelial Cells, Front Physiol 11 (2021). https://doi.org/10.3389/fphys.2020.624903.

[104] H. Kolb, Obese visceral fat tissue inflammation: from protective to detrimental?, BMC Med 20 (2022) 494. https://doi.org/10.1186/s12916-022-02672-y.

[105] S. Corvera, J. Solivan-Rivera, Z. Yang Loureiro, Angiogenesis in adipose tissue and obesity, Angiogenesis 25 (2022) 439–453. https://doi.org/10.1007/s10456-022-09848-3.

[106] P. Nijhawans, T. Behl, S. Bhardwaj, Angiogenesis in obesity, Biomed Pharmacother 126 (2020) 110103. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110103.

[107] Z. Michailidou, Fundamental roles for hypoxia signalling in adipose tissue metabolism and inflammation in obesity, Curr Opin Physiol 12 (2019) 39–43. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.09.005.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[108] M. Koenen, M.A. Hill, P. Cohen, J.R. Sowers, Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction, Circ Res 128 (2021) 951–968. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318093.

[109] R.K. Zwick, C.F. Guerrero-Juarez, V. Horsley, M. V. Plikus, Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue, Cell Metab 27 (2018) 68–83. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002.

[110] G. Iacobellis, Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology, Nat Rev Cardiol 19 (2022) 593–606. https://doi.org/10.1038/s41569-022-00679-9.

[111] C. Iacobini, G. Pugliese, C. Blasetti Fantauzzi, M. Federici, S. Menini, Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity, Metabolism 92 (2019) 51–60. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009.

[112] H. Chen, X. Yan, A. Sun, L. Zhang, J. Zhang, Y. Yan, Adipose extracellular matrix deposition is an indicator of obesity and metabolic disorders, J Nutr Biochem 111 (2023) 109159. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109159.

[113] V. Pellegrinelli, E. Figueroa-Juárez, I. Samuelson, M. U-Din, S. Rodriguez-Fdez, S. Virtue, et al., Defective extracellular matrix remodeling in brown adipose tissue is associated with fibro-inflammation and reduced diet-induced thermogenesis, Cell Rep 42 (2023) 112640. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112640.

[114] C. Auger, S. Kajimura, Adipose Tissue Remodeling in Pathophysiology, Annu Rev Pathol 18 (2023) 71–93. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042220-023633.

[115] K. Sun, X. Li, P.E. Scherer, Extracellular Matrix (ECM) and Fibrosis in Adipose Tissue: Overview and Perspectives, in: Compr Physiol, Wiley, 2023: pp. 4387–4407. https://doi.org/10.1002/cphy.c220020.

[116] X. Li, Y. Ren, K. Chang, W. Wu, H.R. Griffiths, S. Lu, et al., Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases, Front Immunol 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1153915.

[117] A.D. Attie, P.E. Scherer, Adipocyte metabolism and obesity, J Lipid Res 50 (2009) S395–S399. https://doi.org/10.1194/jlr.R800057-JLR200.

[118] T. Chavakis, V.I. Alexaki, A.W. Ferrante, Macrophage function in adipose tissue homeostasis and metabolic inflammation, Nat Immunol 24 (2023) 757–766. https://doi.org/10.1038/s41590-023-01479-0.

[119] H. Wu, C.M. Ballantyne, Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity, Circ Res 126 (2020) 1549–1564. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315896.

[120] Y. Ren, H. Zhao, C. Yin, X. Lan, L. Wu, X. Du, et al., Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation, Front Endocrinol (Lausanne) 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873699.

[121] S. Xu, F. Lu, J. Gao, Y. Yuan, Inflammation-mediated metabolic regulation in adipose tissue, Obes Rev 25 (2024). https://doi.org/10.1111/obr.13724.

[122] B. Ahmed, R. Sultana, M.W. Greene, Adipose tissue and insulin resistance in obese, Biomed & Pharmacother 137 (2021) 111315. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315.

[123] Y. Zhou, H. Li, N. Xia, The Interplay Between Adipose Tissue and Vasculature: Role of Oxidative Stress in Obesity, Front Cardiovasc Med 8 (2021). https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.650214.

[124] P.M. Masschelin, A.R. Cox, N. Chernis, S.M. Hartig, The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance, Front Physiol 10 (2020). https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01638.

[125] S.-K. Shin, H.-W. Cho, S.-E. Song, S.-S. Im, J.-H. Bae, D.-K. Song, Oxidative stress resulting from the removal of endogenous catalase induces obesity by promoting hyperplasia and hypertrophy of white adipocytes, Redox Biol 37 (2020) 101749. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101749.

[126] G.F. Grabner, H. Xie, M. Schweiger, R. Zechner, Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores, Nat Metab 3 (2021) 1445–1465. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00493-6.

[127] S.-M. An, S.-H. Cho, J.C. Yoon, Adipose Tissue and Metabolic Health, Diabetes Metab J 47 (2023) 595–611. https://doi.org/10.4093/dmj.2023.0011.

[128] Y. Tong, S. Xu, L. Huang, C. Chen, Obesity and insulin resistance: Pathophysiology and treatment, Drug Discov Today 27 (2022) 822–830. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.11.001.

[129] World Health Organization (WHO), Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020, (2013). https://www.who.int/publications/i/item/9789241506236, (Acceso el 16 de junio del 2024).

[130] G.A. Bray, G. Frühbeck, D.H. Ryan, J.P.H. Wilding, Management of obesity, Lancet 387 (2016) 1947–1956. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00271-3.

[131] D. Eglseer, M. Traxler, S. Embacher, L. Reiter, J.D. Schoufour, P.J.M. Weijs, et al., Nutrition and Exercise Interventions to Improve Body Composition for Persons with Overweight or Obesity Near Retirement Age: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, Adv Nutr 14 (2023) 516–538. https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.04.001.

[132] M. Davies, L. Færch, O.K. Jeppesen, A. Pakseresht, S.D. Pedersen, L. Perreault, et al., Semaglutide 2·4 mg once a week in adults with overweight or obesity, and type 2 diabetes (STEP 2): a randomised, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, phase 3 trial, Lancet 397 (2021) 971–984. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00213-0.

[133] Novo Nordisk, Novo Nordisk receives FDA approval for Saxenda® for the treatment of obesity, (2014). https://www.novonordisk.com/content/nncorp/global/en/news-and-media/news-and-ir-materials/news-details.html?id=1430 (Acceso el 15 de junio del 2024).

[134] Food and Drug Administration (FDA), FDA Approves New Drug Treatment for Chronic Weight Management, First Since 2014, (2021). https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-chronic-weight-management-first-2014 (Acceso el 15 de junio del 2024).

[135] S.K. Billes, P. Sinnayah, M.A. Cowley, Naltrexone/bupropion for obesity: An investigational combination pharmacotherapy for weight loss, Pharmacol Res 84 (2014) 1–11. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.04.004.

[136] K.F. Ali, A.P. Shukla, L.J. Aronne, Bupropion-SR plus naltrexone-SR for the treatment of mild-to-moderate obesity, Expert Rev Clin Pharmacol 9 (2016) 27–34. https://doi.org/10.1586/17512433.2016.1100072.

[137] P. Sumithran, J. Proietto, Benefit-Risk Assessment of Orlistat in the Treatment of Obesity, Drug Saf 37 (2014) 597–608. https://doi.org/10.1007/s40264-014-0210-7.

[138] D.H. Ryan, Drugs for Treating Obesity, Handb Exp Pharmacol 274 (2022) 387–414. https://doi.org/10.1007/164_2021_560.

[139] P. Sumithran, J. Proietto, Benefit-Risk Assessment of Orlistat in the Treatment of Obesity, Drug Saf 37 (2014) 597–608. https://doi.org/10.1007/s40264-014-0210-7.

[140] B.M. Wolfe, E. Kvach, R.H. Eckel, Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery, Circ Res 118 (2016) 1844–1855. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307591.

[141] T. Liu, X. Zou, R. Ruze, Q. Xu, Bariatric Surgery: Targeting pancreatic β cells to treat type II diabetes, Front Endocrinol (Lausanne) 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1031610.

[142] X. Zhao, X. An, C. Yang, W. Sun, H. Ji, F. Lian, The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease, Front Endocrinol (Lausanne) 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1149239.

[143] World Health Organization (WHO), Diabetes, https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1 (Acceso el 17 de junio del 2024).

[144] R. Goyal, M. Singhal, I. Jialal, StatPearls. Type 2 Diabetes, (2023). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/ (Acceso el 17 de junio del 2024).

[145] C. Ling, T. Rönn, Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes, Cell Metab 29 (2019) 1028–1044. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[146] L. Liu, J. Zhang, Y. Cheng, M. Zhu, Z. Xiao, G. Ruan, et al., Gut microbiota: A new target for T2DM prevention and treatment, Front Endocrinol (Lausanne) 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fendo.2022.958218.

[147] K. Neikirk, K. Kabugi, M. Mungai, B. Kula, N. Smith, A.O. Hinton, Ethnicity-related differences in mitochondrial regulation by insulin stimulation in diabetes, J Cell Physiol (2024). https://doi.org/10.1002/jcp.31317.

[148] A. Santoro, B.B. Kahn, Adipocyte Regulation of Insulin Sensitivity and the Risk of Type 2 Diabetes, N Engl J Med 388 (2023) 2071–2085. https://doi.org/10.1056/NEJMra2216691.

[149] H. Gudjonsdottir, P. Tynelius, N.S. Stattin, D.Y. Méndez, A. Lager, B. Brynedal, Undiagnosed type 2 diabetes is common – intensified screening of established risk groups is imperative in Sweden: the SDPP cohort, BMC Med 22 (2024) 168. https://doi.org/10.1186/s12916-024-03393-0.

[150] American Diabetes Association Professional Practice Committee, Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022, Diabetes Care 45 (2022) S17–S38. https://doi.org/10.2337/dc22-S002.

[151] International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, (2021). https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf, (Acceso el 17 de junio del 2024).

[152] R. Gomis, S. Artola, P. Conthe, J. Vidal, R. Casamor, B. Font, Prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en pacientes ambulatorios con sobrepeso u obesidad en España. Estudio OBEDIA, Med Clin (Barc) 142 (2014) 485–492. https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.03.013.

[153] American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 33 (2010) S62–S69. https://doi.org/10.2337/dc10-S062.

[154] N. Peer, Y. Balakrishna, S. Durao, Screening for type 2 diabetes mellitus, Cochrane Database Syst Rev 5 (2020). https://doi.org/10.1002/14651858.CD005266.pub2.

[155] American Heart Association, Symptoms, Diagnosis and Monitoring of Diabetes, (2024). https://www.heart.org/en/health-topics/diabetes/symptoms-diagnosis--monitoring-of-diabetes (Acceso el 18 de junio del 2024).

[156] International Diabetes Federation, More than two in three people with diabetes already have complications at diagnosis, (2023). https://idf.org/news/more-than-two-in-three-people-with-diabetes-already-have-complications-at-diagnosis/ (Acceso el 18 del junio del 2024).

[157] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Diabetes Tests & Diagnosis, (2022). https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/tests-diagnosis (Acceso el 18 de junio del 2024).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[158] J.E. Campbell, C.B. Newgard, Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion, Nat Rev Mol Cell Biol 22 (2021) 142–158. https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7.

[159] P. Rorsman, F.M. Ashcroft, Pancreatic β-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men, Physiol Rev 98 (2018) 117–214. https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017.

[160] M. Li, X. Chi, Y. Wang, S. Setrerrahmane, W. Xie, H. Xu, Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy, Signal Transduct Target Ther 7 (2022) 216. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0.

[161] T. Hoeg-Jensen, Review: Glucose-sensitive insulin, Mol Metab 46 (2021) 101107. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101107.

[162] S.-H. Lee, S.-Y. Park, C.S. Choi, Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies, Diabetes Metab J 46 (2022) 15–37. https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280.

[163] G.D. Lopaschuk, Q.G. Karwi, R. Tian, A.R. Wende, E.D. Abel, Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure, Circ Res 128 (2021) 1487–1513. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318241.

[164] B. Yan, Y. Gong, W. Meng, H. Sun, W. Li, K. Ding, et al., Cordycepin protects islet β-cells against glucotoxicity and lipotoxicity via modulating related proteins of ROS/JNK signaling pathway, BiomedPharmacother 163 (2023) 114776. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114776.

[165] D.L. Eizirik, L. Pasquali, M. Cnop, Pancreatic β-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure, Nat Rev Endocrinol 16 (2020) 349–362. https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7.

[166] W. Ying, W. Fu, Y.S. Lee, J.M. Olefsky, The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β-cell abnormalities, Nat Rev Endocrinol 16 (2020) 81–90. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0286-3.

[167] M. Böni-Schnetzler, D.T. Meier, Islet inflammation in type 2 diabetes, Semin Immunopathol 41 (2019) 501–513. https://doi.org/10.1007/s00281-019-00745-4.

[168] T. V. Rohm, D.T. Meier, J.M. Olefsky, M.Y. Donath, Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders, Immunity 55 (2022) 31–55. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.013.

[169] M.C. Petersen, D.F. Vatner, G.I. Shulman, Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease, Nat Rev Endocrinol 13 (2017) 572–587. https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80.

[170] D. Santoleri, P.M. Titchenell, Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance, Cell Mol Gastroenterol Hepatol 7 (2019) 447–456. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.016.

[171] M.C. Petersen, G.I. Shulman, Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance, Physiol Rev 98 (2018) 2133–2223. https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017.

[172] T. Sasako, T. Yamauchi, K. Ueki, Intensified Multifactorial Intervention in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, Diabetes Metab J 47 (2023) 185–197. https://doi.org/10.4093/dmj.2022.0325.

[173] A. Veelen, E. Erazo-Tapia, J. Oscarsson, P. Schrauwen, Type 2 diabetes subgroups and potential medication strategies in relation to effects on insulin resistance and beta-cell function: A step toward personalised diabetes treatment?, Mol Metab 46 (2021) 101158. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101158.

[174] B. Xu, S. Li, B. Kang, J. Zhou, The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management, Cardiovasc Diabetol 21 (2022) 83. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01512-w.

[175] A. DeMarsilis, N. Reddy, C. Boutari, A. Filippaios, E. Sternthal, N. Katsiki, et al., Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update and future directions, Metabolism 137 (2022) 155332. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155332.

[176] C.-X. Ma, X.-N. Ma, C.-H. Guan, Y.-D. Li, D. Mauricio, S.-B. Fu, Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: progress toward personalized management, Cardiovasc Diabetol 21 (2022) 74. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01516-6.

[177] C. Mathieu, P.-J. Martens, R. Vangoitsenhoven, One hundred years of insulin therapy, Nat Rev Endocrinol 17 (2021) 715–725. https://doi.org/10.1038/s41574-021-00542-w.

[178] S.G. Swinnen, J.B. Hoekstra, J.H. DeVries, Insulin Therapy for Type 2 Diabetes, Diabetes Care 32 (2009) S253–S259. https://doi.org/10.2337/dc09-S318.

[179] G. Freckmann, S. Buck, D. Waldenmaier, B. Kulzer, O. Schnell, U. Gelchsheimer, et al., Insulin Pump Therapy for Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence, Current Barriers, and New Technologies, J Diabetes Sci Technol 15 (2021) 901–915. https://doi.org/10.1177/1932296820928100.

[180] O. Grytsai, I. Myrgorodska, S. Rocchi, C. Ronco, R. Benhida, Biguanides drugs: Past success stories and promising future for drug discovery, Eur J Med Chem 224 (2021) 113726. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113726.

[181] D. Kathuria, A.D. Raul, P. Wanjari, P. V. Bharatam, Biguanides: Species with versatile therapeutic applications, Eur J Med Chem 219 (2021) 113378. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113378.

[182] S. Padhi, A.K. Nayak, A. Behera, Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics, Biomed Pharmacother 131 (2020) 110708. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[183] M. Foretz, B. Guigas, B. Viollet, Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential, Nat Rev Endocrinol 19 (2023) 460–476. https://doi.org/10.1038/s41574-023-00833-4.

[184] T.E. LaMoia, G.I. Shulman, Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action, Endocr Rev 42 (2021) 77–96. https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023.

[185] J. Flory, K. Lipska, Metformin in 2019, JAMA 321 (2019) 1926. https://doi.org/10.1001/jama.2019.3805.

[186] E. Lontchi-Yimagou, E. Sobngwi, T.E. Matsha, A.P. Kengne, Diabetes Mellitus and Inflammation, Curr Diab Rep 13 (2013) 435–444. https://doi.org/10.1007/s11892-013-0375-y.

[187] A. Artasensi, A. Pedretti, G. Vistoli, L. Fumagalli, Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs, Molecules 25 (2020) 1987. https://doi.org/10.3390/molecules25081987.

[188] K.C. Sourris, Y. Ding, S.S. Maxwell, A. Al-sharea, P. Kantharidis, M. Mohan, et al., Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modifies the extent of diabetic kidney disease through dampening the receptor for advanced glycation end products–induced inflammation, Kidney Int 105 (2024) 132–149. https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.09.029.

[189] E. Brown, H.J.L. Heerspink, D.J. Cuthbertson, J.P.H. Wilding, SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists: established and emerging indications, Lancet 398 (2021) 262–276. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00536-5.

[190] M.R. Pedrosa, D.R. Franco, H.W. Gieremek, C.M. Vidal, F. Bronzeri, A. de Cassia Rocha, et al., GLP-1 Agonist to Treat Obesity and Prevent Cardiovascular Disease: What Have We Achieved so Far?, Curr Atheroscler Rep 24 (2022) 867–884. https://doi.org/10.1007/s11883-022-01062-2.

[191] H. Yao, A. Zhang, D. Li, Y. Wu, C.-Z. Wang, J.-Y. Wan, et al., Comparative effectiveness of GLP-1 receptor agonists on glycaemic control, body weight, and lipid profile for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis, BMJ (2024) e076410. https://doi.org/10.1136/bmj-2023-076410.

[192] M.K. Mahapatra, M. Karuppasamy, B.M. Sahoo, Semaglutide, a glucagon like peptide-1 receptor agonist with cardiovascular benefits for management of type 2 diabetes, Rev Endocr Metab Disord 23 (2022) 521–539. https://doi.org/10.1007/s11154-021-09699-1.

[193] L.L. Baggio, D.J. Drucker, Glucagon-like peptide-1 receptor co-agonists for treating metabolic disease, Mol Metab 46 (2021) 101090. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101090.

[194] T.A. Zelniker, S.D. Wiviott, I. Raz, K. Im, E.L. Goodrich, R.H.M. Furtado, et al., Comparison of the Effects of Glucagon-Like Peptide Receptor Agonists and Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors for Prevention of Major Adverse Cardiovascular and

Renal Outcomes in Type 2 Diabetes Mellitus, Circulation 139 (2019) 2022–2031. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038868.

[195] D. Montaigne, L. Butruille, B. Staels, PPAR control of metabolism and cardiovascular functions, Nat Rev Cardiol 18 (2021) 809–823. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00569-6.

[196] X. Ji, W. Zhang, L. Yin, Z. Shi, J. Luan, L. Chen, et al., The Potential Roles of Post-Translational Modifications of PPARγ in Treating Diabetes, Biomolecules 12 (2022) 1832. https://doi.org/10.3390/biom12121832.

[197] S. V. Arnold, S.E. Inzucchi, J.B. Echouffo-Tcheugui, F. Tang, C.S.P. Lam, L.S. Sperling, et al., Understanding Contemporary Use of Thiazolidinediones, Circ Heart Fail 12 (2019). https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005855.

[198] S. Yasmin, V. Jayaprakash, Thiazolidinediones and PPAR orchestra as antidiabetic agents: From past to present, Eur J Med Chem 126 (2017) 879–893. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.020.

[199] J.R. Colca, P.E. Scherer, The metabolic syndrome, thiazolidinediones, and implications for intersection of chronic and inflammatory disease, Mol Metab 55 (2022) 101409. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101409.

[200] A. Najmi, M.S. Alam, N. Thangavel, M.M.E. Taha, A.M. Meraya, M. Albratty, et al., Synthesis, molecular docking, and in vivo antidiabetic evaluation of new benzylidene-2,4-thiazolidinediones as partial PPAR-γ agonists, Sci Rep 13 (2023) 19869. https://doi.org/10.1038/s41598-023-47157-x.

[201] L.D. McGowan, C.L. Roumie, Sulfonylureas as second line treatment for type 2 diabetes, BMJ (2018) k3041. https://doi.org/10.1136/bmj.k3041.

[202] H. Wang, R.L.M. Cordiner, Y. Huang, L. Donnelly, S. Hapca, A. Collier, et al., Cardiovascular Safety in Type 2 Diabetes With Sulfonylureas as Second-line Drugs: A Nationwide Population-Based Comparative Safety Study, Diabetes Care 46 (2023) 967–977. https://doi.org/10.2337/dc22-1238.

[203] H. Zhang, K. Colclough, A.L. Gloyn, T.I. Pollin, Monogenic diabetes: a gateway to precision medicine in diabetes, J Clin Invest 131 (2021). https://doi.org/10.1172/JCI142244.

[204] R.L.M. Cordiner, E.R. Pearson, Reflections on the sulphonylurea story: A drug class at risk of extinction or a drug class worth reviving?, Diabetes Obes Metab 21 (2019) 761–771. https://doi.org/10.1111/dom.13596.

[205] J.A. Hirst, A.J. Farmer, A. Dyar, T.W.C. Lung, R.J. Stevens, Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a systematic review and meta-analysis, Diabetologia 56 (2013) 973–984. https://doi.org/10.1007/s00125-013-2856-6.

[206] A. Douros, S. Dell'Aniello, O.H.Y. Yu, K.B. Filion, L. Azoulay, S. Suissa, Sulfonylureas as second line drugs in type 2 diabetes and the risk of cardiovascular and

hypoglycaemic events: population based cohort study, BMJ (2018) k2693. https://doi.org/10.1136/bmj.k2693.

[207] J. Zhang, Q. Chen, J. Zhong, C. Liu, B. Zheng, Q. Gong, DPP-4 Inhibitors as Potential Candidates for Antihypertensive Therapy: Improving Vascular Inflammation and Assisting the Action of Traditional Antihypertensive Drugs, Front Immunol 10 (2019). https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01050.

[208] I. Barchetta, F.A. Cimini, S. Dule, M.G. Cavallo, Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) as A Novel Adipokine: Role in Metabolism and Fat Homeostasis, Biomedicines 10 (2022) 2306. https://doi.org/10.3390/biomedicines10092306.

[209] D.-W. Shao, L.-J. Zhao, J.-F. Sun, Synthesis and clinical application of representative small-molecule dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM), Eur J Med Chem 272 (2024) 116464. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116464.

[210] C.F. Deacon, Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus, Nat Rev Endocrinol 16 (2020) 642–653. https://doi.org/10.1038/s41574-020-0399-8.

[211] M.P. Gilbert, R.E. Pratley, GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials, Front Endocrinol (Lausanne) 11 (2020). https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00178.

[212] M. Packer, Do DPP-4 Inhibitors Cause Heart Failure Events by Promoting Adrenergically Mediated Cardiotoxicity?, Circ Res 122 (2018) 928–932. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312673.

[213] L. V. Gromova, S.O. Fetissov, A.A. Gruzdkov, Mechanisms of Glucose Absorption in the Small Intestine in Health and Metabolic Diseases and Their Role in Appetite Regulation, Nutrients 13 (2021) 2474. https://doi.org/10.3390/nu13072474.

[214] C. Ghezzi, D.D.F. Loo, E.M. Wright, Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2, Diabetologia 61 (2018) 2087–2097. https://doi.org/10.1007/s00125-018-4656-5.

[215] E.M. Wright, D.D.F. Loo, B.A. Hirayama, Biology of Human Sodium Glucose Transporters, Physiol Rev 91 (2011) 733–794. https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2009.

[216] T. Rieg, V. Vallon, Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors, Diabetologia 61 (2018) 2079–2086. https://doi.org/10.1007/s00125-018-4654-7.

[217] L. Han, Q. Qu, D. Aydin, O. Panova, M.J. Robertson, Y. Xu, et al., Structure and mechanism of the SGLT family of glucose transporters, Nature 601 (2022) 274–279. https://doi.org/10.1038/s41586-021-04211-w.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[218] T. Danne, T. Biester, O. Kordonouri, Combined SGLT1 and SGLT2 Inhibitors and Their Role in Diabetes Care, Diabetes Technol Ther 20 (2018) S2-69-S2-77. https://doi.org/10.1089/dia.2018.0081.

[219] V. Vallon, S. Verma, Effects of SGLT2 Inhibitors on Kidney and Cardiovascular Function, Annu Rev Physiol 83 (2021) 503–528. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031620-095920.

[220] R.A. DeFronzo, L. Norton, M. Abdul-Ghani, Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition, Nat Rev Nephrol 13 (2017) 11–26. https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.170.

[221] V. Vallon, T. Nakagawa, Renal Tubular Handling of Glucose and Fructose in Health and Disease, in: Compr Physiol, Wiley, 2021: pp. 2995–3044. https://doi.org/10.1002/cphy.c210030.

[222] E. Gronda, M. Jessup, M. Iacoviello, A. Palazzuoli, C. Napoli, Glucose Metabolism in the Kidney: Neurohormonal Activation and Heart Failure Development, J Am Heart Assoc 9 (2020). https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018889.

[223] V. Vallon, S.C. Thomson, The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease, Nat Rev Nephrol 16 (2020) 317–336. https://doi.org/10.1038/s41581-020-0256-y.

[224] M. Alsahli, J.E. Gerich, Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes, Diabetes Res Clin Pract 133 (2017) 1–9. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.033.

[225] A. Dharia, A. Khan, V.S. Sridhar, D.Z.I. Cherney, SGLT2 Inhibitors: The Sweet Success for Kidneys, Annu Rev Med 74 (2023) 369–384. https://doi.org/10.1146/annurev-med-042921-102135.

[226] S. Feijóo-Bandín, A. Aragón-Herrera, M. Otero-Santiago, L. Anido-Varela, S. Moraña-Fernández, E. Tarazón, et al., Role of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in the Regulation of Inflammatory Processes in Animal Models, Int J Mol Sci 23 (2022) 5634. https://doi.org/10.3390/ijms23105634.

[227] J. Von Mering, Über Künstlichen Diabetes, Cent. Med. Wiss 22 (1886) 31–35.

[228] W. Cai, L. Jiang, Y. Xie, Y. Liu, W. Liu, G. Zhao, Design of SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes: A History Driven by Biology to Chemistry, Med Chem (Los Angeles) 11 (2015) 317–328. https://doi.org/10.2174/1573406411666150105105529.

[229] Z.-C. Dai, J.-X. Chen, R. Zou, X.-B. Liang, J.-X. Tang, C.-W. Yao, Role and mechanisms of SGLT-2 inhibitors in the treatment of diabetic kidney disease, Front Immunol 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1213473.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[230] B. Zinman, C. Wanner, J.M. Lachin, D. Fitchett, E. Bluhmki, S. Hantel, et al., Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes, N Engl J Med 373 (2015) 2117–2128. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504720.

[231] A. Markham, S.J. Keam, Sotagliflozin: First Global Approval, Drugs 79 (2019) 1023–1029. https://doi.org/10.1007/s40265-019-01146-5.

[232] L. Ni, C. Yuan, G. Chen, C. Zhang, X. Wu, SGLT2i: beyond the glucose-lowering effect, Cardiovasc Diabetol 19 (2020) 98. https://doi.org/10.1186/s12933-020-01071-y.

[233] R. Huang, P. Fu, L. Ma, Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines, Signal Transduct Target Ther 8 (2023) 129. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01379-7.

[234] J.J.V. McMurray, S.D. Solomon, S.E. Inzucchi, L. Køber, M.N. Kosiborod, F.A. Martinez, et al., Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction, N Engl J Med 381 (2019) 1995–2008. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911303.

[235] J.A. Spertus, M.C. Birmingham, M. Nassif, C. V. Damaraju, A. Abbate, J. Butler, et al., The SGLT2 inhibitor canagliflozin in heart failure: the CHIEF-HF remote, patient-centered randomized trial, Nat Med 28 (2022) 809–813. https://doi.org/10.1038/s41591-022-01703-8.

[236] A. Preda, F. Montecucco, F. Carbone, G.G. Camici, T.F. Lüscher, S. Kraler, et al., SGLT2 inhibitors: from glucose-lowering to cardiovascular benefits, Cardiovasc Res 120 (2024) 443–460. https://doi.org/10.1093/cvr/cvae047.

[237] E. Marilly, J. Cottin, N. Cabrera, C. Cornu, R. Boussageon, P. Moulinet al., SGLT2 inhibitors in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials balancing their risks and benefits, Diabetologia 65 (2022) 2000–2010. https://doi.org/10.1007/s00125-022-05773-8.

[238] R.J. Mentz, S.A. Brunton, J. Rangaswami, Sodium-glucose cotransporter-2 inhibition for heart failure with preserved ejection fraction and chronic kidney disease with or without type 2 diabetes mellitus: a narrative review, Cardiovasc Diabetol 22 (2023) 316. https://doi.org/10.1186/s12933-023-02023-y.

[239] Lilly Investors, Type 2 diabetes: European Commission approves Jardiance® (empagliflozin) tablets for use in adults in Europe, (2014). https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/type-2-diabetes-european-commission-approves-jardiancer (Acceso el 26 de julio del 2024).

[240] Jardiance, JardianceTM press releases. Boehringer Ingelheim, (2014). https://www.boehringer-ingelheim.com/us/fda-approves-jardiancer-empaglifozin-t2d-bi-us (Acceso el 10 de junio del 2024).

[241] R. Grempler, L. Thomas, M. Eckhardt, F. Himmelsbach, A. Sauer, D.E. Sharp, et al., Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2)

inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors, Diabetes Obes Metab 14 (2012) 83–90. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01517.x.

[242] J.E. Frampton, Empagliflozin: A Review in Type 2 Diabetes, Drugs 78 (2018) 1037–1048. https://doi.org/10.1007/s40265-018-0937-z.

[243] Boehringer Ingelheim International GmbH, Jardiance®. Ficha técnica o resumen de las características del producto. https://www.ema.europa.eu/es/documents/product-information/jardiance-epar-product-information_es.pdf (Acceso el 21 de junio del 2024).

[244] ClinicalTrials.gov, Efficacy and Safety of Empagliflozin (BI 10773) Versus Placebo and Sitagliptin Over 24 Weeks in Patients With Type 2 Diabetes, (2014). https://clinicaltrials.gov/study/NCT01177813 (Acceso el 21 de junio del 2024).

[245] M. Roden, J. Weng, J. Eilbracht, B. Delafont, G. Kim, H.J. Woerle, et al., Empagliflozin monotherapy with sitagliptin as an active comparator in patients with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial, Lancet Diabetes Endocrinol 1 (2013) 208–219. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70084-6.

[246] H.-U. Häring, L. Merker, E. Seewaldt-Becker, M. Weimer, T. Meinicke, H.J. Woerle, et al., Empagliflozin as Add-on to Metformin Plus Sulfonylurea in Patients With Type 2 Diabetes, Diabetes Care 36 (2013) 3396–3404. https://doi.org/10.2337/dc12-2673.

[247] C.S. Kovacs, V. Seshiah, R. Swallow, R. Jones, H. Rattunde, H.J. Woerle, et al, Empagliflozin improves glycaemic and weight control as add-on therapy to pioglitazone or pioglitazone plus metformin in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, placebo-controlled trial, Diabetes Obes Metab 16 (2014) 147–158. https://doi.org/10.1111/dom.12188.

[248] L.M. Laffel, T. Danne, G.J. Klingensmith, W. V Tamborlane, S. Willi, P. Zeitler, et al., Efficacy and safety of the SGLT2 inhibitor empagliflozin versus placebo and the DPP-4 inhibitor linagliptin versus placebo in young people with type 2 diabetes (DINAMO): a multicentre, randomised, double-blind, parallel group, phase 3 trial, Lancet Diabetes Endocrinol 11 (2023) 169–181. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00387-4.

[249] J. Rosenstock, J. Marquard, L.M. Laffel, D. Neubacher, S. Kaspers, D.Z. Cherney, et al., Empagliflozin as Adjunctive to Insulin Therapy in Type 1 Diabetes: The EASE Trials, Diabetes Care 41 (2018) 2560–2569. https://doi.org/10.2337/dc18-1749.

[250] V. Vallon, The Mechanisms and Therapeutic Potential of SGLT2 Inhibitors in Diabetes Mellitus, Annu Rev Med 66 (2015) 255–270. https://doi.org/10.1146/annurev-med-051013-110046.

[251] B. Zinman, S.E. Inzucchi, J.M. Lachin, C. Wanner, R. Ferrari, D. Fitchett, et al., Rationale, design, and baseline characteristics of a randomized, placebo-controlled

cardiovascular outcome trial of empagliflozin (EMPA-REG OUTCOMETM), Cardiovasc Diabetol 13 (2014) 102. https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-102.

[252] D. Fitchett, B. Zinman, C. Wanner, J.M. Lachin, S. Hantel, A. Salsali, 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 37 (2016) 1526–1534. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv728.

[253] M. Packer, J. Butler, G.S. Filippatos, W. Jamal, A. Salsali, J. Schnee, et al., Evaluation of the effect of sodium–glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality of patients with chronic heart failure and a reduced ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Reduced trial, Eur J Heart Fail 21 (2019) 1270–1278. https://doi.org/10.1002/ejhf.1536.

[254] M. Packer, S.D. Anker, J. Butler, G. Filippatos, S.J. Pocock, P. Carson, et al., Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure, N Engl J Med 383 (2020) 1413–1424. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022190.

[255] S.D. Anker, J. Butler, G. Filippatos, M. Shahzeb Khan, J.P. Ferreira, E. Bocchi, et al., Baseline characteristics of patients with heart failure with preserved ejection fraction in the EMPEROR-Preserved trial, Eur J Heart Fail 22 (2020) 2383–2392. https://doi.org/10.1002/ejhf.2064.

[256] S.D. Anker, J. Butler, G.S. Filippatos, W. Jamal, A. Salsali, J. Schnee, 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 21 (2019) 1279–1287. https://doi.org/10.1002/ejhf.1596.

[257] S.D. Anker, J. Butler, G. Filippatos, J.P. Ferreira, E. Bocchi, M. Böhm, et al., Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction, N Engl J Med 385 (2021) 1451–1461. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107038.

[258] J. Jensen, M. Omar, C. Kistorp, M.K. Poulsen, C. Tuxen, I. Gustafsson, et al., Twelve weeks of treatment with empagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction: A double-blinded, randomized, and placebo-controlled trial, Am Heart J 228 (2020) 47–56. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2020.07.011.

[259] J. Jensen, M. Omar, C. Kistorp, M.K. Poulsen, C. Tuxen, I. Gustafsson, et al., Empagliflozin in heart failure patients with reduced ejection fraction: a randomized clinical trial (Empire HF), Trials 20 (2019) 374. https://doi.org/10.1186/s13063-019-3474-5.

[260] J. Jensen, M. Omar, C. Kistorp, C. Tuxen, I. Gustafsson, L. Køber, et al., Metabolic Effects of Empagliflozin in Heart Failure: A Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial (Empire HF Metabolic), Circulation 143 (2021) 2208–2210. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053463.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[261] C. Fuchs Andersen, M. Omar, A. Glenthøj, D. El Fassi, H.J. Møller, J.A. Lindholm Kurtzhals, et al., Effects of empagliflozin on erythropoiesis in heart failure: data from the Empire HF trial, Eur J Heart Fail 25 (2023) 226–234. https://doi.org/10.1002/ejhf.2735.

[262] K. Damman, J.C. Beusekamp, E.M. Boorsma, H.P. Swart, T.D.J. Smilde, A. Elvan, 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 22 (2020) 713–722. https://doi.org/10.1002/ejhf.1713.

[263] J. Biegus, A.A. Voors, S.P. Collins, M.N. Kosiborod, J.R. Teerlink, C.E. Angermann, et al., Impact of empagliflozin on decongestion in acute heart failure: the EMPULSE trial, Eur Heart J 44 (2023) 41–50. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac530.

[264] FDA approves empagliflozin for heart failure regardless of ejection fraction, Cardiovasc J Afr. 33(5): 286. (2022).

[265] A. Gass, Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors and Heart Failure, Am J Med 137 (2024) S1–S2. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2023.04.032.

[266] A.H. Lim, N. Abdul Rahim, J. Zhao, S.Y.A. Cheung, Y.-W. Lin, Cost effectiveness analyses of pharmacological treatments in heart failure, Front Pharmacol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fphar.2022.919974.

[267] C. Lahnwong, S.C. Chattipakorn, N. Chattipakorn, Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium–glucose co-transporter 2 inhibitors, Cardiovasc Diabetol 17 (2018) 101. https://doi.org/10.1186/s12933-018-0745-5.

[268] A. Cersosimo, N. Salerno, J. Sabatino, A. Scatteia, G. Bisaccia, S. De Rosa, et al., Underlying mechanisms and cardioprotective effects of SGLT2i and GLP-1Ra: insights from cardiovascular magnetic resonance, Cardiovasc Diabetol 23 (2024) 94. https://doi.org/10.1186/s12933-024-02181-7.

[269] Y. Shen, L. Cheng, M. Xu, W. Wang, Z. Wan, H. Xiong, et al., SGLT2 inhibitor empagliflozin downregulates miRNA-34a-5p and targets GREM2 to inactivate hepatic stellate cells and ameliorate non-alcoholic fatty liver disease-associated fibrosis, Metabolism 146 (2023) 155657. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155657.

[270] Y.-P. Lu, H.-W. Wu, T. Zhu, X.-T. Li, J. Zuo, A.A. Hasan, et al., Empagliflozin reduces kidney fibrosis and improves kidney function by alternative macrophage activation in rats with 5/6-nephrectomy, Biomed Pharmacother 156 (2022) 113947. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113947.

[271] V. Quagliariello, M. De Laurentiis, D. Rea, A. Barbieri, M.G. Monti, A. Carbone, et al., The SGLT-2 inhibitor empagliflozin improves myocardial strain, reduces cardiac fibrosis and pro-inflammatory cytokines in non-diabetic mice treated with doxorubicin, Cardiovasc Diabetol 20 (2021) 150. https://doi.org/10.1186/s12933-021-01346-y.

USC DE COMPOSTELA

[272] C. Li, J. Zhang, M. Xue, X. Li, F. Han, X. Liu, et al., SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart, Cardiovasc Diabetol 18 (2019) 15. https://doi.org/10.1186/s12933-019-0816-2.

[273] H. Kusaka, N. Koibuchi, Y. Hasegawa, H. Ogawa, S. Kim-Mitsuyama, Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome, Cardiovasc Diabetol 15 (2016) 157. https://doi.org/10.1186/s12933-016-0473-7.

[274] J.P. Ferreira, J. Butler, S.D. Anker, J.L. Januzzi, M. Panova-Noeva, A.L. Reese-Petersen, et al., Effects of empagliflozin on collagen biomarkers in patients with heart failure: Findings from the EMPEROR trials, Eur J Heart Fail 26 (2024) 274–284. https://doi.org/10.1002/ejhf.3101.

[275] M. Xue, T. Li, Y. Wang, Y. Chang, Y. Cheng, Y. Lu, et al., Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice, Clin Sci 133 (2019) 1705–1720. https://doi.org/10.1042/CS20190585.

[276] X. Sun, F. Han, Q. Lu, X. Li, D. Ren, J. Zhang, et al., Empagliflozin Ameliorates Obesity-Related Cardiac Dysfunction by Regulating Sestrin2-Mediated AMPK-mTOR Signaling and Redox Homeostasis in High-Fat Diet–Induced Obese Mice, Diabetes 69 (2020) 1292–1305. https://doi.org/10.2337/db19-0991.

[277] S. Chen, K. Overberg, Z. Ghouse, M.W. Hollmann, N.C. Weber, R. Coronel, et al., Empagliflozin mitigates cardiac hypertrophy through cardiac RSK/NHE-1 inhibition, Biomed Pharmacother 174 (2024) 116477. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116477.

[278] Q.-Q. Zhang, G.-Q. Li, Y. Zhong, J. Wang, A.-N. Wang, X. Zhou, et al., Empagliflozin improves chronic hypercortisolism-induced abnormal myocardial structure and cardiac function in mice, Ther Adv Chronic Dis 11 (2020) 204062232097483. https://doi.org/10.1177/2040622320974833.

[279] C.G. Lenneman, D.B. Sawyer, Cardio-Oncology, Circ Res 118 (2016) 1008–1020. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303633.

[280] S.P. McCluskey, A. Haslop, C. Coello, R.N. Gunn, E.W. Tate, R. Southworth, et al., Imaging of Chemotherapy-Induced Acute Cardiotoxicity with F-Labeled Lipophilic Cations, J Nucl Med 60 (2019) 1750–1756. https://doi.org/10.2967/jnumed.119.226787.

[281] H.-Y. Chang, H.-C. Hsu, Y.-H. Fang, P.-Y. Liu, Y.-W. Liu, Empagliflozin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting the JNK signaling pathway, Biomed Pharmacother 176 (2024) 116759. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116759.

[282] J. Sabatino, S. De Rosa, L. Tammè, C. Iaconetti, S. Sorrentino, A. Polimeni, et al., Empagliflozin prevents doxorubicin-induced myocardial dysfunction, Cardiovasc Diabetol 19 (2020) 66. https://doi.org/10.1186/s12933-020-01040-5.

[283] M. Chen, Empagliflozin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating AMPK/SIRT-1/PGC-1α-mediated mitochondrial biogenesis, Toxicol Res (Camb) 12 (2023) 216–223. https://doi.org/10.1093/toxres/tfad007.

[284] A. Malik, A. Bagchi, D. Jassal, P. Singal, Doxorubicin-induced cardiomyopathy is mitigated by empagliflozin via the modulation of endoplasmic reticulum stress pathways, Mol Med Rep 29 (2024) 74. https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13198.

[285] C. Liu, Y. Ho, W. Lee, C. Huang, Y. Lee, C. Hsieh, et al., Sodium-Glucose Co-Transporter-2 Inhibitor Empagliflozin Attenuates Sorafenib-Induced Myocardial Inflammation and Toxicity, Environ Toxicol (2024). https://doi.org/10.1002/tox.24362.

[286] M. Nakao, I. Shimizu, G. Katsuumi, Y. Yoshida, M. Suda, Y. Hayashi, et al., Empagliflozin maintains capillarization and improves cardiac function in a murine model of left ventricular pressure overload, Sci Rep 11 (2021) 18384. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97787-2.

[287] G. Tian, Y. Yu, H. Deng, L. Yang, X. Shi, B. Yu, Empagliflozin alleviates ethanol-induced cardiomyocyte injury through inhibition of mitochondrial apoptosis via a SIRT1/PTEN/Akt pathway, Clin Exp Pharmacol Physiol 48 (2021) 837–845. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13470.

[288] N. Li, Q.-X. Zhu, G.-Z. Li, T. Wang, H. Zhou, Empagliflozin ameliorates diabetic cardiomyopathy probably viaactivating AMPK/PGC-1α and inhibiting the RhoA/ROCK pathway, World J Diabetes 14 (2023) 1862–1876. https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i12.1862.

[289] C.-C. Wang, Y. Li, X.-Q. Qian, H. Zhao, D. Wang, G.-X. Zuo, et al., Empagliflozin alleviates myocardial I/R injury and cardiomyocyte apoptosis via inhibiting ER stress-induced autophagy and the PERK/ATF4/Beclin1 pathway, J Drug Target 30 (2022) 858–872. https://doi.org/10.1080/1061186X.2022.2064479.

[290] N. Nasiri-Ansari, C. Nikolopoulou, K. Papoutsi, I. Kyrou, C.S. Mantzoros, G. Kyriakopoulos, et al., Empagliflozin Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in High Fat Diet Fed ApoE(-/-) Mice by Activating Autophagy and Reducing ER Stress and Apoptosis, Int J Mol Sci 22 (2021) 818. https://doi.org/10.3390/ijms22020818.

[291] R. Khafagy, S. Dash, Obesity and Cardiovascular Disease: The Emerging Role of Inflammation, Front Cardiovasc Med 8 (2021). https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.768119.

[292] L. Xu, N. Nagata, M. Nagashimada, F. Zhuge, Y. Ni, G. Chen, et al., SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice, EBioMedicine 20 (2017) 137–149. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.028.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[293] S. Hojná, H. Malínská, M. Hüttl, Z. Vaňourková, I. Marková, D. Miklánková, et al., Hepatoprotective and cardioprotective effects of empagliflozin in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet, Biomed Pharmacother174 (2024) 116520. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116520.

[294] W. Sheng, J. Yu, H. Zhang, J. Zhang, Empagliflozin attenuates inflammation levels in autoimmune myocarditis through the STAT3 pathway and macrophage phenotype transformation, Mol Immunol 167 (2024) 43–52. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2024.02.006.

[295] C.N. Koyani, I. Plastira, H. Sourij, S. Hallström, A. Schmidt, P.P. Rainer, et al., Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation, Pharmacol Res 158 (2020) 104870. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104870.

[296] S. Verma, S. Rawat, K.L. Ho, C.S. Wagg, L. Zhang, H. Teoh, et al., Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes, JACC Basic Transl Sci 3 (2018) 575–587. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.07.006.

[297] D. Abdurrachim, E. Manders, K. Nicolay, E. Mayoux, J.J. Prompers, Single dose of empagliflozin increases in vivo cardiac energy status in diabetic db/db mice, Cardiovasc Res (2018). https://doi.org/10.1093/cvr/cvy246.

[298] W. Cai, K. Chong, Y. Huang, C. Huang, L. Yin, Empagliflozin improves mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy by modulating ketone body metabolism and oxidative stress, Redox Biol 69 (2024) 103010. https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.103010.

[299] B.A. Kappel, M. Lehrke, K. Schütt, A. Artati, J. Adamski, C. Lebherz, et al., Effect of Empagliflozin on the Metabolic Signature of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease, Circulation 136 (2017) 969–972. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029166.

[300] C.G. Santos-Gallego, J.A. Requena-Ibanez, R. San Antonio, K. Ishikawa, S. Watanabe, B. Picatoste, et al., Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics, J Am Coll Cardiol 73 (2019) 1931–1944. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.056.

[301] M. Takano, H. Kondo, T. Harada, M. Takahashi, Y. Ishii, H. Yamasaki, et al., Empagliflozin Suppresses the Differentiation/Maturation of Human Epicardial Preadipocytes and Improves Paracrine Secretome Profile, JACC Basic Transl Sci 8 (2023) 1081–1097. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.05.007.

[302] B. Radlinger, C. Ress, S. Folie, K. Salzmann, A. Lechuga, B. Weiss, et al., Empagliflozin protects mice against diet-induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis, Diabetologia 66 (2023) 754–767. https://doi.org/10.1007/s00125-022-05851-x.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[303] L. Xu, N. Nagata, G. Chen, M. Nagashimada, F. Zhuge, Y. Ni, Y. Sakai, S. Kaneko, T. Ota, Empagliflozin reverses obesity and insulin resistance through fat browning and alternative macrophage activation in mice fed a high-fat diet, BMJ Open Diabetes Res Care 7 (2019) e000783. https://doi.org/10.1136/bmjdrc-2019-000783.

[304] T.I. Petito-da-Silva, V. Souza-Mello, S. Barbosa-da-Silva, Empaglifozin mitigates NAFLD in high-fat-fed mice by alleviating insulin resistance, lipogenesis and ER stress, Mol Cell Endocrinol 498 (2019) 110539. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110539.

[305] M.S. Kuchay, S. Krishan, S.K. Mishra, K.J. Farooqui, M.K. Singh, J.S. Wasir, Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial), Diabetes Care 41 (2018) 1801–1808. https://doi.org/10.2337/dc18-0165.

[306] L. Xu, C. Xu, X. Liu, X. Li, T. Li, X. Yu, Empagliflozin Induces White Adipocyte Browning and Modulates Mitochondrial Dynamics in KK Cg-Ay/J Mice and Mouse Adipocytes, Front Physiol 12 (2021). https://doi.org/10.3389/fphys.2021.745058.

[307] A. Aragón-Herrera, M. Otero-Santiago, L. Anido-Varela, S. Moraña-Fernández, M. Campos-Toimil, T. García-Caballero, et al., The Treatment With the SGLT2 Inhibitor Empagliflozin Modifies the Hepatic Metabolome of Male Zucker Diabetic Fatty Rats Towards a Protective Profile, Front Pharmacol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fphar.2022.827033.

[308] A. Aragón-Herrera, S. Feijóo-Bandín, M. Otero Santiago, L. Barral, M. Campos-Toimil, J. Gil-Longo, et al., Empagliflozin reduces the levels of CD36 and cardiotoxic lipids while improving autophagy in the hearts of Zucker diabetic fatty rats, Biochem Pharmacol 170 (2019) 113677. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113677.

[309] P.A. Heidenreich, B. Bozkurt, D. Aguilar, L.A. Allen, J.J. Byun, M.M. Colvin, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure, J Am Coll Cardiol 79 (2022) e263–e421. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.12.012.

[310] L. Da Dalt, A.G. Cabodevilla, I.J. Goldberg, G.D. Norata, Cardiac lipid metabolism, mitochondrial function, and heart failure, Cardiovasc Res 119 (2023) 1905–1914. https://doi.org/10.1093/cvr/cvad100.

[311] B. Bozkurt, A.J.S. Coats, H. Tsutsui, C.M. Abdelhamid, S. Adamopoulos, N. Albert, et al., Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association, Eur J Heart Fail 23 (2021) 352–380. https://doi.org/10.1002/ejhf.2115.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[312] B. Shahim, C.J. Kapelios, G. Savarese, L.H. Lund, Global Public Health Burden of Heart Failure: An Updated Review, Card Fail Rev 9 (2023). https://doi.org/10.15420/cfr.2023.05.

[313] V.L. Roger, Epidemiology of Heart Failure, Circ Res 128 (2021) 1421–1434. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318172.

[314] B. Ziaeian, G.C. Fonarow, Epidemiology and aetiology of heart failure, Nat Rev Cardiol 13 (2016) 368–378. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25.

[315] C.E. Hamo, L. Kwak, D. Wang, R. Florido, J.B. Echouffo-Tcheugui, R.S. Blumenthal, et al., Heart Failure Risk Associated With Severity of Modifiable Heart Failure Risk Factors: The ARIC Study, J Am Heart Assoc 11 (2022) 21583. https://doi.org/10.1161/JAHA.121.021583.

[316] American Heart Association, Risks for Heart Failure, (2023). https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/causes-and-risks-for-heart-failure (Acceso el 22de junio del 2024).

[317] G. Savarese, P.M. Becher, L.H. Lund, P. Seferovic, G.M.C. Rosano, A.J.S. Coats, Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology, Cardiovasc Res 118 (2023) 3272–3287. https://doi.org/10.1093/cvr/cvac013.

[318] L. Kraus, Targeting Epigenetic Regulation of Cardiomyocytes through Development for Therapeutic Cardiac Regeneration after Heart Failure, Int J Mol Sci 23 (2022) 11878. https://doi.org/10.3390/ijms231911878.

[319] A. Abdin, M. Schulz, U. Riemer, B. Hadëri, R. Wachter, U. Laufs, et al., Sacubitril/valsartan in heart failure: efficacy and safety in and outside clinical trials, ESC Heart Fail 9 (2022) 3737–3750. https://doi.org/10.1002/ehf2.14097.

[320] A. Groenewegen, F.H. Rutten, A. Mosterd, A.W. Hoes, Epidemiology of heart failure, Eur J Heart Fail 22 (2020) 1342–1356. https://doi.org/10.1002/ejhf.1858.

[321] P.M. Seferović, P. Vardas, E.A. Jankowska, A.P. Maggioni, A. Timmis, I. Milinković, et al., The Heart Failure Association Atlas: Heart Failure Epidemiology and Management Statistics 2019, Eur J Heart Fail 23 (2021) 906–914. https://doi.org/10.1002/ejhf.2143.

[322] V.L. Roger, Epidemiology of Heart Failure, Circ Res 113 (2013) 646–659. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300268.

[323] B. Bozkurt, T. Ahmad, K.M. Alexander, W.L. Baker, K. Bosak, K. Breathett, et al., Heart Failure Epidemiology and Outcomes Statistics: A Report of the Heart Failure Society of America, J Card Fail 29 (2023) 1412–1451. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2023.07.006.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[324] S.L. Kristensen, A. Barasa, J.J. Thune, The challenge of addressing heart failure in low and middle-income countries, Eur J Heart Fail 24 (2022) 1491–1492. https://doi.org/10.1002/ejhf.2598.

[325] A. Sicras-Mainar, A. Sicras-Navarro, B. Palacios, L. Varela, J.F. Delgado, Epidemiología y tratamiento de la insuficiencia cardiaca en España: estudio PATHWAYS-HF, Rev Esp Cardiol 75 (2022) 31–38. https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.09.014.

[326] K. Swedberg, J. Cleland, H. Dargie, H. Drexler, F. Follath, M. Komajda, et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005), Eur Heart J 26 (2005) 1115–1140. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi204.

[327] P.A. McKee, W.P. Castelli, P.M. McNamara, W.B. Kannel, The Natural History of Congestive Heart Failure: The Framingham Study, N Engl J Med 285 (1971) 1441–1446. https://doi.org/10.1056/NEJM197112232852601.

[328] K.J. Carlson, D.C.S. Lee, A.H. Goroll, M. Leahy, R.A. Johnson, An analysis of physicians' reasons for prescribing long-term digitalis therapy in outpatients, J Chronic Dis 38 (1985) 733–739. https://doi.org/10.1016/0021-9681(85)90115-8.

[329] H. Eriksson, K. Caidaul, B. Larsson, L.O. Ohlson, L. Welin, L. Wilhelmsen, et al., Cardiac and pulmonary causes of dyspnoea—validation of a scoring test for clinical-epidemiological use: The Study of Men Born in 1913, Eur Heart J 8 (1987) 1007–1014. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a062365.

[330] S. Kurmani, I. Squire, Acute Heart Failure: Definition, Classification and Epidemiology, Curr Heart Fail Rep 14 (2017) 385–392. https://doi.org/10.1007/s11897-017-0351-y.

[331] A. Bayes-Genis, K.F. Docherty, M.C. Petrie, J.L. Januzzi, C. Mueller, L. Anderson, et al., Practical algorithms for early diagnosis of heart failure and heart stress using NT-proBNP: A clinical consensus statement from the Heart Failure Association of the ESC, Eur J Heart Fail 25 (2023) 1891–1898. https://doi.org/10.1002/ejhf.3036.

[332] M.H. Drazner, R.N. Brown, P.A. Kaiser, B. Cabuay, N.P. Lewis, M.J. Semigran, et al., Relationship of right- and left-sided filling pressures in patients with advanced heart failure: A 14-year multi-institutional analysis, J Heart Lung Transplant 31 (2012) 67–72. https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.09.003.

[333] American Heart Association, Heart Failure Signs and Symptoms, (2023). https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/warning-signs-of-heart-failure (Acceso el 22 de junio del 2024).

[334] C. Mueller, K. McDonald, R.A. de Boer, A. Maisel, J.G.F. Cleland, N. Kozhuharov, et al., Heart Failure Association of the European Society of Cardiology practical guidance on the use of natriuretic peptide concentrations, Eur J Heart Fail 21 (2019) 715–731. https://doi.org/10.1002/ejhf.1494.

USC COMPOSTELA

[335] A.G. Hoek, E. Dal Canto, E. Wenker, N. Bindraban, M.L. Handoko, P.J.M. Elders, et al., Epidemiology of heart failure in diabetes: a disease in disguise, Diabetologia 67 (2024) 574–601. https://doi.org/10.1007/s00125-023-06068-2.

[336] M.M. Redfield, B.A. Borlaug, Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JAMA 329 (2023) 827. https://doi.org/10.1001/jama.2023.2020.

[337] B.A. Borlaug, M.D. Jensen, D.W. Kitzman, C.S.P. Lam, M. Obokata, O.J. Rider, Obesity and heart failure with preserved ejection fraction: new insights and pathophysiological targets, Cardiovasc Res 118 (2023) 3434–3450. https://doi.org/10.1093/cvr/cvac120.

[338] D. Stolfo, E. Fabris, L.H. Lund, G. Savarese, G. Sinagra, From mid-range to mildly reduced ejection fraction heart failure: A call to treat, Eur J Intern Med 103 (2022) 29–35. https://doi.org/10.1016/j.ejim.2022.05.030.

[339] S.M. Dunlay, V.L. Roger, M.M. Redfield, Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction, Nat Rev Cardiol 14 (2017) 591–602. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.65.

[340] T. Li, B. Wei, J. Cong, Y. Hong, S. Li, Direct estimation of left ventricular ejection fraction via a cardiac cycle feature learning architecture, Comput Biol Med 118 (2020) 103659. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.103659.

[341] S. Zacchigna, A. Paldino, I. Falcão-Pires, E.P. Daskalopoulos, M. Dal Ferro, S. Vodret, et al., Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function, Cardiovasc Res 117 (2021) 43–59. https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa110.

[342] T.A. McDonagh, M. Metra, M. Adamo, R.S. Gardner, A. Baumbach, M. Böhm, et al., 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure, Eur Heart J 42 (2021) 3599–3726. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368.

[343] T. Havlenova, P. Skaroupkova, M. Miklovic, M. Behounek, M. Chmel, D. Jarkovska, et al., Right versus left ventricular remodeling in heart failure due to chronic volume overload, Sci Rep 11 (2021) 17136. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96618-8.

[344] A. Paterek, M. Oknińska, M. Mączewski, U. Mackiewicz, Right Ventricle Remodelling in Left-Sided Heart Failure in Rats: The Role of Calcium Signalling, Biomolecules 12 (2022) 1714. https://doi.org/10.3390/biom12111714.

[345] V.L. Roger, Epidemiology of Heart Failure, Circ Res 128 (2021) 1421–1434. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318172.

[346] D. Burkhoff, M.S. Maurer, M. Packer, Heart Failure With a Normal Ejection Fraction, Circulation 107 (2003) 656–658. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000053947.82595.03.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[347] M.R. Zile, D.L. Brutsaert, New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part I, Circulation 105 (2002) 1387–1393. https://doi.org/10.1161/hc1102.105289.

[348] W. Grossman, Diastolic dysfunction and congestive heart failure., Circulation 81 (1990) III1-7. https://doi.org/2137051.

[349] F. Capone, C. Sotomayor-Flores, D. Bode, R. Wang, D. Rodolico, S. Strocchi, et al., Cardiac metabolism in HFpEF: from fuel to signalling, Cardiovasc Res 118 (2023) 3556–3575. https://doi.org/10.1093/cvr/cvac166.

[350] T.A. McDonagh, M. Metra, M. Adamo, R.S. Gardner, A. Baumbach, M. Böhm, et al., 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure, Eur Heart J 42 (2021) 3599–3726. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368.

[351] A. Cohen-Solal, Diastolic heart failure: myth or reality?, Eur J Heart Fail 4 (2002) 395–400. https://doi.org/10.1016/S1388-9842(02)00033-8.

[352] B. Bozkurt, A.J.S. Coats, H. Tsutsui, C.M. Abdelhamid, S. Adamopoulos, N. Albert, et al., Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition o, Eur J Heart Fail 23 (2021) 352–380. https://doi.org/10.1002/ejhf.2115.

[353] C. Caraballo, N.R. Desai, H. Mulder, B. Alhanti, F.P. Wilson, M. Fiuzat, et al., Clinical Implications of the New York Heart Association Classification, J Am Heart Assoc 8 (2019). https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014240.

[354] S. Mishra, D.A. Kass, Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction, Nat Rev Cardiol 18 (2021) 400–423. https://doi.org/10.1038/s41569-020-00480-6.

[355] S.J. Shah, B.A. Borlaug, D.W. Kitzman, A.D. McCulloch, B.C. Blaxall, R. Agarwal, et al., Research Priorities for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circulation 141 (2020) 1001–1026. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041886.

[356] M. Obokata, Y.N.V. Reddy, B.A. Borlaug, Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JACC Cardiovasc Imaging 13 (2020) 245–257. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2018.12.034.

[357] L. Thomas, T.H. Marwick, B.A. Popescu, E. Donal, L.P. Badano, Left Atrial Structure and Function, and Left Ventricular Diastolic Dysfunction, J Am Coll Cardiol 73 (2019) 1961–1977. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.059.

[358] S.E. Litwin, M.R. Zile, Should We Test for Diastolic Dysfunction? How and How Often?, JACC Cardiovasc Imaging 13 (2020) 297–309. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.02.029.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[359] A. Mascolo, G. di Mauro, D. Cappetta, A. De Angelis, D. Torella, K. Urbanek, et al., Current and future therapeutic perspective in chronic heart failure, Pharmacol Res 175 (2022) 106035. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106035.

[360] J. Hartupee, D.L. Mann, Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction, Nat Rev Cardiol 14 (2017) 30–38. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.163.

[361] A. Lymperopoulos, G. Rengo, W.J. Koch, Adrenergic Nervous System in Heart Failure, Circ Res 113 (2013) 739–753. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300308.

[362] P.S. Chaggar, C.J. Malkin, S.M. Shaw, S.G. Williams, K.S. Channer, Neuroendocrine Effects on the Heart and Targets for Therapeutic Manipulation in Heart Failure, Cardiovasc Ther 27 (2009) 187–193. https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2009.00094.x.

[363] M. Metra, J.R. Teerlink, Heart failure, Lancet 390 (2017) 1981–1995. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31071-1.

[364] F. Triposkiadis, G. Karayannis, G. Giamouzis, J. Skoularigis, G. Louridas, J. Butler, The Sympathetic Nervous System in Heart Failure, J Am Coll Cardiol 54 (2009) 1747–1762. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.015.

[365] C. de Lucia, A. Eguchi, W.J. Koch, New Insights in Cardiac β-Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging, Front Pharmacol 9 (2018). https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00904.

[366] S.F. Steinberg, Beta-Adrenergic Receptor Regulation Revisited, Circ Res 123 (2018) 1199–1201. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313884.

[367] Q. Fu, Q. Wang, Y.K. Xiang, Insulin and β Adrenergic Receptor Signaling: Crosstalk in Heart, Trends Endocrinol Metab 28 (2017) 416–427. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.002.

[368] N.R. Pugliese, S. Masi, S. Taddei, The renin-angiotensin-aldosterone system: a crossroad from arterial hypertension to heart failure, Heart Fail Rev 25 (2020) 31–42. https://doi.org/10.1007/s10741-019-09855-5.

[369] M.P. Ocaranza, J.A. Riquelme, L. García, J.E. Jalil, M. Chiong, R.A.S. Santos, et al., Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease, Nat Rev Cardiol 17 (2020) 116–129. https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8.

[370] P. Balakumar, G. Jagadeesh, The renin-angiotensin-aldosterone system: A century-old diversified system with several therapeutic avenues, Pharmacol Res 174 (2021) 105929. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105929.

[371] S. Puglisi, A. Rossini, R. Poli, F. Dughera, A. Pia, M. Terzolo, et al., Effects of SGLT2 Inhibitors and GLP-1 Receptor Agonists on Renin-Angiotensin-Aldosterone

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

System, Front Endocrinol (Lausanne) 12 (2021). https://doi.org/10.3389/fendo.2021.738848.

[372] M.K. Ames, C.E. Atkins, B. Pitt, The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression, J Vet Intern Med 33 (2019) 363–382. https://doi.org/10.1111/jvim.15454.

[373] S. Patel, A. Rauf, H. Khan, T. Abu-Izneid, Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies, Biomed Pharmacother 94 (2017) 317–325. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091.

[374] M.L.S. Sequeira-Lopez, R.A. Gomez, Renin Cells, the Kidney, and Hypertension, Circ Res 128 (2021) 887–907. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318064.

[375] C.H. Wu, S. Mohammadmoradi, J.Z. Chen, H. Sawada, A. Daugherty, H.S. Lu, Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions, Arterioscler Thromb Vasc Biol 38 (2018). https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311282.

[376] E.O. Cruz-López, D. Ye, C. Wu, H.S. Lu, E. Uijl, K.M. Mirabito Colafella, et al., Angiotensinogen Suppression: A New Tool to Treat Cardiovascular and Renal Disease, Hypertension 79 (2022) 2115–2126. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.18731.

[377] I. Baranowska, O. Gawrys, M.M. Roszkowska-Chojecka, B. Badzynska, D. Tymecka, K.H. Olszynski, et al, Chymase Dependent Pathway of Angiotensin II Generation and Rapeseed Derived Peptides for Antihypertensive Treatment of Spontaneously Hypertensive Rats., Front Pharmacol 12 (2021) 658805. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.658805.

[378] L. Shi, C. Mao, Z. Xu, L. Zhang, Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases, Drug Discov Today 15 (2010) 332–341. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.02.003.

[379] W.J. Kostis, M. Shetty, Y.S. Chowdhury, J.B. Kostis, ACE Inhibitor-Induced Angioedema: a Review, Curr Hypertens Rep 20 (2018) 55. https://doi.org/10.1007/s11906-018-0859-x.

[380] W.J. Kostis, M. Shetty, Y.S. Chowdhury, J.B. Kostis, ACE Inhibitor-Induced Angioedema: a Review, Curr Hypertens Rep 20 (2018) 55. https://doi.org/10.1007/s11906-018-0859-x.

[381] S. Vasile, A. Hallberg, J. Sallander, M. Hallberg, J. Åqvist, H. Gutiérrez-de-Terán, Evolution of Angiotensin Peptides and Peptidomimetics as Angiotensin II Receptor Type 2 (AT2) Receptor Agonists, Biomolecules 10 (2020) 649. https://doi.org/10.3390/biom10040649.

[382] T. Kellici, A. Tzakos, T. Mavromoustakos, Rational Drug Design and Synthesis of Molecules Targeting the Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors, Molecules 20 (2015) 3868–3897. https://doi.org/10.3390/molecules20033868.

[383] S. Vukelic, K.K. Griendling, Angiotensin II, From Vasoconstrictor to Growth Factor, Circ Res 114 (2014) 754–757. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303045.

[384] R.M. Carey, H.M. Siragy, J.J. Gildea, S.R. Keller, Angiotensin Type-2 Receptors: Transducers of Natriuresis in the Renal Proximal Tubule, Int J Mol Sci 23 (2022) 2317. https://doi.org/10.3390/ijms23042317.

[385] R.A.S. Santos, G.Y. Oudit, T. Verano-Braga, G. Canta, U.M. Steckelings, M. Bader, The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms, Am J Physiol Heart Circ Physiol 316 (2019) H958–H970. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2018.

[386] K.M. Denton, GPCRs (G-Protein–Coupled Receptors) as Microprocessors, Hypertension 77 (2021) 432–434. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16421.

[387] S. Patel, A. Rauf, H. Khan, T. Abu-Izneid, Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies, Biomed Pharmacother 94 (2017) 317–325. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091.

[388] S. Gambaryan, S. Mohagaonkar, V.O. Nikolaev, Regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by cyclic nucleotides and phosphodiesterases, Front Endocrinol (Lausanne) 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1239492.

[389] A. Vecchiola, C.F. Lagos, C.A. Carvajal, R. Baudrand, C.E. Fardella, Aldosterone Production and Signaling Dysregulation in Obesity, Curr Hypertens Rep 18 (2016) 20. https://doi.org/10.1007/s11906-016-0626-9.

[390] A.N. Dinh Cat, M. Friederich-Persson, A. White, R.M. Touyz, Adipocytes, aldosterone and obesity-related hypertension, J Mol Endocrinol 57 (2016) F7–F21. https://doi.org/10.1530/JME-16-0025.

[391] T. Kawai, S.J. Forrester, S. O'Brien, A. Baggett, V. Rizzo, S. Eguchi, AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system, Pharmacol Res 125 (2017) 4–13. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.008.

[392] N. Fatima, S.N. Patel, T. Hussain, Angiotensin II Type 2 Receptor: A Target for Protection Against Hypertension, Metabolic Dysfunction, and Organ Remodeling, Hypertension 77 (2021) 1845–1856. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.11941.

[393] R.A.S. Santos, G.Y. Oudit, T. Verano-Braga, G. Canta, U.M. Steckelings, M. Bader, The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms, Am J Physiol Heart Circ Physiol 316 (2019) H958–H970. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2018.

[394] C. Sumners, A.A. Peluso, A.H. Haugaard, J.B. Bertelsen, U.M. Steckelings, Anti-fibrotic mechanisms of angiotensin AT 2 -receptor stimulation, Acta Physiol (Oxf) 227 (2019). https://doi.org/10.1111/apha.13280.

[395] T. Kawai, S.J. Forrester, S. O'Brien, A. Baggett, V. Rizzo, S. Eguchi, AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system, Pharmacol Res 125 (2017) 4–13. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.008.

[396] C. Demers, A. Mody, K.K. Teo, R.S. McKelvie, ACE inhibitors in heart failure: what more do we need to know?, Am J Cardiovasc Drugs 5 (2005) 351–9. https://doi.org/10.2165/00129784-200505060-00002.

[397] S.A. Nicklin, A Novel Mechanism of Action for Angiotensin-(1–7) via the Angiotensin Type 1 Receptor, Hypertension 68 (2016) 1342–1343. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08215.

[398] D. de Farias Lelis, D.F. de Freitas, A. Souto Machado, T. Soares Crespo, S.H. Sousa Santos, Angiotensin-(1-7), Adipokines and Inflammation, Metabolism 95 (2019) 36–45. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.03.006.

[399] K. Kuwahara, The natriuretic peptide system in heart failure: Diagnostic and therapeutic implications, Pharmacol Ther 227 (2021) 107863. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107863.

[400] A.J. de Bold, H.B. Borenstein, A.T. Veress, H. Sonnenberg, A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats, Life Sci 28 (1981) 89–94. https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90370-2.

[401] H. Tsutsui, N.M. Albert, A.J.S. Coats, S.D. Anker, A. Bayes-Genis, J. Butler, et al., Natriuretic peptides: role in the diagnosis and management of heart failure: a scientific statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Heart Failure Society of America and Japanese Heart Failure Society, Eur J Heart Fail 25 (2023) 616–631. https://doi.org/10.1002/ejhf.2848.

[402] T. Sudoh, K. Maekawa, M. Kojima, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide, Biochem Biophys Res Commun 159 (1989) 1427–1434. https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92269-9.

[403] T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, C-Type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain, Biochem Biophys Res Commun 168 (1990) 863–870. https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92401-K.

[404] S.J. Sangaralingham, M. Kuhn, V. Cannone, H.H. Chen, J.C. Burnett, Natriuretic peptide pathways in heart failure: further therapeutic possibilities, Cardiovasc Res 118 (2023) 3416–3433. https://doi.org/10.1093/cvr/cvac125.

[405] J.P. Goetze, B.G. Bruneau, H.R. Ramos, T. Ogawa, M.K. de Bold, A.J. de Bold, Cardiac natriuretic peptides, Nat Rev Cardiol 17 (2020) 698–717. https://doi.org/10.1038/s41569-020-0381-0.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[406] A.T. Bekele, Natriuretic Peptide Receptors (NPRs) as a Potential Target for the Treatment of Heart Failure, Curr Heart Fail Rep 20 (2023) 429–440. https://doi.org/10.1007/s11897-023-00628-8.

[407] H. Tsutsui, S. Momomura, Y. Saito, H. Ito, K. Yamamoto, T. Ohishi, N. Okino, W. Guo, Efficacy and safety of sacubitril/valsartan (LCZ696) in Japanese patients with chronic heart failure and reduced ejection fraction: Rationale for and design of the randomized, double-blind PARALLEL-HF study, J Cardiol 70 (2017) 225–231. https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.11.011.

[408] H. Fish-Trotter, J.F. Ferguson, N. Patel, P. Arora, N.B. Allen, K.N. Bachmann, et al.. Gupta, Inflammation and Circulating Natriuretic Peptide Levels, Circ Heart Fail 13 (2020). https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006570.

[409] X. Chen, X. Li, X. Wu, Y. Ding, Y. Li, G. Zhou, et al., Integrin beta-like 1 mediates fibroblast–cardiomyocyte crosstalk to promote cardiac fibrosis and hypertrophy, Cardiovasc Res 119 (2023) 1928–1941. https://doi.org/10.1093/cvr/cvad104.

[410] W.J. Paulus, M.R. Zile, From Systemic Inflammation to Myocardial Fibrosis, Circ Res 128 (2021) 1451–1467. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318159.

[411] G.G. Schiattarella, D. Rodolico, J.A. Hill, Metabolic inflammation in heart failure with preserved ejection fraction, Cardiovasc Res 117 (2021) 423–434. https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa217.

[412] J.J. Park, Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Heart Failure in Diabetes, Diabetes Metab J 45 (2021) 146–157. https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0282.

[413] C. Li, D. Qin, J. Hu, Y. Yang, D. Hu, B. Yu, Inflamed adipose tissue: A culprit underlying obesity and heart failure with preserved ejection fraction, Front Immunol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.947147.

[414] S.J. Shah, D.W. Kitzman, B.A. Borlaug, L. van Heerebeek, M.R. Zile, D.A. Kass, W.J. Paulus, Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circulation 134 (2016) 73–90. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021884.

[415] I. Cuijpers, S.J. Simmonds, M. van Bilsen, E. Czarnowska, A. González Miqueo, S. Heymans, et al., Microvascular and lymphatic dysfunction in HFpEF and its associated comorbidities, Basic Res Cardiol 115 (2020) 39. https://doi.org/10.1007/s00395-020-0798-y.

[416] A.K. Vidanapathirana, P.J. Psaltis, C.A. Bursill, A.D. Abell, S.J. Nicholls, Cardiovascular bioimaging of nitric oxide: Achievements, challenges, and the future, Med Res Rev 41 (2021) 435–463. https://doi.org/10.1002/med.21736.

[417] M.E. Arayici, H. Gunes, H. Ellidokuz, M.B. Yilmaz, The efficacy and safety of soluble guanylate cyclase modulation in patients with heart failure: a comprehensive

meta-analysis of randomized controlled trials, Sci Rep 14 (2024) 6987. https://doi.org/10.1038/s41598-024-57695-7.

[418] P. Sandner, M. Follmann, E. Becker-Pelster, M.G. Hahn, C. Meier, C. Freitaset al., Soluble GC stimulators and activators: Past, present and future, Br J Pharmacol (2021). https://doi.org/10.1111/bph.15698.

[419] F. Hofmann, A concise discussion of the regulatory role of cGMP kinase I in cardiac physiology and pathology, Basic Res Cardiol 113 (2018) 31. https://doi.org/10.1007/s00395-018-0690-1.

[420] M. Emdin, A. Aimo, V. Castiglione, G. Vergaro, G. Georgiopoulos, L.F. Saccaro, et al., Targeting Cyclic Guanosine Monophosphate to Treat Heart Failure, J Am Coll Cardiol 76 (2020) 1795–1807. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.031.

[421] J.R. Kraehling, W.C. Sessa, Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide–cGMP Pathway in Cardiovascular Disease, Circ Res 120 (2017) 1174–1182. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.303776.

[422] N.S. Chandel, Glycolysis, Cold Spring Harb Perspect Biol 13 (2021) a040535. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535.

[423] J.L. Merritt, E. MacLeod, A. Jurecka, B. Hainline, Clinical manifestations and management of fatty acid oxidation disorders, Rev Endocr Metab Disord 21 (2020) 479–493. https://doi.org/10.1007/s11154-020-09568-3.

[424] B. Schwartz, P. Gjini, D.M. Gopal, J.L. Fetterman, Inefficient Batteries in Heart Failure, JACC Basic Transl Sci 7 (2022) 1161–1179. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.03.017.

[425] A.A. Kumar, D.P. Kelly, J.A. Chirinos, Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circulation 139 (2019) 1435–1450. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036259.

[426] Q. Sun, B. Güven, C.S. Wagg, A. Almeida de Oliveira, H. Silver, L. Zhang, Bet al., Mitochondrial fatty acid oxidation is the major source of cardiac adenosine triphosphate production in heart failure with preserved ejection fraction, Cardiovasc Res 120 (2024) 360–371. https://doi.org/10.1093/cvr/cvae006.

[427] D. Tong, G.G. Schiattarella, N. Jiang, F. Altamirano, P.A. Szweda, A. Elnwasany, et al., NAD+ Repletion Reverses Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circ Res 128 (2021) 1629–1641. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317046.

[428] V.S. Hahn, C. Petucci, M.-S. Kim, K.C. Bedi, H. Wang, S. Mishra, et al., Myocardial Metabolomics of Human Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circulation 147 (2023) 1147–1161. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061846.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[429] Y. Deng, M. Xie, Q. Li, X. Xu, W. Ou, Y. Zhang, et al., Targeting Mitochondria-Inflammation Circuit by β-Hydroxybutyrate Mitigates HFpEF, Circ Res 128 (2021) 232–245. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317933.

[430] L. Zhang, J.S. Jaswal, J.R. Ussher, S. Sankaralingam, C. Wagg, M. Zaugg, et al., Cardiac Insulin-Resistance and Decreased Mitochondrial Energy Production Precede the Development of Systolic Heart Failure After Pressure-Overload Hypertrophy, Circ Heart Fail 6 (2013) 1039–1048. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000228.

[431] M. Paillard, G. Csordás, G. Szanda, T. Golenár, V. Debattisti, A. Bartok, N, et al., Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca2+ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU, Cell Rep 18 (2017) 2291–2300. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.032.

[432] L. Boyman, M. Karbowski, W.J. Lederer, Regulation of Mitochondrial ATP Production: Ca2+ Signaling and Quality Control, Trends Mol Med 26 (2020) 21–39. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.007.

[433] J.S. Harrington, S.W. Ryter, M. Plataki, D.R. Price, A.M.K. Choi, Mitochondria in health, disease, and aging, Physiol Rev 103 (2023) 2349–2422. https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2021.

[434] M. Paillard, K.-T. Huang, D. Weaver, J.P. Lambert, J.W. Elrod, G. Hajnóczky, Altered composition of the mitochondrial Ca2+uniporter in the failing human heart, Cell Calcium 105 (2022) 102618. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102618.

[435] A. Weiser, A. Hermant, F. Bermont, F. Sizzano, S. Karaz, P. Alvarez-Illera, et al., The mitochondrial calcium uniporter (MCU) activates mitochondrial respiration and enhances mobility by regulating mitochondrial redox state, Redox Biol 64 (2023) 102759. https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102759.

[436] J. Wang, J. Jiang, H. Hu, L. Chen, MCU complex: Exploring emerging targets and mechanisms of mitochondrial physiology and pathology, J Adv Res (2024). https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.02.013.

[437] H.E. Billingsley, S.L. Hummel, S. Carbone, The role of diet and nutrition in heart failure: A state-of-the-art narrative review, Prog Cardiovasc Dis 63 (2020) 538–551. https://doi.org/10.1016/j.pcad.2020.08.004.

[438] M. Aggarwal, B. Bozkurt, G. Panjrath, B. Aggarwal, R.J. Ostfeld, N.D. Barnard, et al., Lifestyle Modifications for Preventing and Treating Heart Failure, J Am Coll Cardiol 72 (2018) 2391–2405. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.08.2160.

[439] K. Omote, F.H. Verbrugge, B.A. Borlaug, Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Mechanisms and Treatment Strategies, Annu Rev Med 73 (2022) 321–337. https://doi.org/10.1146/annurev-med-042220-022745.

[440] W. Mullens, J. Dauw, F. Gustafsson, A. Mebazaa, J. Steffel, K.K. Witte, et al., Integration of implantable device therapy in patients with heart failure. A clinical

consensus statement from the Heart Failure Association (HFA) and European Heart Rhythm Association (EHRA) of the European Society of Cardiology (ESC), Eur J Heart Fail 26 (2024) 483–501. https://doi.org/10.1002/ejhf.3150.

[441] C. Elsner, S. Bettin, R. Tilz, D. Häckl, Economic Considerations of Cardiovascular Implantable Electronic Devices for The Treatment of Heart Failure, Curr Heart Fail Rep 21 (2024) 186–193. https://doi.org/10.1007/s11897-024-00664-y.

[442] T.C. Tan, A.P. Sindone, A.R. Denniss, Cardiac Electronic Implantable Devices in the Treatment of Heart Failure, Heart Lung Circ 21 (2012) 338–351. https://doi.org/10.1016/j.hlc.2012.03.124.

[443] M.E. Afari, W. Syed, L. Tsao, Implantable devices for heart failure monitoring and therapy, Heart Fail Rev 23 (2018) 935–944. https://doi.org/10.1007/s10741-018-9687-y.

[444] P. Vaz-Salvador, R. Adão, I. Vasconcelos, A.F. Leite-Moreira, C. Brás-Silva, Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a Pharmacotherapeutic Update, Cardiovasc Drugs Ther 37 (2023) 815–832. https://doi.org/10.1007/s10557-021-07306-8.

[445] S.P. Murphy, N.E. Ibrahim, J.L. Januzzi, Heart Failure With Reduced Ejection Fraction, JAMA 324 (2020) 488. https://doi.org/10.1001/jama.2020.10262.

[446] L. Shen, P.S. Jhund, K.F. Docherty, M. Vaduganathan, M.C. Petrie, A.S. Desai, et al., Accelerated and personalized therapy for heart failure with reduced ejection fraction, Eur Heart J 43 (2022) 2573–2587. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac210.

[447] J.P. Graffagnino, L.C. Avant, B.C. Calkins, K.M. Swetz, Home Therapies in Advanced Heart Failure: Inotropes and Diuretics, Curr Heart Fail Rep 17 (2020) 314–323. https://doi.org/10.1007/s11897-020-00482-y.

[448] W. Mullens, K. Damman, V. Harjola, A. Mebazaa, H. Brunner-La Rocca, P. Martens, et al., The use of diuretics in heart failure with congestion — a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Eur J Heart Fail 21 (2019) 137–155. https://doi.org/10.1002/ejhf.1369.

[449] J. Núñez, R. de la Espriella, P. Rossignol, A.A. Voors, W. Mullens, M. Metra, et al. Congestion in heart failure: a circulating biomarker-based perspective. A review from the Biomarkers Working Group of the Heart Failure Association, European Society of Cardiology, Eur J Heart Fail 24 (2022) 1751–1766. https://doi.org/10.1002/ejhf.2664.

[450] D.H. Ellison, Clinical Pharmacology in Diuretic Use, Clin J Am Soc Nephrol 14 (2019) 1248–1257. https://doi.org/10.2215/CJN.09630818.

[451] R. Minutolo, L. De Nicola, F. Mallamaci, C. Zoccali, Thiazide diuretics are back in CKD: the case of chlorthalidone, Clin Kidney J 16 (2023) 41–51. https://doi.org/10.1093/ckj/sfac198.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[452] E. Oliver, F. Mayor Jr, P. D'Ocon, Beta-blockers: Historical Perspective and Mechanisms of Action, Rev Esp Cardiol (Engl Ed) 72 (2019) 853–862. https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.04.006.

[453] M.D. Flather, N.D. Gollop, Understanding Mechanisms of Action of Beta-Blockers in Heart Failure With Reduced and Preserved Ejection Fraction, JACC Heart Fail 4 (2016) 150–151. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2015.12.009.

[454] J. Martínez-Milla, S. Raposeiras-Roubín, D.A. Pascual-Figal, B. Ibáñez, Role of Beta-blockers in Cardiovascular Disease in 2019, Rev Esp Cardiol (Engl Ed) 72 (2019) 844–852. https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.04.014.

[455] A. Peikert, B.A. Bart, M. Vaduganathan, B.L. Claggett, I.J. Kulac, M.N. Kosiborod, et al., Contemporary Use and Implications of Beta-Blockers in Patients With HFmrEF or HFpEF, JACC Heart Fail 12 (2024) 631–644. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2023.09.007.

[456] S. V. Arnold, D.N. Silverman, K. Gosch, M.E. Nassif, M. Infeld, S. Litwin, et al., Beta-Blocker Use and Heart Failure Outcomes in Mildly Reduced and Preserved Ejection Fraction, JACC Heart Fail 11 (2023) 893–900. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2023.03.017.

[457] L.H. Lund, L. Benson, U. Dahlström, M. Edner, L. Friberg, Association Between Use of β-Blockers and Outcomes in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction, JAMA 312 (2014) 2008. https://doi.org/10.1001/jama.2014.15241.

[458] T. Tsujimoto, H. Kajio, Beta-blocker use and cardiovascular event risk in patients with heart failure with preserved ejection fraction, Sci Rep 8 (2018) 9556. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27799-y.

[459] N. Martin, K. Manoharan, J. Thomas, C. Davies, R.T. Lumbers, Beta-blockers and inhibitors of the renin-angiotensin aldosterone system for chronic heart failure with preserved ejection fraction, Cochrane Database Syst Rev (2018). https://doi.org/10.1002/14651858.CD012721.pub2.

[460] A. Selim, R. Zolty, Y.S. Chatzizisis, The evolution of heart failure with reduced ejection fraction pharmacotherapy: What do we have and where are we going?, Pharmacol Ther 178 (2017) 67–82. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.011.

[461] C.C. Lang, A.D. Struthers, Targeting the renin–angiotensin–aldosterone system in heart failure, Nat Rev Cardiol 10 (2013) 125–134. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.196.

[462] L.M. Vaquero Roncero, D. Sánchez Poveda, J.J. Valdunciel García, M.E. Sánchez Barrado, J.M. Calvo Vecino, Perioperative use of angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists., J Clin Anesth 40 (2017) 91–98. https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2017.04.018.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[463] M. Lam, A. Beqo, R. Thumar, Overcoming Cough and Angioedema: Advocating for the Use of ARBs Over ACE Inhibitors, Ann Pharmacother 56 (2022) 358–362. https://doi.org/10.1177/10600280211029952.

[464] L.L. Herman; S.A. Padala; I. Ahmed; K. Bashir, StatPearls, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors (ACEI), 2024. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431051/ (Acesso el 17 de juno del 2024).

[465] J.N. Cohn, G. Tognoni, A Randomized Trial of the Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure, N Engl J Med 345 (2001) 1667–1675. https://doi.org/10.1056/NEJMoa010713.

[466] L.H. Lindholm, H. Ibsen, B. Dahlöf, R.B. Devereux, G. Beevers, U. de Faire, et al., Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol, Lancet 359 (2002) 1004–1010. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08090-X.

[467] J.J. McMurray, J. Östergren, K. Swedberg, C.B. Granger, P. Held, E.L. Michelson, et al., Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial, Lancet 362 (2003) 767–771. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14283-3.

[468] J.W. Cunningham, M. Vaduganathan, B.L. Claggett, J.E. John, A.S. Desai, E.F. Lewis, et al., Myocardial Infarction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Pooled Analysis of 3 Clinical Trials, JACC Heart Fail 8 (2020) 618–626. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2020.02.007.

[469] B.S. Heran, V.M. Musini, K. Bassett, R.S. Taylor, J.M. Wright, Angiotensin receptor blockers for heart failure, Cochrane Database Syst Rev 2021 (2012). https://doi.org/10.1002/14651858.CD003040.pub2.

[470] U. Kintscher, F. Edelmann, The non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone and heart failure with preserved ejection fraction, Cardiovasc Diabetol 22 (2023) 162. https://doi.org/10.1186/s12933-023-01899-0.

[471] B. Pitt, M.A. Pfeffer, S.F. Assmann, R. Boineau, I.S. Anand, B. Claggett, et al., Spironolactone for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction, N Engl J Med 370 (2014) 1383–1392. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313731.

[472] F. Edelmann, R. Wachter, A.G. Schmidt, E. Kraigher-Krainer, C. Colantonio, W. Kamke, et al., Effect of Spironolactone on Diastolic Function and Exercise Capacity in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JAMA 309 (2013) 781. https://doi.org/10.1001/jama.2013.905.

[473] J.B. Cohen, S.J. Schrauben, L. Zhao, M.D. Basso, M.E. Cvijic, Z. Li, M. Yarde, et al., Clinical Phenogroups in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JACC Heart Fail 8 (2020) 172–184. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2019.09.009.

USC DE COMPOSTELA

[474] D.L. Bhatt, M. Szarek, P.G. Steg, C.P. Cannon, L.A. Leiter, D.K. McGuire, et al., Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Recent Worsening Heart Failure, N Engl J Med 384 (2021) 117–128. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030183.

[475] R. Mollace, F. Scarano, I. Bava, C. Carresi, J. Maiuolo, A. Tavernese, et al., Modulation of the nitric oxide/cGMP pathway in cardiac contraction and relaxation: Potential role in heart failure treatment, Pharmacol Res 196 (2023) 106931. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106931.

[476] P. Sandner, A. Vakalopoulos, M.G. Hahn, J.P. Stasch, M. Follmann, Soluble guanylate cyclase stimulators and their potential use: a patent review, Expert Opin Ther Pat 31 (2021) 203–222. https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1866538.

[477] M. Follmann, J. Ackerstaff, G. Redlich, F. Wunder, D. Lang, A. Kern, et al., Discovery of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Vericiguat (BAY 1021189) for the Treatment of Chronic Heart Failure, J Med Chem 60 (2017) 5146–5161. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00449.

[478] J.P. Stasch, P. Pacher, O. V. Evgenov, Soluble Guanylate Cyclase as an Emerging Therapeutic Target in Cardiopulmonary Disease, Circulation 123 (2011) 2263–2273. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981738.

[479] P.W. Armstrong, B. Pieske, K.J. Anstrom, J. Ezekowitz, A.F. Hernandez, J. Butler, et al., Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction, N Engl J Med 382 (2020) 1883–1893. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915928.

[480] A. Markham, S. Duggan, Vericiguat: First Approval, Drugs 81 (2021) 721–726. https://doi.org/10.1007/s40265-021-01496-z.

[481] B. Pieske, A.P. Maggioni, C.S.P. Lam, E. Pieske-Kraigher, G. Filippatos, J. Butler, et al., Vericiguat in patients with worsening chronic heart failure and preserved ejection fraction: results of the SOluble guanylate Cyclase stimulatoR in heArT failurE patientS with PRESERVED EF (SOCRATES-PRESERVED) study, Eur Heart J 38 (2017) 1119–1127. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw593.

[482] P.W. Armstrong, C.S.P. Lam, K.J. Anstrom, J. Ezekowitz, A.F. Hernandez, C.M. O'Connor, et al., Effect of Vericiguat vs Placebo on Quality of Life in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction, JAMA 324 (2020) 1512. https://doi.org/10.1001/jama.2020.15922.

[483] J. Sun, W. Xu, H. Hua, Y. Xiao, X. Chen, Z. Gao, et al., Pharmacodynamic and pharmacokinetic effects of S086, a novel angiotensin receptor neprilysin inhibitor, Biomed Pharmacother 129 (2020) 110410. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110410.

[484] Food and Drug Administration, ENTRESTO (sacubitril/valsartan) Tablets. Approval Letter, (2015). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/207620Orig1s000Approv.pdf (Acceso el 24 de junio del 2024).

[485] NOVARTIS, Novartis Entresto® granted expanded indication in chronic heart failure by FDA, (2021). https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-entresto-granted-expanded-indication-chronic-heart-failure-fda (Acceso el 24 de junio del 2024).

[486] H.R. Black, J. Bailey, D. Zappe, R. Samuel, Valsartan: more than a decade of experience, Drugs 69 (2009) 2393–2414. https://doi.org/10.2165/11319460-000000000-00000.

[487] J.S.S. Singh, L.M. Burrell, M. Cherif, I.B. Squire, A.L. Clark, C.C. Lang, Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides, Heart 103 (2017) 1569–1577. https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311295.

[488] J. Shi, X. Wang, J. Nguyen, A.H. Wu, B.E. Bleske, H.J. Zhu, Sacubitril Is Selectively Activated by Carboxylesterase 1 (CES1) in the Liver and the Activation Is Affected by CES1 Genetic Variation, Drug Metab Dispos 44 (2016) 554–559. https://doi.org/10.1124/dmd.115.068536.

[489] Novartis Europharm Limited, Entresto®. Ficha técnica o resumen de las características del producto. https://www.ema.europa.eu/es/documents/product-information/entresto-epar-product-information_es.pdf (Acceso el 24 de junio del 2024).

[490] S. Ayalasomayajula, T. Langenickel, P. Pal, S. Boggarapu, G. Sunkara, Clinical Pharmacokinetics of Sacubitril/Valsartan (LCZ696): A Novel Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitor, Clin Pharmacokinet 56 (2017) 1461–1478. https://doi.org/10.1007/s40262-017-0543-3.

[491] J.J.V. McMurray, M. Packer, A.S. Desai, J. Gong, M.P. Lefkowitz, A.R. Rizkala, et al., Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact, Eur J Heart Fail 15 (2013) 1062–1073. https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft052.

[492] S.D. Solomon, M. Zile, B. Pieske, A. Voors, A. Shah, E. Kraigher-Krainer, et al., The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial, Lancet 380 (2012) 1387–1395. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61227-6.

[493] J.J.V. McMurray, M. Packer, A.S. Desai, J. Gong, M.P. Lefkowitz, A.R. Rizkala, et al., Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure, N Engl J Med 371 (2014) 993–1004. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409077.

[494] J.J. V. McMurray, M. Packer, A.S. Desai, J. Gong, M. Lefkowitz, A.R. Rizkala, et al., Baseline characteristics and treatment of patients in Prospective comparison of ARNI with ACI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF), Eur J Heart Fail 16 (2014) 817–825. https://doi.org/10.1002/ejhf.115.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[495] S.A. Hubers, N.J. Brown, Combined Angiotensin Receptor Antagonism and Neprilysin Inhibition, Circulation 133 (2016) 1115–1124. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018622.

[496] A.S. Bhatt, M. Vaduganathan, B.L. Claggett, G.C. Fonarow, M. Packer, M.A. Pfeffer, et al., Health and Economic Evaluation of Sacubitril-Valsartan for Heart Failure Management, JAMA Cardiol 8 (2023) 1041. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2023.3216.

[497] C.S.P. Lam, S.D. Solomon, Classification of Heart Failure According to Ejection Fraction: JACC Review Topic of the Week, J Am Coll Cardiol 77 (2021) 3217–3225. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.04.070.

[498] H. Tsutsui, S. Momomura, Y. Saito, H. Ito, K. Yamamoto, Y. Sakata, et al., Efficacy and Safety of Sacubitril/Valsartan in Japanese Patients With Chronic Heart Failure and Reduced Ejection Fraction ― Results From the PARALLEL-HF Study ―, Circ J 85 (2021) 584–594. https://doi.org/10.1253/circj.CJ-20-0854.

[499] D. Pascual-Figal, R. Wachter, M. Senni, J. Belohlavek, A. Noè, D. Carr, et al., Rationale and design of TRANSITION: a randomized trial of pre-discharge vs. post-discharge initiation of sacubitril/valsartan, ESC Heart Fail 5 (2018) 327–336. https://doi.org/10.1002/ehf2.12246.

[500] R. Wachter, M. Senni, J. Belohlavek, E. Straburzynska-Migaj, K.K. Witte, Z. Kobalava, et al., Initiation of sacubitril/valsartan in haemodynamically stabilised heart failure patients in hospital or early after discharge: primary results of the randomised TRANSITION study, Eur J Heart Fail 21 (2019) 998–1007. https://doi.org/10.1002/ejhf.1498.

[501] E.J. Velazquez, D.A. Morrow, A.D. DeVore, A.P. Ambrosy, C.I. Duffy, K. McCague, et al., Rationale and design of the comParIson Of sacubitril/valsartaN versus Enalapril on Effect on nt-pRo-bnp in patients stabilized from an acute Heart Failure episode (PIONEER-HF) trial, Am Heart J 198 (2018) 145–151. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2018.01.004.

[502] E.J. Velazquez, D.A. Morrow, A.D. DeVore, C.I. Duffy, A.P. Ambrosy, K. McCague, et al., Angiotensin–Neprilysin Inhibition in Acute Decompensated Heart Failure, N Engl J Med 380 (2019) 539–548. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812851.

[503] M. Halle, C. Schöbel, E.B. Winzer, P. Bernhardt, S. Mueller, C. Sieder, et al., A randomized clinical trial on the short-term effects of 12-week sacubitril/valsartan vs. enalapril on peak oxygen consumption in patients with heart failure with reduced ejection fraction: results from the ACTIVITY-HF study, Eur J Heart Fail 23 (2021) 2073–2082. https://doi.org/10.1002/ejhf.2355.

[504] A.S. Desai, S.D. Solomon, A.M. Shah, B.L. Claggett, J.C. Fang, J. Izzo, et al., Effect of Sacubitril-Valsartan vs Enalapril on Aortic Stiffness in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction, JAMA 322 (2019) 1077. https://doi.org/10.1001/jama.2019.12843.

[505] R.M. Khandwalla, D. Grant, K. Birkeland, J.T. Heywood, E. Fombu, R.L. Owens, et al., The AWAKE-HF Study: Sacubitril/Valsartan Impact on Daily Physical Activity and Sleep in Heart Failure, Am J Cardiovasc Drugs 21 (2021) 241–254. https://doi.org/10.1007/s40256-020-00440-y.

[506] M.F. Piepoli, R.I. Hussain, J. Comin-Colet, R. Dosantos, P. Ferber, T. Jaarsma, et al., OUTSTEP-HF: randomised controlled trial comparing short-term effects of sacubitril/valsartan versus enalapril on daily physical activity in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction, Eur J Heart Fail 23 (2021) 127–135. https://doi.org/10.1002/ejhf.2076.

[507] F. Edelmann, T. Jaarsma, J. Comin-Colet, J. Schorr, L. Ecochard, R.I. Hussain, et al., Rationale and study design of OUTSTEP-HF: a randomised controlled study to assess the effect of sacubitril/valsartan and enalapril on physical activity measured by accelerometry in patients with heart failure with reduced ejection fraction, Eur J Heart Fail 22 (2020) 1724–1733. https://doi.org/10.1002/ejhf.1919.

[508] D.L. Mann, M.M. Givertz, J.M. Vader, R.C. Starling, P. Shah, S.E. McNulty, et al., Effect of Treatment With Sacubitril/Valsartan in Patients With Advanced Heart Failure and Reduced Ejection Fraction, JAMA Cardiol 7 (2022) 17. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.4567.

[509] D.L. Mann, S.J. Greene, M.M. Givertz, J.M. Vader, R.C. Starling, A.P. Ambrosy, et al., Sacubitril/Valsartan in Advanced Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: Rationale and Design of the LIFE Trial, JACC Heart Fail 8 (2020) 789–799. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2020.05.005.

[510] M.R. dos Santos, M.J. de N. Nunes Alves, C.P. Jordão, C.E. Novaes Pinto, K.T. Souza Correa, F.Ribeiro de Souza, et al., Sacubitril/valsartan versus enalapril on exercise capacity in patients with heart failure with reduced ejection fraction: A randomized, double-blind, active-controlled study, Am Heart J 239 (2021) 1–10. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2021.05.005.

[511] S.D. Solomon, A.R. Rizkala, M.P. Lefkowitz, V.C. Shi, J. Gong, N. Anavekar, et al., Baseline Characteristics of Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction in the PARAGON-HF Trial, Circ Heart Fail 11 (2018). https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.004962.

[512] S.D. Solomon, A.R. Rizkala, J. Gong, W. Wang, I.S. Anand, J. Ge, et al., Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JACC Heart Fail 5 (2017) 471–482. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.04.013.

[513] S.D. Solomon, J.J.V. McMurray, I.S. Anand, J. Ge, C.S.P. Lam, A.P. Maggioni, et al., Angiotensin–Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction, N Engl J Med 381 (2019) 1609–1620. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908655.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[514] M. Ledwidge, J.D. Dodd, F. Ryan, C. Sweeney, K. McDonald, R. Fox, et al., Effect of Sacubitril/Valsartan vs Valsartan on Left Atrial Volume in Patients With Pre–Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JAMA Cardiol 8 (2023) 366. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2023.0065.

[515] R. Wachter, S.J. Shah, M.R. Cowie, P. Szecsödy, V. Shi, G. Ibram, et al., Angiotensin receptor neprilysin inhibition versus individualized RAAS blockade: design and rationale of the PARALLAX trial, ESC Heart Fail 7 (2020) 856–864. https://doi.org/10.1002/ehf2.12694.

[516] S.J. Shah, M.R. Cowie, R. Wachter, P. Szecsödy, V. Shi, G. Ibram, et al., Baseline characteristics of patients in the PARALLAX trial: insights into quality of life and exercise capacity in heart failure with preserved ejection fraction, Eur J Heart Fail 23 (2021) 1541–1551. https://doi.org/10.1002/ejhf.2277.

[517] R.J. Mentz, J.H. Ward, A.F. Hernandez, S. Lepage, D.A. Morrow, S. Sarwat, et al., Rationale, Design and Baseline Characteristics of the PARAGLIDE-HF Trial: Sacubitril/Valsartan vs Valsartan in HFmrEF and HFpEF With a Worsening Heart Failure Event, J Card Fail 29 (2023) 922–930. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2023.02.001.

[518] R.J. Mentz, J.H. Ward, A.F. Hernandez, S. Lepage, D.A. Morrow, S. Sarwat, et al., Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Patients With Mildly Reduced or Preserved Ejection Fraction and Worsening Heart Failure, J Am Coll Cardiol 82 (2023) 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.04.019.

[519] Y. Wang, R. Zhou, C. Lu, Q. Chen, T. Xu, D. Li, Effects of the Angiotensin-Receptor Neprilysin Inhibitor on Cardiac Reverse Remodeling: Meta-Analysis, J Am Heart Assoc 8 (2019). https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012272.

[520] J.L. Januzzi, M.F. Prescott, J. Butler, G.M. Felker, A.S. Maisel, K. McCague, et al., Association of Change in N-Terminal Pro–B-Type Natriuretic Peptide Following Initiation of Sacubitril-Valsartan Treatment With Cardiac Structure and Function in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction, JAMA 322 (2019) 1085. https://doi.org/10.1001/jama.2019.12821.

[521] Y.J. Shi, C.G. Yang, W.B. Qiao, Y.C. Liu, S.Y. Liu, G.J. Dong, Sacubitril/valsartan attenuates myocardial inflammation, hypertrophy, and fibrosis in rats with heart failure with preserved ejection fraction, Eur J Pharmacol 961 (2023) 176170. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176170.

[522] A.R. Aroor, S. Mummidi, J.C. Lopez-Alvarenga, N. Das, J. Habibi, G. Jia, et al., Sacubitril/valsartan inhibits obesity-associated diastolic dysfunction through suppression of ventricular-vascular stiffness, Cardiovasc Diabetol 20 (2021) 80. https://doi.org/10.1186/s12933-021-01270-1.

[523] E. Vaskova, G. Ikeda, Y. Tada, C. Wahlquist, M. Mercola, P.C. Yang, Sacubitril/Valsartan Improves Cardiac Function and Decreases Myocardial Fibrosis Via

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Downregulation of Exosomal miR-181a in a Rodent Chronic Myocardial Infarction Model, J Am Heart Assoc 9 (2020). https://doi.org/10.1161/JAHA.119.015640.

[524] A. Schauer, V. Adams, A. Augstein, A. Jannasch, R. Draskowski, V. Kirchhoff, et al., Sacubitril/Valsartan Improves Diastolic Function But Not Skeletal Muscle Function in a Rat Model of HFpEF, Int J Mol Sci 22 (2021) 3570. https://doi.org/10.3390/ijms22073570.

[525] D. Martínez-Falguera, J. Aranyó, A. Teis, G. Ferrer-Curriu, M. Monguió-Tortajada, E. Fadeuilhe, et al., Antiarrhythmic and Anti-Inflammatory Effects of Sacubitril/Valsartan on Post-Myocardial Infarction Scar, Circ Arrhythm Electrophysiol 17 (2024). https://doi.org/10.1161/CIRCEP.123.012517.

[526] J. Ai, Z. Shuai, K. Tang, Z. Li, L. Zou, M. Liu, Sacubitril/valsartan alleviates myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats, Hellenic J Cardiol 62 (2021) 389–391. https://doi.org/10.1016/j.hjc.2021.04.004.

[527] M. Wu, Y. Guo, Y. Wu, K. Xu, L. Lin, Protective Effects of Sacubitril/Valsartan on Cardiac Fibrosis and Function in Rats With Experimental Myocardial Infarction Involves Inhibition of Collagen Synthesis by Myocardial Fibroblasts Through Downregulating TGF-β1/Smads Pathway, Front Pharmacol 12 (2021). https://doi.org/10.3389/fphar.2021.696472.

[528] J. Liu, X. Zheng, C. Zhang, C. Zhang, P. Bu, Lcz696 Alleviates Myocardial Fibrosis After Myocardial Infarction Through the sFRP-1/Wnt/β-Catenin Signaling Pathway, Front Pharmacol 12 (2021). https://doi.org/10.3389/fphar.2021.724147.

[529] N.H. Mustafa, J. Jalil, S. Zainalabidin, M.S.M. Saleh, A.Y. Asmadi, Y. Kamisah, Molecular mechanisms of sacubitril/valsartan in cardiac remodeling, Front Pharmacol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fphar.2022.892460.

[530] M.R. Zile, E. O'Meara, B. Claggett, M.F. Prescott, S.D. Solomon, K. Swedberg, et al., Effects of Sacubitril/Valsartan on Biomarkers of Extracellular Matrix Regulation in Patients With HFrEF, J Am Coll Cardiol 73 (2019) 795–806. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.042.

[531] F. Zannad, J.P. Ferreira, Is Sacubitril/Valsartan Antifibrotic?, J Am Coll Cardiol 73 (2019) 807–809. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.041.

[532] Y. Li, L. Kang, K. Rong, Y. Zhang, Y. Suo, M. Yuan, et al., Renal protective effects and mechanisms of the angiotensin receptor-neprilysin inhibitor LCZ696 in mice with cardiorenal syndrome, Life Sci 280 (2021) 119692. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119692.

[533] W. Jing, N.D. Vaziri, A. Nunes, Y. Suematsu, T. Farzaneh, M. Khazaeli, et al., LCZ696 (Sacubitril/valsartan) ameliorates oxidative stress, inflammation, fibrosis and improves renal function beyond angiotensin receptor blockade in CKD., Am J Transl Res 9 (2017) 5473–5484.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[534] J. Ding, S. Cui, S.Y. Li, L.Y. Cui, Q.Y. Nan, X.J. Lin, et al., The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates renal fibrosis via ASK1/JNK/p38 MAPK-mediated apoptosis in unilateral ureteral obstruction, PLoS One 18 (2023) e0286903. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286903.

[535] D. Croteau, F. Qin, J.M. Chambers, E. Kallick, I. Luptak, M. Panagia, et al., Differential Effects of Sacubitril/Valsartan on Diastolic Function in Mice With Obesity-Related Metabolic Heart Disease, JACC Basic Transl Sci 5 (2020) 916–927. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.07.006.

[536] T.G. von Lueder, B.H. Wang, A.R. Kompa, L. Huang, R. Webb, P. Jordaan, et al., Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor LCZ696 Attenuates Cardiac Remodeling and Dysfunction After Myocardial Infarction by Reducing Cardiac Fibrosis and Hypertrophy, Circ Heart Fail 8 (2015) 71–78. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001785.

[537] Y. Suematsu, W. Jing, A. Nunes, M.L. Kashyap, M. Khazaeli, N.D. Vaziri, et al., LCZ696 (Sacubitril/Valsartan), an Angiotensin-Receptor Neprilysin Inhibitor, Attenuates Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Vasculopathy in a Rat Model of Chronic Kidney Disease, J Card Fail 24 (2018) 266–275. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2017.12.010.

[538] H. Kusaka, D. Sueta, N. Koibuchi, Y. Hasegawa, T. Nakagawa, B. Lin, Het al., LCZ696, Angiotensin II Receptor-Neprilysin Inhibitor, Ameliorates High-Salt-Induced Hypertension and Cardiovascular Injury More Than Valsartan Alone, Am J Hypertens 28 (2015) 1409–1417. https://doi.org/10.1093/ajh/hpv015.

[539] Q. Li, Y. Fang, D. Peng, L. Li, C. Deng, H. Yang, et al., Sacubitril/valsartan reduces susceptibility to atrial fibrillation by improving atrial remodeling in spontaneously hypertensive rats, Eur J Pharmacol 952 (2023) 175754. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175754.

[540] S. Peng, X. Lu, Y. Qi, J. Li, J. Xu, T. Yuan, et al., LCZ696 Ameliorates Oxidative Stress and Pressure Overload-Induced Pathological Cardiac Remodeling by Regulating the Sirt3/MnSOD Pathway, Oxid Med Cell Longev 2020 (2020) 1–15. https://doi.org/10.1155/2020/9815039.

[541] K. Tam, D.A. Richards, M.J. Aronovitz, G.L. Martin, S. Pande, I.Z. Jaffe, et al., Sacubitril/Valsartan Improves Left Ventricular Function in Chronic Pressure Overload Independent of Intact Cyclic Guanosine Monophosphate-dependent Protein Kinase I Alpha Signaling, J Card Fail 26 (2020) 769–775. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2020.04.011.

[542] Z. Wu, H. Chen, L. Lin, J. Lu, Q. Zhao, Z. Dong, et al., Sacubitril/valsartan protects against arsenic trioxide induced cardiotoxicity in vivo and in vitro, Toxicol Res (Camb) 11 (2022) 451–459. https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAC018.

[543] R. Dankowski, W. Sacharczuk, A. Łojko-Dankowska, A. Nowicka, A. Szałek-Goralewska, A. Szyszka, Sacubitril/valsartan as first-line therapy in anthracycline-

induced cardiotoxicity, Kardiol Pol 79 (2021) 1040–1041. https://doi.org/10.33963/KP.a2021.0052.

[544] X. Liu, D. Li, W. Pi, B. Wang, S. Xu, L. Yu, et al., LCZ696 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis via AKT/SIRT3/SOD2 signaling pathway activation, Int Immunopharmacol 113 (2022) 109379. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109379.

[545] T. Miyoshi, K. Nakamura, N. Amioka, O.F. Hatipoglu, T. Yonezawa, Y. Saito, et al., LCZ696 ameliorates doxorubicin-induced cardiomyocyte toxicity in rats, Sci Rep 2022 12:1 12 (2022) 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-022-09094-z.

[546] Y. Xia, Z. Chen, A. Chen, M. Fu, Z. Dong, K. Hu, et al., LCZ696 improves cardiac function via alleviating Drp1-mediated mitochondrial dysfunction in mice with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy, J Mol Cell Cardiol 108 (2017) 138–148. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.06.003.

[547] V. Gregorietti, T.L. Fernandez, D. Costa, E.O. Chahla, A.J. Daniele, Use of Sacubitril/valsartan in patients with cardio toxicity and heart failure due to chemotherapy, Cardiooncology 6 (2020) 24. https://doi.org/10.1186/s40959-020-00078-4.

[548] M. Mohany, M.M. Ahmed, S.S. Al-Rejaie, The Role of NF-κB and Bax/Bcl-2/Caspase-3 Signaling Pathways in the Protective Effects of Sacubitril/Valsartan (Entresto) against HFD/STZ-Induced Diabetic Kidney Disease, Biomedicines 10 (2022) 2863. https://doi.org/10.3390/biomedicines10112863.

[549] M.O. Wijkman, B. Claggett, M. Vaduganathan, J.W. Cunningham, R. Rørth, A. Jackson, et al., Effects of sacubitril/valsartan on glycemia in patients with diabetes and heart failure: the PARAGON-HF and PARADIGM-HF trials, Cardiovasc Diabetol 21 (2022) 110. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01545-1.

[550] J. Jordan, R. Stinkens, T. Jax, S. Engeli, E. Blaak, M. May, et al, Improved Insulin Sensitivity With Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Individuals With Obesity and Hypertension, Clin Pharmacol Ther 101 (2017) 254–263. https://doi.org/10.1002/cpt.455.

[551] J.P. Seferovic, B. Claggett, S.B. Seidelmann, E.W. Seely, M. Packer, M.R. Zile, et al., Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial, Lancet Diabetes Endocrinol 5 (2017) 333–340. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30087-6.

[552] C. Kilkenny, W. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, D.G. Altman, Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines, Br J Pharmacol 160 (2010) 1577–1579. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[553] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed., 2011. https://doi.org/10.17226/12910.

[554] B. Martín-Carro, J. Donate-Correa, S. Fernández-Villabrille, J. Martín-Vírgala, S. Panizo, N. Carrillo-López, et al., Experimental Models to Study Diabetes Mellitus and Its Complications: Limitations and New Opportunities, Int J Mol Sci 24 (2023) 10309. https://doi.org/10.3390/ijms241210309.

[555] M. Beaudoin, C.G.R. Perry, A.M. Arkell, A. Chabowski, J.A. Simpson, D.C. Wright, et al., Impairments in mitochondrial palmitoyl-CoA respiratory kinetics that precede development of diabetic cardiomyopathy are prevented by resveratrol in ZDF rats, J Physiol 592 (2014) 2519–2533. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.270538.

[556] A. Al-awar, K. Kupai, M. Veszelka, G. Szűcs, Z. Attieh, Z. Murlasits, et al., Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models, J Diabetes Res 2016 (2016) 1–12. https://doi.org/10.1155/2016/9051426.

[557] H. Raza, A. John, F.C. Howarth, Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Zucker Diabetic Rat Liver and Brain, Cell Physiol Biochem 35 (2015) 1241–1251. https://doi.org/10.1159/000373947.

[558] P. Büttner, S. Werner, S. Baskal, D. Tsikas, V. Adams, P. Lurz, et al., Arginine metabolism and nitric oxide turnover in the ZSF1 animal model for heart failure with preserved ejection fraction, Sci Rep 11 (2021) 20684. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00216-7.

[559] T.S. Bowen, D. Brauer, N.P.L. Rolim, F.H. Bækkerud, A. Kricke, A. Ormbostad Berre, et al., Exercise Training Reveals Inflexibility of the Diaphragm in an Animal Model of Patients With Obesity-Driven Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction, J Am Heart Assoc 6 (2017). https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006416.

[560] W.B. van Ham, E.L. Kessler, M.I.F.J. Oerlemans, M.L. Handoko, J.P.G. Sluijter, T.A.B. van Veen, et al, Clinical Phenotypes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction to Select Preclinical Animal Models, JACC Basic Transl Sci 7 (2022) 844–857. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.12.009.

[561] A. Schauer, R. Draskowski, A. Jannasch, V. Kirchhoff, K. Goto, A. Männel, et al., ZSF1 rat as animal model for HFpEF: Development of reduced diastolic function and skeletal muscle dysfunction, ESC Heart Fail 7 (2020) 2123–2134. https://doi.org/10.1002/ehf2.12915.

[562] F. Koser, A.J. Hobbach, M. Abdellatif, V. Herbst, C. Türk, H. Reinecke, et al., Acetylation and phosphorylation changes to cardiac proteins in experimental HFpEF due to metabolic risk reveal targets for treatment, Life Sci 309 (2022). https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120998.

[563] N. Hamdani, C. Franssen, A. Lourenço, I. Falcão-Pires, D. Fontoura, S. Leite, et al., Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure

With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk Model, Circ Heart Fail 6 (2013) 1239–1249. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539.

[564] Q.A.J. Hagdorn, G.P.L. Bossers, A.M.C. Koop, A. Piek, T.R. Eijgenraam, D.E. van der Feen, et al., A novel method optimizing the normalization of cardiac parameters in small animal models: the importance of dimensional indexing, Am J Physiol Heart Circ Physiol 316 (2019) H1552–H1557. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00182.2019.

[565] W.C. Claycomb, N.A. Lanson, B.S. Stallworth, D.B. Egeland, J.B. Delcarpio, A. Bahinski, et al., HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 2979–2984. https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2979.

[566] S.M. White, P.E. Constantin, W.C. Claycomb, Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286 (2004) H823–H829. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00986.2003.

[567] M.T. Armstrong, D.Y. Lee, P.B. Armstrong, Regulation of Proliferation of the Fetal Myocardium, Dev Dyn 219 (2000) 226-36. https://doi.org/ 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::aid-dvdy1049>3.3.co;2-s.

[568] A. V. Kuznetsov, S. Javadov, S. Sickinger, S. Frotschnig, M. Grimm, H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation, Biochim Biophys Acta 1853 (2015) 276–284. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015.

[569] P.D. Nguyen, S.T. Hsiao, P. Sivakumaran, S.Y. Lim, R.J. Dilley, Enrichment of neonatal rat cardiomyocytes in primary culture facilitates long-term maintenance of contractility in vitro, Am J Physiol Cell Physiol 303 (2012) C1220–C1228. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00449.2011.

[570] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods 65 (1983) 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[571] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis., Int J Mol Sci 22 (2021) 12827. https://doi.org/10.3390/ijms222312827.

[572] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, Methods Mol Biol 731 (2011) 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.

[573] A. Treibs, F. Kreuzer, Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen, Justus Liebigs Ann Chem 718 (1968) 208–223. https://doi.org/10.1002/jlac.19687180119.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[574] S. Das, S. Dey, S. Patra, A. Bera, T. Ghosh, B. Prasad, et al., BODIPY-Based Molecules for Biomedical Applications, Biomolecules 13 (2023) 1723. https://doi.org/10.3390/biom13121723.

[575] K. Kolahi, S. Louey, O. Varlamov, K. Thornburg, Real-Time Tracking of BODIPY-C12 Long-Chain Fatty Acid in Human Term Placenta Reveals Unique Lipid Dynamics in Cytotrophoblast Cells, PLoS One 11 (2016) e0153522. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153522.

[576] M.J. Whalen, T. Dalkara, Z. You, J. Qiu, D. Bermpohl, N. Mehta, et al., Acute plasmalemma permeability and protracted clearance of injured cells after controlled cortical impact in mice, J Cereb Blood Flow Metab 28 (2008) 490. https://doi.org/10.1038/SJ.JCBFM.9600544.

[577] T. Suzuki, K. Fujikura, T. Higashiyama, K. Takata, DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy, J Histochem Cytochem 45 (1997) 49–53. https://doi.org/10.1177/002215549704500107.

[578] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem 72 (1976) 248–254. https://doi.org/10.1006/ABIO.1976.9999.

[579] J. Stypmann, M.A. Engelen, C. Troatz, M. Rothenburger, L. Eckardt, K. Tiemann, Echocardiographic assessment of global left ventricular function in mice, Lab Anim 43 (2009) 127–137. https://doi.org/10.1258/la.2007.06001e.

[580] M.A. García Fernández, J.A. García Robles, J.L. Zamorano Gómez, Manual de Ecocardiografía. Indicaciones e interpretación en la práctica clínica, (2004). https://secardiologia.es/images/stories/la-sec/latinoamerica/manual-ecocardiografia.pdf (Acceso el 11 de julio del 2024).

[581] I. Ahmed, N. Sasikumar, Echocardiography Imaging Techniques, StatPearls, (2024). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572130/ (Acceso el 11 de julio del 2024).

[582] Joshua D. Pollock; Amgad N. Makaryus., Physiology, Cardiac Cycle, StatPearls, (2022). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459327/ (Acceso el 17 de mayo del 2024).

[583] S. Leite, L. Moreira-Costa, R. Cerqueira, C. Sousa-Mendes, A. Angélico-Gonçalves, D. Fontoura, et al., Chronic Sildenafil Therapy in the ZSF1 Obese Rat Model of Metabolic Syndrome and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, J Cardiovasc Pharmacol Ther 26 (2021) 690–701. https://doi.org/10.1177/10742484211034253.

[584] A. Goldenshluger, K. Constantini, N. Goldstein, I. Shelef, D. Schwarzfuchs, H. Zelicha, et al., Effect of Dietary Strategies on Respiratory Quotient and Its Association with Clinical Parameters and Organ Fat Loss: A Randomized Controlled Trial, Nutrients 13 (2021) 2230. https://doi.org/10.3390/nu13072230.

[585] J.B. de B. Weir, New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism, J Physiol 109 (1949) 1–9. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1949.sp004363.

[586] E. Gorostiaga, C. Maurer, J. Eclache, Decrease in Respiratory Quotient During Exercise Following L-Carnitine Supplementation, Int J Sports Med 10 (1989) 169–174. https://doi.org/10.1055/s-2007-1024895.

[587] L. Wittek, C. Touma, T. Nitezki, T. Laeger, S. Krämer, J. Raila, Reduction in Cold Stress in an Innovative Metabolic Cage Housing System Increases Animal Welfare in Laboratory Mice, Animals (Basel) 13 (2023) 2866. https://doi.org/10.3390/ani13182866.

[588] Z. Sahin, H. Solak, A. Koc, R. Ozen Koca, A. Ozkurkculer, P. Cakan, Zet al., Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats, Arch Physiol Biochem 125 (2019) 122–127. https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1441314.

[589] F.R. Ali, G.E. Orchard, R. Mallipeddi, Hematoxylin in History—The Heritage of Histology, JAMA Dermatol 153 (2017) 328. https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.0506.

[590] D.P. Steensma, S. Loghavi, T.E. Witzig, Hematoxylin: From Logwood Trees to Microscope Slides, Mayo Clin Proc 98 (2023) 1429–1430. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2023.07.016.

[591] M. Titford, The long history of hematoxylin, Biotech Histochem 80 (2005) 73–78. https://doi.org/10.1080/10520290500138372.

[592] E.A. Cook, Note on Logwood Staining Solution., J Anat Physiol 14 (1879) 140–2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17231300.

[593] J.K.C. Chan, The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology, Int J Surg Pathol 22 (2014) 12–32. https://doi.org/10.1177/1066896913517939.

[594] F. Sweat, H. Puchtler, S.I. Rosenthal, Sirius red F3BA as a stain for connective tissue., Arch Pathol (Chic) 78 (1964) 69–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14150734.

[595] V.S. Constantine, R.W. Mowry, Selective Staining of Human Dermal Collagen, J Invest Dermatol 50 (1968) 419–423. https://doi.org/10.1038/jid.1968.68.

[596] H. Puchtler, S.N. Meloan, F.S. Waldrop, Are picro-dye reactions for collagens quantitative?, Histochemistry 88 (1988) 243–256. https://doi.org/10.1007/BF00570280.

[697] A. Homeyer, P. Nasr, C. Engel, S. Kechagias, P. Lundberg, M. Ekstedt et al., Automated quantification of steatosis: agreement with stereological point counting, Diagn Pathol 12 (2017) 80. https://doi.org/10.1186/s13000-017-0671-y.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[598] G.E. Courtoy, I. Leclercq, A. Froidure, G. Schiano, J. Morelle, O. Devuyst, et al., Digital Image Analysis of Picrosirius Red Staining: A Robust Method for Multi-Organ Fibrosis Quantification and Characterization, Biomolecules 10 (2020) 1585. https://doi.org/10.3390/biom10111585.

[599] T. Urban, P. Waldauf, A. Krajčová, K. Jiroutková, M. Halačová, V. Džupa, et al., Kinetic characteristics of propofol-induced inhibition of electron-transfer chain and fatty acid oxidation in human and rodent skeletal and cardiac muscles, PLoS One 14 (2019). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0217254.

[600] E. Gnaiger, Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction, Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function, Chapter 12, 327-352, 2008, ISBN:978047037253, https://doi.org/10.1002/9780470372531.ch12.

[601] C. Doerrier, L.F. Garcia-Souza, G. Krumschnabel, Y. Wohlfarter, A.T. Mészáros, E. Gnaiger, High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria, Methods Mol Biol 1782 (2018) 31–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_3.

[602] C. Mas-Bargues, E. García-Domínguez, C. Borrás, Recent Approaches to Determine Static and Dynamic Redox State-Related Parameters, Antioxidants (Basel) 11 (2022) 864. https://doi.org/10.3390/antiox11050864.

[603] V.S. Gross, H.K. Greenberg, S. V. Baranov, G.M. Carlson, I.G. Stavrovskaya, A. V. Lazarev, et al., Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization, Anal Biochem 418 (2011) 213. https://doi.org/10.1016/J.AB.2011.07.017.

[604] H.N. Sabbah, Targeting the Mitochondria in Heart Failure, JACC Basic Transl Sci 5 (2020) 88–106. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.07.009.

[605] A. Ardalan, M.D. Smith, M. Jelokhani-Niaraki, Uncoupling Proteins and Regulated Proton Leak in Mitochondria., Int J Mol Sci 23 (2022) 1528. https://doi.org/10.3390/ijms23031528.

[606] N.T. Watt, A.D. V. MacCannell, L.D. Roberts, Measurement of Fatty Acid Oxidation by High-Resolution Respirometry: Special Considerations for Analysis of Skeletal and Cardiac Muscle and Adipose Tissue, Methods Mol Biol 2675 (2023) 27–41. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3247-5_3.

[607] R.M. Denton, Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions, Biochim Biophys Acta 1787 (2009) 1309–1316. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2009.01.005.

[608] A. Pecinová, L. Alán, A. Brázdová, M. Vrbacký, P. Pecina, Z. Drahotaet al. Role of Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Metabolic Adaptations of Prostate Cancer, Cells 9 (2020). https://doi.org/10.3390/CELLS9081764.

[609] E. Possik, A. Al-Mass, M.L. Peyot, R. Ahmad, F. Al-Mulla, S.R.M. Madiraju, et al., New Mammalian Glycerol-3-Phosphate Phosphatase: Role in β-Cell, Liver and Adipocyte Metabolism, Front Endocrinol (Lausanne) 12 (2021). https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706607.

[610] J.K. Salabei, A.A. Gibb, B.G. Hill, Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis, Nat Protoc 9 (2014) 421. https://doi.org/10.1038/NPROT.2014.018.

[611] D.F. Wilson, D.K. Harrison, A. Vinogradov, Mitochondrial cytochrome c oxidase and control of energy metabolism: measurements in suspensions of isolated mitochondria., J Appl Physiol (1985) 117 (2014) 1424–30. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00736.2014.

[612] G.J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, Metabolomics: the apogee of the omics trilogy, Nat Rev Mol Cell Biol 13 (2012) 263–269. https://doi.org/10.1038/nrm3314.

[613] E. Holmes, A. Wijeyesekera, S.D. Taylor-Robinson, J.K. Nicholson, The promise of metabolic phenotyping in gastroenterology and hepatology, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 12 (2015) 458–471. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.114.

[614] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, Metabonomics, Nature 455 (2008) 1054–1056. https://doi.org/10.1038/4551054a.

[615] A. Lioupi, M. Marinaki, C. Virgiliou, O. Begou, H. Gika, I. Wilson, et al., Probing the polar metabolome by UHPLC-MS, Trends in analytical chemistry 161 (2023) 117014. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117014.

[616] M. Mietus-Snyder, A.M. Perak, S. Cheng, L.L. Hayman, N. Haynes, P.J. Meikle, et al., Next Generation, Modifiable Cardiometabolic Biomarkers: Mitochondrial Adaptation and Metabolic Resilience: A Scientific Statement From the American Heart Association, Circulation 148 (2023) 1827–1845. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001185.

[617] G. Panichella, D. Tomasoni, A. Aimo, Metabolomics to predict heart failure development: A new frontier?, Eur J Heart Fail 26 (2024) 1655-1658. https://doi.org/10.1002/ejhf.3281.

[618] M.M. Rinschen, J. Ivanisevic, M. Giera, G. Siuzdak, Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics, Nat Rev Mol Cell Biol 20 (2019) 353–367. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4.

[619] R.S. Wang, B.A. Maron, J. Loscalzo, Multiomics Network Medicine Approaches to Precision Medicine and Therapeutics in Cardiovascular Diseases, Arterioscler Thromb Vasc Biol 43 (2023) 493–503. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318731.

[620] W.J. Griffiths, K. Karu, M. Hornshaw, G. Woffendin, Y. Wang, Metabolomics and Metabolite Profiling: Past Heroes and Future Developments, Eur J Mass Spectrom (Chichester) 13 (2007) 45–50. https://doi.org/10.1255/ejms.850.

[621] L. Burton, G. Ivosev, S. Tate, G. Impey, J. Wingate, R. Bonner, Instrumental and experimental effects in LC–MS-based metabolomics, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 871 (2008) 227–235. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.044.

[622] M. Bedair, L.W. Sumner, Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics, Trends Analyt Chem 27 (2008) 238–250. https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.006.

[623] G. Theodoridis, H.G. Gika, I.D. Wilson, LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics, Trends Analyt Chem 27 (2008) 251–260. https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.008.

[624] J. Barr, M. Vázquez-Chantada, C. Alonso, M. Pérez-Cormenzana, R. Mayo, A. Galán, et al., Liquid Chromatography−Mass Spectrometry-Based Parallel Metabolic Profiling of Human and Mouse Model Serum Reveals Putative Biomarkers Associated with the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, J Proteome Res 9 (2010) 4501–4512. https://doi.org/10.1021/pr1002593.

[625] J. Barr, J. Caballería, I. Martínez-Arranz, A. Domínguez-Díez, C. Alonso, J. Muntané, et al., Obesity-Dependent Metabolic Signatures Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression, J Proteome Res 11 (2012) 2521–2532. https://doi.org/10.1021/pr201223p.

[626] E.S. Grumbach, T.E. Wheat, J.R. Mazzeo, A novel method for the analysis of amino acids, (2026) https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wa43226.pdf (Acceso el 10 de mayo del 2024).

[627] F.M. Van Der Kloet, I. Bobeldijk, E.R. Verheij, R.H. Jellema, Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping, J Proteome Res 8 (2009) 5132–5141. https://doi.org/ 10.1021/pr900499r

[628] I. Levental, E. Lyman, Regulation of membrane protein structure and function by their lipid nano-environment, Nat Rev Mol Cell Biol 24 (2023) 107–122. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00524-4.

[629] H. Yoon, J.L. Shaw, M.C. Haigis, A. Greka, Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity, Mol Cell 81 (2021) 3708–3730. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.027.

[630] T. Sakuragi, S. Nagata, Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases, Nat Rev Mol Cell Biol 24 (2023) 576–596. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00604-z.

[631] J.C. Flanagan, M.L. Valentine, C.R. Baiz, Ultrafast Dynamics at Lipid–Water Interfaces, Acc Chem Res 53 (2020) 1860–1868. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00302.

[632] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, Advances in amino acid analysis, Anal Bioanal Chem 393 (2009) 445–452. https://doi.org/ 10.1007/s00216-008-2421-1

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[633] S. Bayram, S. Fürst, M. Forbes, S. Kempa, Analysing central metabolism in ultra-high resolution: At the crossroads of carbon and nitrogen, Mol Metab 33 (2020) 38–47. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.002.

[634] F. Matsuda, Y. Toya, H. Shimizu, Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism, Biotechnol Adv 35 (2017) 971–980. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.006.

[635] E. Fahy, S. Subramaniam, H. Alex Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, et al., A comprehensive classification system for lipids1, J Lipid Res 46 (2005) 839–861. https://doi.org/10.1194/JLR.E400004-JLR200.

[636] LIPID MAPS® Lipidomics Gateway, (2009). http://www.lipidmaps.org/ (Acceso el 11 de mayo del 2024).

[637] I. Martínez-Arranz, R. Mayo, M. Pérez-Cormenzana, I. Mincholé, L. Salazar, C. Alonso, et al., Enhancing metabolomics research through data mining, J Proteomics 127 (2015) 275–288. https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2015.01.019.

[638] I.T. Jolliffe, J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments, Philos Trans A Math Phys Eng Sci 374 (2016) 20150202. https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202.

[639] S.R. Shaikh, M.A. Beck, Y. Alwarawrah, N.J. MacIver, Emerging mechanisms of obesity-associated immune dysfunction, Nat Rev Endocrinol 20 (2023) 136-148. https://doi.org/10.1038/s41574-023-00932-2.

[640] G. Cavaliere, F. Cimmino, G. Trinchese, A. Catapano, L. Petrella, M. D'Angelo, et al., From Obesity-Induced Low-Grade Inflammation to Lipotoxicity and Mitochondrial Dysfunction: Altered Multi-Crosstalk between Adipose Tissue and Metabolically Active Organs, Antioxidants 12 (2023) 1172. https://doi.org/10.3390/antiox12061172.

[641] M.J. Lee, J. Kim, The pathophysiology of visceral adipose tissues in cardiometabolic diseases, Biochem Pharmacol 222 (2024) 116116. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116116.

[642] X. Jin, T. Qiu, L. Li, R. Yu, X. Chen, C. Li, et al., Pathophysiology of obesity and its associated diseases, Acta Pharm Sin B 13 (2023) 2403–2424. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.012.

[643] P. Morigny, J. Boucher, P. Arner, D. Langin, Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics, Nat Rev Endocrinol 17 (2021) 276–295. https://doi.org/10.1038/s41574-021-00471-8.

[644] D.J. Han, R. Aslam, P.S. Misra, F. Chiu, T. Ojha, A. Chowdhury, et al., Disruption of adipocyte YAP improves glucose homeostasis in mice and decreases adipose tissue fibrosis, Mol Metab 66 (2022) 101594. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101594.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[645] H. Shen, X. Huang, Y. Zhao, D. Wu, K. Xue, J. Yao, et al., The Hippo pathway links adipocyte plasticity to adipose tissue fibrosis, Nat Commun 13 (2022) 6030. https://doi.org/10.1038/s41467-022-33800-0.

[646] M.C. Soler-Vázquez, M.M. Romero, M. Todorcevic, K. Delgado, C. Calatayud, A. Benitez-Amaro, et al., Implantation of CPT1AM-expressing adipocytes reduces obesity and glucose intolerance in mice, Metab Eng 77 (2023) 256–272. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.04.010.

[647] K. Xue, D. Wu, Y. Wang, Y. Zhao, H. Shen, J. Yao, et al., The mitochondrial calcium uniporter engages UCP1 to form a thermoporter that promotes thermogenesis, Cell Metab 34 (2022) 1325-1341.e6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.07.011.

[648] K. Xue, D. Wu, Y. Qiu, Thermoporter: a new regulatory mechanism for mitochondrial calcium uniporter activity, Trends Cell Biol 33 (2023) 182–184. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.11.008.

[649] L. Chen, L. Li, D. Cui, Y. Huang, H. Tong, H. Zabihi, et al., Extracellular macrophage migration inhibitory factor (MIF) downregulates adipose hormone-sensitive lipase (HSL) and contributes to obesity, Mol Metab 79 (2024) 101834. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101834.

[650] A. Roca-Rivada, M. Do Cruzeiro, R.G.P. Denis, Q. Zhang, C. Rouault, Y. Rouillé, et al., Whole-body deletion of Endospanin 1 protects from obesity-associated deleterious metabolic alterations, JCI Insight 9 (2024) e168418. https://doi.org/10.1172/jci.insight.168418.

[651] K. Hosomi, H. Kawashima, A. Nakano, A. Kakino, Y. Okamatsu-Ogura, Y. Yamashita, et al., NanoSPECT imaging reveals the uptake of 123I-labelled oxidized low-density lipoprotein in the brown adipose tissue of mice via CD36, Cardiovasc Res 119 (2023) 1008–1020. https://doi.org/10.1093/cvr/cvac167.

[652] D. Khan, T. Ara, V. Ravi, R. Rajagopal, H. Tandon, J. Parvathy, et al., SIRT6 transcriptionally regulates fatty acid transport by suppressing PPARγ, Cell Rep 35 (2021) 109190. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109190.

[653] X. Wu, Z. Liu, X. Yu, S. Xu, J. Luo, Autophagy and cardiac diseases: Therapeutic potential of natural products, Med Res Rev 41 (2021) 314–341. https://doi.org/10.1002/med.21733.

[654] A. Ajoolabady, S. Wang, G. Kroemer, J.M. Penninger, V.N. Uversky, D. Pratico, et al., Targeting autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics, Pharmacol Ther 225 (2021) 107848. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107848.

[655] M. Kocak, S. Ezazi Erdi, G. Jorba, I. Maestro, J. Farrés, V. Kirkin, et al., Targeting autophagy in disease: established and new strategies, Autophagy 18 (2022) 473–495. https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1936359.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

[656] J. Debnath, N. Gammoh, K.M. Ryan, Autophagy and autophagy-related pathways in cancer, Nat Rev Mol Cell Biol 24 (2023) 560–575. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z.

[657] V. Deretic, Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism, Immunity 54 (2021) 437–453. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.018.

[658] C. Peña-Martinez, A.D. Rickman, B.L. Heckmann, Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis, Sci Adv 8 (2022) eabn1702. https://doi.org/10.1126/sciadv.abn1702.

[659] C. Miceli, M. Leri, M. Stefani, M. Bucciantini, Autophagy-related proteins: Potential diagnostic and prognostic biomarkers of aging-related diseases, Ageing Res Rev 89 (2023) 101967. https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101967.

[660] W. Li, P. He, Y. Huang, Y.F. Li, J. Lu, M. Li, et al., Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances, Theranostics 11 (2021) 222–256. https://doi.org/10.7150/thno.49860.

[661] B. Lee, Y.H. Kim, W. Lee, H.Y. Choi, J. Lee, J. Kim, et al., USP13 deubiquitinates p62/SQSTM1 to induce autophagy and Nrf2 release for activating antioxidant response genes, Free Radic Biol Med 208 (2023) 820–832. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.024.

[662] E. Turco, A. Savova, F. Gere, L. Ferrari, J. Romanov, M. Schuschnig, et al., Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation, Nat Commun 12 (2021) 5212. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25572-w.

[663] L. Esteban-Martínez, P. Boya, Autophagic flux determination in vivo and ex vivo, Methods 75 (2015) 79–86. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.01.008.

[664] D.J. Klionsky, A.K. Abdel-Aziz, S. Abdelfatah, M. Abdellatif, A. Abdoli, S. Abel, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition), Autophagy 17 (2021)1-382. https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280.

[665] D.J. Klionsky, G. Petroni, R.K. Amaravadi, E.H. Baehrecke, A. Ballabio, P. Boya, et al., Autophagy in major human diseases, EMBO J 40 (2021) e108863. https://doi.org/10.15252/embj.2021108863.

[666] A.M. Jackson, P.S. Jhund, I.S. Anand, H.D. Düngen, C.S.P. Lam, M.P. Lefkowitz, et al., Sacubitril–valsartan as a treatment for apparent resistant hypertension in patients with heart failure and preserved ejection fraction, Eur Heart J 42 (2021) 3741–3752. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab499.

[667] K.M.M. Koriem, A.M.A. Abdeen, Shikimic acid recovers diarrhea and its complications in SD rats fed lactose diet to induce diarrhea, Lab Anim Res 39 (2023) 28. https://doi.org/10.1186/s42826-023-00179-y.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[668] A. Lozhkin, A.E. Vendrov, R. Ramos-Mondragón, C. Canugovi, M.D. Stevenson, T.J. Herronet al., Mitochondrial oxidative stress contributes to diastolic dysfunction through impaired mitochondrial dynamics, Redox Biol 57 (2022) 102474. https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102474.

[669] L. Scandalis, D.W. Kitzman, B.J. Nicklas, M. Lyles, P. Brubaker, M.B. Nelson, et al., Skeletal Muscle Mitochondrial Respiration and Exercise Intolerance in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JAMA Cardiol 8 (2023) 575. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2023.0957.

[670] V. Adams, A. Schauer, A. Augstein, V. Kirchhoff, R. Draskowski, A. Jannasch, et al., Targeting MuRF1 by small molecules in a HFpEF rat model improves myocardial diastolic function and skeletal muscle contractility, J Cachexia Sarcopenia Muscle 13 (2022) 1565–1581. https://doi.org/10.1002/jcsm.12968.

[671] S. Ranjbarvaziri, A. Zeng, I. Wu, A. Greer-Short, F. Farshidfar, A. Budan, et al., Targeting HDAC6 to treat heart failure with preserved ejection fraction in mice, Nat Commun 15 (2024) 1352. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45440-7.

[672] H.M. Salah, A. Pandey, A. Soloveva, M.F. Abdelmalek, A.M. Diehl, C.A. Moylan, et al., Relationship of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, JACC Basic Transl Sci 6 (2021) 918–932. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.07.010.

[673] C. Gofton, Y. Upendran, M.H. Zheng, J. George, MAFLD: How is it different from NAFLD?, Clin Mol Hepatol 29 (2023) S17–S31. https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0367.

[674] X.D. Zhou, J. Cai, G. Targher, C.D. Byrne, M.D. Shapiro, K.C. Sung, et al., Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and implications for cardiovascular risk and disease prevention, Cardiovasc Diabetol 21 (2022) 270. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01697-0.

[675] J. Park, G. Kim, H. Kim, J. Lee, S.M. Jin, J.H. Kim, The associations between changes in hepatic steatosis and heart failure and mortality: a nationwide cohort study, Cardiovasc Diabetol 21 (2022) 287. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01725-z.

[676] S. Wu, Y. Li, Y. Zhang, X. Su, Y. Zuo, G. Chen, et al., Sex and Age Differences in the Association Between Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease and Heart Failure: A Prospective Cohort Study, Circ Heart Fail 17 (2024). https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.123.010841.

[677] K. Drożdż, K. Nabrdalik, W. Hajzler, H. Kwiendacz, J. Gumprecht, G.Y.H. Lip, Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD), Diabetes, and Cardiovascular Disease: Associations with Fructose Metabolism and Gut Microbiota, Nutrients 14 (2021) 103. https://doi.org/10.3390/nu14010103.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[678] X.D. Zhou, G.Y.H. Lip, M.H. Zheng, From HFpEF to "metabolic (dysfunction)-associated HFpEF": Time to act, Sci Bull (Beijing) 69 (2024) 850–852. https://doi.org/10.1016/j.scib.2024.01.006.

[679] F. Capone, R. Vettor, G.G. Schiattarella, Cardiometabolic HFpEF: NASH of the Heart, Circulation 147 (2023) 451–453. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.062874.

[680] M. Abudureyimu, X. Luo, L. Jiang, X. Jin, C. Pan, W. Yu, et al., FBXL4 protects against HFpEF through Drp1-Mediated regulation of mitochondrial dynamics and the downstream SERCA2a, Redox Biol 70 (2024) 103081. https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103081.

[681] Y. Cao, L. Vergnes, Y.C. Wang, C. Pan, K. Chella Krishnan, T.M. Moore, et al., Sex differences in heart mitochondria regulate diastolic dysfunction, Nat Commun 13 (2022) 3850. https://doi.org/10.1038/s41467-022-31544-5.

[682] T.R. Matsuura, P. Puchalska, P.A. Crawford, D.P. Kelly, Ketones and the Heart: Metabolic Principles and Therapeutic Implications, Circ Res 132 (2023) 882–898. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321872.

[683] Y. Zheng, S. Wang, J. Wu, Y. Wang, Mitochondrial metabolic dysfunction and non-alcoholic fatty liver disease: new insights from pathogenic mechanisms to clinically targeted therapy, J Transl Med 21 (2023) 510. https://doi.org/10.1186/s12967-023-04367-1.

[684] B. Fromenty, M. Roden, Mitochondrial alterations in fatty liver diseases, J Hepatol 78 (2023) 415–429. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.09.020.

[685] V. Sequeira, A. Batzner, C. Maack, Targeting mitochondria in hypertrophic cardiomyopathy, Eur Heart J 44 (2023) 1186–1188. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad081.

[686] J.A. Amorim, G. Coppotelli, A.P. Rolo, C.M. Palmeira, J.M. Ross, D.A. Sinclair, Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases, Nat Rev Endocrinol 18 (2022) 243–258. https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7.

[687] M. Bonora, M.R. Wieckowski, D.A. Sinclair, G. Kroemer, P. Pinton, L. Galluzzi, Targeting mitochondria for cardiovascular disorders: therapeutic potential and obstacles, Nat Rev Cardiol 16 (2019) 33–55. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0074-0.

[688] A.B. van der Aart-van der Beek, R.A. de Boer, H.J.L. Heerspink, Kidney and heart failure outcomes associated with SGLT2 inhibitor use, Nat Rev Nephrol 18 (2022) 294–306. https://doi.org/10.1038/s41581-022-00535-6.

[689] A. Marton, T. Kaneko, J.P. Kovalik, A. Yasui, A. Nishiyama, K. Kitada, et al., Organ protection by SGLT2 inhibitors: role of metabolic energy and water conservation, Nat Rev Nephrol 17 (2021) 65–77. https://doi.org/10.1038/s41581-020-00350-x.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[690] D. Yabe, K. Shiki, G. Homma, T. Meinicke, Y. Ogura, Y. Seino, Efficacy and safety of the sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor empagliflozin in elderly Japanese adults (≥65 years) with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled, 52-week clinical trial (EMPA-ELDERLY), Diabetes Obes Metab 25 (2023) 3538–3548. https://doi.org/10.1111/dom.15249.

[691] N. Hammoudi, D. Jeong, R. Singh, A. Farhat, M. Komajda, E. Mayoux, et al., Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes, Cardiovasc Drugs Ther 31 (2017) 233–246. https://doi.org/10.1007/s10557-017-6734-1.

[692] L. Thomas, R. Grempler, M. Eckhardt, F. Himmelsbach, A. Sauer, T. Klein, et al., Long-term treatment with empagliflozin, a novel, potent and selective SGLT-2 inhibitor, improves glycaemic control and features of metabolic syndrome in diabetic rats, Diabetes Obes Metab 14 (2012) 94–96. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01518.x.

[693] Q. Lu, L. Yang, J.J. Xiao, Q. Liu, L. Ni, J.W. Hu, et al., Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/NRF2 pathway, Free Radic Biol Med 195 (2023) 89–102. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.088.

[694] H. Nagayama, M. Inaba, R. Okabe, M. Emoto, E. Ishimura, S. Okazaki, et al., Glycated albumin as an improved indicator of glycemic control in hemodialysis patients with type 2 diabetes based on fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test, Biomed Pharmacother 63 (2009) 236–240. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.04.002.

[695] M. Krhač, M.V. Lovrenčić, Update on biomarkers of glycemic control, World J Diabetes 10 (2019) 1–15. https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i1.1.

[696] V.V Klimontov, A.I. Korbut, I.S. Taskaeva, N.P. Bgatova, M. V Dashkin, N.B. Orlov, et al., Empagliflozin alleviates podocytopathy and enhances glomerular nephrin expression in db/db diabetic mice, World J Diabetes 11 (2020) 596–610. https://doi.org/10.4239/wjd.v11.i12.596.

[697] S. Saadat, M. Noureddini, M. Mahjoubin-Tehran, S. Nazemi, L. Shojaie, M. Aschner, et al., Pivotal Role of TGF-β/Smad Signaling in Cardiac Fibrosis: Non-coding RNAs as Effectual Players, Front Cardiovasc Med 7 (2021) 588347. https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.588347.

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

[699] A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S. Esmaeili, F. Mardani, et al., Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease, J Cell Physiol 233 (2018) 6425–6440. https://doi.org/10.1002/jcp.26429.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[700] U.M. Gundra, N.M. Girgis, D. Ruckerl, S. Jenkins, L.N. Ward, Z.D. Kurtz, et al., Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct, Blood 123 (2014) e110–e122. https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520619.

[701] M. Zeyda, D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Györi, et al., Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production, Int J Obes 31 (2007) 1420–1428. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803632.

[702] A. Elrakaybi, K. Laubner, Q. Zhou, M.J. Hug, J. Seufert, Cardiovascular protection by SGLT2 inhibitors – Do anti-inflammatory mechanisms play a role?, Mol Metab 64 (2022) 101549. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101549.

[703] X. Li, B. Preckel, J. Hermanides, M.W. Hollmann, C.J. Zuurbier, N.C. Weber, Amelioration of endothelial dysfunction by sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: pieces of the puzzle explaining their cardiovascular protection, Br J Pharmacol 179 (2022) 4047–4062. https://doi.org/10.1111/bph.15850.

[704] S. Chen, R. Coronel, M.W. Hollmann, N.C. Weber, C.J. Zuurbier, Direct cardiac effects of SGLT2 inhibitors, Cardiovasc Diabetol 21 (2022) 45. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01480-1.

[705] A. Mazzieri, G. Basta, R. Calafiore, G. Luca, GLP-1 RAs and SGLT2i: two antidiabetic agents associated with immune and inflammation modulatory properties through the common AMPK pathway, Front Immunol 14 (2023) 1163288. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1163288.

[706] D.D. Wang, A. V. Naumova, D. Isquith, J. Sapp, K.A. Huynh, I. Tucker, et al., Dapagliflozin reduces systemic inflammation in patients with type 2 diabetes without known heart failure, Cardiovasc Diabetol 23 (2024) 197. https://doi.org/10.1186/s12933-024-02294-z.

[707] M. Takano, H. Kondo, T. Harada, M. Takahashi, Y. Ishii, H. Yamasaki, et al., Empagliflozin Suppresses the Differentiation/Maturation of Human Epicardial Preadipocytes and Improves Paracrine Secretome Profile, JACC Basic Transl Sci 8 (2023) 1081–1097. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.05.007.

[708] J.H. Han, T.J. Oh, G. Lee, H.J. Maeng, D.H. Lee, K.M. Kim, S.H. Choi, et al., The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice fed a western diet, Diabetologia 60 (2017) 364–376. https://doi.org/10.1007/s00125-016-4158-2.

[709] C. Lv, C. Hu, C. Zhu, X. Wan, C. Chen, X. Ji, et al., Empagliflozin alleviates the development of autoimmune myocarditis via inhibiting NF-κB-dependent cardiomyocyte pyroptosis, Biomed Pharmacother 170 (2024) 115963. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115963.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[710] J. Trnovska, P. Svoboda, H. Pelantova, M. Kuzma, H. Kratochvilova, B.J. Kasperova, et al., Complex Positive Effects of SGLT-2 Inhibitor Empagliflozin in the Liver, Kidney and Adipose Tissue of Hereditary Hypertriglyceridemic Rats: Possible Contribution of Attenuation of Cell Senescence and Oxidative Stress, Int J Mol Sci 22 (2021) 10606. https://doi.org/10.3390/ijms221910606.

[711] V. Vallon, M. Gerasimova, M.A. Rose, T. Masuda, J. Satriano, E. Mayoux, et al., SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice, Am J Physiol Renal Physiol 306 (2014) F194–F204. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00520.2013.

[712] M. Pirklbauer, S. Sallaberger, P. Staudinger, U. Corazza, J. Leierer, G. Mayer, et al., Empagliflozin Inhibits IL-1β-Mediated Inflammatory Response in Human Proximal Tubular Cells, Int J Mol Sci 22 (2021) 5089. https://doi.org/10.3390/ijms22105089.

[713] L. Xu, T. Ota, Emerging roles of SGLT2 inhibitors in obesity and insulin resistance: Focus on fat browning and macrophage polarization, Adipocyte 7 (2017) 1–8. https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1413516.

[714] P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, et al., Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines, Immunity 41 (2014) 14–20. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008.

[715] M. Jia, S. Liu, Y. Xiao, Z. Zhang, M. Li, X. Qi, et al., Deletion of the mitochondrial calcium uniporter in adipose tissue promotes energy expenditure and alleviates diet-induced obesity, Mol Metab 80 (2024) 101873. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.101873.

[716] E.T. Chouchani, L. Kazak, B.M. Spiegelman, New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond, Cell Metab 29 (2019) 27–37. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002.

[717] S.M. Jung, J. Sanchez-Gurmaches, D.A. Guertin, Brown Adipose Tissue Development and Metabolism, Handb Exp Pharmacol 251 (2019) 3–36. https://doi.org/10.1007/164_2018_168.

[718] J.F. Rahbani, L. Kazak, A brown fat-selective mechanism of mitochondrial calcium import?, Cell Metab 34 (2022) 1231–1233. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.08.011.

[719] Z. Zhang, Z. Luo, L. Yu, Y. Xiao, S. Liu, Z. ALuo, et al., Ruthenium 360 and mitoxantrone inhibit mitochondrial calcium uniporter channel to prevent liver steatosis induced by high-fat diet, Br J Pharmacol 179 (2022) 2678–2696. https://doi.org/10.1111/bph.15767.

[720] L.E. Wright, D. Vecellio Reane, G. Milan, A. Terrin, G. Di Bello, A. Belligoli, et al., Increased mitochondrial calcium uniporter in adipocytes underlies mitochondrial

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alterations associated with insulin resistance, Am J Physiol Endocrinol Metab 313 (2017) E641–E650. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00143.2016.

[721] G. Gherardi, H. Monticelli, R. Rizzuto, C. Mammucari, The Mitochondrial Ca2+ Uptake and the Fine-Tuning of Aerobic Metabolism, Front Physiol 11 (2020) 554904. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.554904.

[722] Y.K. Cho, S. Lee, J. Lee, J. Doh, J.H. Park, Y.S. Jung, et al., Lipid remodeling of adipose tissue in metabolic health and disease, Exp Mol Med 55 (2023) 1955–1973. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01071-4.

[723] X. Han, R.W. Gross, The foundations and development of lipidomics, J Lipid Res 63 (2022) 100164. https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100164.

[724] M. Grzybek, A. Palladini, V.I. Alexaki, M.A. Surma, K. Simons, T. Chavakis, et al., Comprehensive and quantitative analysis of white and brown adipose tissue by shotgun lipidomics, Mol Metab 22 (2019) 12–20. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.009.

[725] T. Mouskeftara, O. Deda, T. Liapikos, E. Panteris, E. Karagiannidis, A.S. Papazoglou, et al., Lipidomic-Based Algorithms Can Enhance Prediction of Obstructive Coronary Artery Disease, J Proteome Res 23 (2024) 3598-3611. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00249.

[726] X. Lu, A. Solmonson, A. Lodi, S.M. Nowinski, E. Sentandreu, C.L. Riley, et al., The early metabolomic response of adipose tissue during acute cold exposure in mice., Sci Rep 7 (2017) 3455. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03108-x.

[727] Y. Mugabo, S. Zhao, A. Seifried, S. Gezzar, A. Al-Mass, D. Zhang, et al., Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: Role in metabolism and signaling in pancreatic β-cells and hepatocytes, Proc Natl Acad Sci U S A 113 (2016) E430-9. https://doi.org/10.1073/pnas.1514375113.

[728] L. Oberhauser, P. Maechler, Lipid-Induced Adaptations of the Pancreatic Beta-Cell to Glucotoxic Conditions Sustain Insulin Secretion, Int J Mol Sci 23 (2021) 324. https://doi.org/10.3390/ijms23010324.

[729] P. Poursharifi, C. Attané, Y. Mugabo, A. Al-Mass, A. Ghosh, C. Schmitt, et al., Adipose ABHD6 regulates tolerance to cold and thermogenic programs, JCI Insight 5 (2020) e140294. https://doi.org/10.1172/jci.insight.140294.

[730] M. Prentki, S.R.M. Madiraju, Glycerolipid Metabolism and Signaling in Health and Disease, Endocr Rev 29 (2008) 647–676. https://doi.org/10.1210/er.2008-0007.

[731] T.S. Nielsen, N. Jessen, J.O.L. Jørgensen, N. Møller, S. Lund, Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease, J Mol Endocrinol 52 (2014) R199–R222. https://doi.org/10.1530/JME-13-0277.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[732] R. Schreiber, H. Xie, M. Schweiger, Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL)., Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids 1864 (2019) 880–899. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.008.

[733] R. Patel, A. Santoro, P. Hofer, D. Tan, M. Oberer, A.T. Nelson, et al., ATGL is a biosynthetic enzyme for fatty acid esters of hydroxy fatty acids, Nature 606 (2022) 968–975. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04787-x.

[734] R. Zechner, P.C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann, A. Lass, Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores, J Lipid Res 50 (2009) 3–21. https://doi.org/10.1194/jlr.R800031-JLR200.

[735] G. Marcelin, S.M. Liu, X. Li, G.J. Schwartz, S. Chua, Genetic control of ATGL-mediated lipolysis modulates adipose triglyceride stores in leptin-deficient mice, J Lipid Res 53 (2012) 964–972. https://doi.org/10.1194/jlr.M022467.

[736] J. Li, L. Gong, S. Liu, Y. Zhang, C. Zhang, M. Tian, et al., Adipose HuR protects against diet-induced obesity and insulin resistance, Nat Commun 10 (2019) 2375. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10348-0.

[737] Y. Nakatsu, T. Yamamotoya, M. Okumura, T. Ishii, M. Kanamoto, M. Naito, et al., Prolyl isomerase Pin1 interacts with adipose triglyceride lipase and negatively controls both its expression and lipolysis, Metabolism 115 (2021) 154459. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154459.

[738] X. Yang, Q. Liu, Y. Li, Y. Ding, Y. Zhao, Q. Tang, et al., Inhibition of the sodium–glucose co-transporter SGLT2 by canagliflozin ameliorates diet-induced obesity by increasing intra-adipose sympathetic innervation, Br J Pharmacol 178 (2021) 1756–1771. https://doi.org/10.1111/bph.15381.

[739] E. Recazens, E. Mouisel, D. Langin, Hormone-sensitive lipase: sixty years later, Prog Lipid Res 82 (2021) 101084. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101084.

[740] K.M. Lauritsen, J.H. Voigt, S.B. Pedersen, T.K. Hansen, N. Møller, N. Jessen, et al., Effects of SGLT2 inhibition on lipid transport in adipose tissue in type 2 diabetes, Endocr Connect 11 (2022) e210558. https://doi.org/10.1530/EC-21-0558.

[741] M. Savikj, B. Stocks, S. Sato, K. Caidahl, A. Krook, A.S. Deshmukh, et al., Exercise timing influences multi-tissue metabolome and skeletal muscle proteome profiles in type 2 diabetic patients – A randomized crossover trial, Metabolism 135 (2022) 155268. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155268.

[742] F.J. May, L.A. Baer, A.C. Lehnig, K. So, E.Y. Chen, F. Gao, et al., Lipidomic Adaptations in White and Brown Adipose Tissue in Response to Exercise Demonstrate Molecular Species-Specific Remodeling, Cell Rep 18 (2017) 1558–1572. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.038.

[743] S. Rajakumari, S. Srivastava, Aging and β3-adrenergic stimulation alter mitochondrial lipidome of adipose tissue, Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids 1866 (2021) 158922. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158922.

[744] P.E. Nunes Ribeiro Bellot, M. Nunes Moia, B. Zavarize Reis, L.F. Campos Pedrosa, L. Tasic, F. Barbosa, et al., Are Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine Body Levels Potentially Reliable Biomarkers in Obesity? A Review of Human Studies, Mol Nutr Food Res 67 (2023) e2200568. https://doi.org/10.1002/mnfr.202200568.

[745] K. Yea, J. Kim, J.H. Yoon, T. Kwon, J.H. Kim, B.D. Lee, et al., Lysophosphatidylcholine Activates Adipocyte Glucose Uptake and Lowers Blood Glucose Levels in Murine Models of Diabetes, J Biol Chem 284 (2009) 33833–33840. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024869.

[746] K. Eisinger, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, S. Krautbauer, C. Buechler, Lipidomic Analysis of Serum from High Fat Diet Induced Obese Mice, Int J Mol Sci 15 (2014) 2991–3002. https://doi.org/10.3390/ijms15022991.

[747] M.F. Fondevila, U. Fernandez, M.J. Gonzalez-Rellan, N. Da Silva Lima, X. Buque, A. Gonzalez-Rodriguez, et al., The L-α-Lysophosphatidylinositol/G Protein–Coupled Receptor 55 System Induces the Development of Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis, Hepatology 73 (2021) 606–624. https://doi.org/10.1002/hep.31290.

[748] M. Kurano, T. Kobayashi, E. Sakai, K. Tsukamoto, Y. Yatomi, Lysophosphatidylinositol, especially albumin-bound form, induces inflammatory cytokines in macrophages, FASEB J 35 (2021) e21673. https://doi.org/10.1096/fj.202100245R.

[749] J.M. Moreno-Navarrete, V. Catalán, L. Whyte, A. Díaz-Arteaga, R. Vázquez-Martínez, F. Rotellar, et al., The L-α-Lysophosphatidylinositol/ GPR55 System and Its Potential Role in Human Obesity, Diabetes 61 (2012) 281–291. https://doi.org/10.2337/db11-0649.

[750] E. Tudurí, M. Imbernon, R.J. Hernández-Bautista, M. Tojo, J. Fernø, C. Diéguez, et al., GPR55: a new promising target for metabolism?, J Mol Endocrinol 58 (2017) R191–R202. https://doi.org/10.1530/JME-16-0253.

[751] J. Yang, K.W. Park, S. Cho, Inhibition of the CD36 receptor reduces visceral fat accumulation and improves insulin resistance in obese mice carrying the BDNF-Val66Met variant, J Biol Chem 293 (2018) 13338–13348. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002405.

[752] Y. Chen, J. Zhang, W. Cui, R.L. Silverstein, CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate, J Exp Med 219 (2022) e20211314. https://doi.org/10.1084/jem.20211314.

[753] D. Samovski, M. Jacome-Sosa, N.A. Abumrad, Fatty Acid Transport and Signaling: Mechanisms and Physiological Implications, Annu Rev Physiol 85 (2023) 317–337. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-032122-030352.

[754] E.M. El Ouali, L. Bosquet, B. Elgharbaoui, F. Laziri, I. Laher, A.C. Hackney, et al., Association between “cluster of differentiation 36 (CD36)” and adipose tissue

lipolysis during exercise training: a systematic review, Front Physiol 14 (2023) 1256440. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1256440.

[755] U. Karunakaran, S. Elumalai, J.S. Moon, K.C. Won, CD36 Signal Transduction in Metabolic Diseases: Novel Insights and Therapeutic Targeting., Cells 10 (2021) 1833. https://doi.org/10.3390/cells10071833.

[756] X. Luo, Y. Li, P. Yang, Y. Chen, L. Wei, T. Yu, et al., Obesity induces preadipocyte CD36 expression promoting inflammation via the disruption of lysosomal calcium homeostasis and lysosome function, EBioMedicine 56 (2020) 102797. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102797.

[757] Y. Cyr, S. Bissonnette, V. Lamantia, H. Wassef, E. Loizon, E.T. Ngo Sock, et al., White Adipose Tissue Surface Expression of LDLR and CD36 is Associated with Risk Factors for Type 2 Diabetes in Adults with Obesity, Obesity 28 (2020) 2357–2367. https://doi.org/10.1002/oby.22985.

[758] A. Bonen, N.N. Tandon, J.F.C. Glatz, J.J.F.P. Luiken, G.J.F. Heigenhauser, The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes, Int J Obes 30 (2006) 877–883. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803212.

[759] I.O.C.M. Vroegrijk, J.B. van Klinken, J.A. van Diepen, S.A.A. van den Berg, M. Febbraio, L.K.M. Steinbusch, et al., CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis, Obesity 21 (2013) 2037–2045. https://doi.org/10.1002/oby.20354.

[760] D.J. Kennedy, S. Kuchibhotla, K.M. Westfall, R.L. Silverstein, R.E. Morton, M. Febbraio, A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling., Cardiovasc Res 89 (2011) 604–13. https://doi.org/10.1093/cvr/cvq360.

[761] C.C. Huang, C.A. Chou, W.Y. Chen, J.L. Yang, WC. Lee, J.B. Chen, et al., Empagliflozin Ameliorates Free Fatty Acid Induced-Lipotoxicity in Renal Proximal Tubular Cells via the PPARγ/CD36 Pathway in Obese Mice, Int J Mol Sci 22 (2021) 12408. https://doi.org/10.3390/ijms222212408.

[762] A.M. Abo-khookh, H.A. Ghoneim, R.R. Abdelaziz, M.A. Nader, N.M. Shawky, The dual inhibitor Sacubitril-valsartan ameliorate high-fat high-fructose-induced metabolic disorders in rats superiorly compared to valsartan only, J Pharm Pharmacol 75 (2023) 846–858. https://doi.org/10.1093/jpp/rgad012.

[763] R. Ryu, H. Tran, K. Bahjri, Association of Sacubitril/Valsartan with Metabolic Parameters in Patients with Reduced Ejection Fraction Heart Failure at a Multidisciplinary Clinic, Metab Syndr Relat Disord 19 (2021) 115–118. https://doi.org/10.1089/met.2020.0100.

[764] N. Marchitto, F. Sindona, P. Mobilia, S.G. Dalmaso, G. Raimondi, Effect of low-dose sacubitril/valsartan on body composition, bioelectrical impedance analysis, heart rate variability and T-peak to T-end index in elderly patients with severe chronic heart

USC Biblioteca

failure: a pilot experience, Curr Med Res Opin 35 (2019) 13–15. https://doi.org/10.1080/03007995.2019.1576484.

[765] A. Mebazaa, B.A. Davison, J. Biegus, C. Edwards, G. Murtagh, C. Varounis, et al., Reduced congestion and improved response to a fluid/sodium challenge in chronic heart failure patients after initiation of sacubitril/valsartan: The NATRIUM-HF study, Eur J Heart Fail 26 (2024) 1507-1517. https://doi.org/10.1002/ejhf.3265.

[766] T.D. Wang, R.S. Tan, H.Y. Lee, S.H. Ihm, M.Y. Rhee, B. Tomlinson, et al., Effects of Sacubitril/Valsartan (LCZ696) on Natriuresis, Diuresis, Blood Pressures, and NT-proBNP in Salt-Sensitive Hypertension, Hypertension 69 (2017) 32–41. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08484.

[767] T. Miyoshi, K. Nakamura, D. Miura, M. Yoshida, Y. Saito, S. Akagi, et al, Effect of LCZ696, a dual angiotensin receptor neprilysin inhibitor, on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and hemodynamic change in rats, Cardiol J 26 (2019) 575–583. https://doi.org/10.5603/CJ.a2018.0048.

[768] G. Vila, G. Grimm, M. Resl, B. Heinisch, E. Einwallner, H. Esterbauer, et al., B-Type Natriuretic Peptide Modulates Ghrelin, Hunger, and Satiety in Healthy Men, Diabetes 61 (2012) 2592–2596. https://doi.org/10.2337/db11-1466.

[769] C. Wang, X. Dong, L. Wei, J. Sun, F. Zhao, C. Meng, et al., The Relationship of Appetite-Regulating Hormones in the Development of Cardiac Cachexia, Int Heart J 60 (2019) 384–391. https://doi.org/10.1536/ihj.18-131.

[770] R.L. Mynatt, E. Ravussin, Secretin: An Old Hormone with a Burning Secret, Cell 175 (2018) 1459–1460. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.008.

[771] R. Sankhe, E. Rathi, S. Manandhar, A. Kumar, S.R.K. Pai, S.G. Kini, et al., Repurposing of existing FDA approved drugs for Neprilysin inhibition: An in-silico study, J Mol Struct 1224 (2021) 129073. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129073.

[772] Y. Li, K. Schnabl, S.M. Gabler, M. Willershäuser, J. Reber, A. Karlas, et al., Secretin-Activated Brown Fat Mediates Prandial Thermogenesis to Induce Satiation, Cell 175 (2018) 1561-1574.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.016.

[773] F. Zhang, W. Qiao, J. Wei, Z. Tao, C. Chen, Y. Wu, et al., Secretin-dependent signals in the ventromedial hypothalamus regulate energy metabolism and bone homeostasis in mice, Nat Commun 15 (2024) 1030. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45436-3.

[774] Y.B. Oh, J.H. Kim, B.M. Park, B.H. Park, S.H. Kim, Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7), Peptides 37 (2012) 79–85. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.005.

[775] S.H.S. Santos, L.R. Fernandes, E.G. Mario, A.V.M. Ferreira, L.C.J. Pôrto, J.I. Alvarez-Leite, et al., Mas Deficiency in FVB/N Mice Produces Marked Changes in

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lipid and Glycemic Metabolism, Diabetes 57 (2008) 340–347. https://doi.org/10.2337/db07-0953.

[776] J. Schuchard, M. Winkler, I. Stölting, F. Schuster, F.M. Vogt, J. Barkhausen, et al., Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1–7)/Mas-dependent pathway, Br J Pharmacol 172 (2015) 3764–3778. https://doi.org/10.1111/bph.13172.

[777] H. Müller-Fielitz, A. Markert, C. Wittmershaus, F. Pahlke, O. Jöhren, W. Raasch, Weight loss and hypophagia after high-dose AT1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 383 (2011) 373–384. https://doi.org/10.1007/s00210-011-0602-5.

[778] N. Suárez-Zamorano, S. Fabbiano, C. Chevalier, O. Stojanović, D.J. Colin, A. Stevanović, et al., Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity, Nat Med 21 (2015) 1497–1501. https://doi.org/10.1038/nm.3994.

[779] E. Jeffery, C.D. Church, B. Holtrup, L. Colman, M.S. Rodeheffer, Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity, Nat Cell Biol 17 (2015) 376–385. https://doi.org/10.1038/ncb3122.

[780] J. Sun, Y. Xiao, W. Xu, W. Xing, F. Du, M. Tian, et al., Anti-hypertensive effect of a novel angiotensin II receptor neprilysin inhibitor (ARNi) -S086 in DSS rat model, Front Cardiovasc Med 11 (2024) 1348897. https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1348897.

[781] I. Polina, M. Domondon, R. Fox, A. V. Sudarikova, M. Troncoso, V.Y. Vasileva, et al., Differential effects of low-dose sacubitril and/or valsartan on renal disease in salt-sensitive hypertension, Am J Physiol Renal Physiol 319 (2020) F63–F75. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00125.2020.

[782] S. Selvaraj, B.L. Claggett, M. Packer, F. Zannad, I.S. Anand, B. Pieske, et al., Effects of Sacubitril/Valsartan on Serum Lipids in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, J Am Heart Assoc 10 (2021) e022069. https://doi.org/10.1161/JAHA.121.022069.

[783] M. Li, A. Zhong, Y. Tang, J. Yu, M. Wu, K.K.M. Selvam, et al., Effect of sacubitril/valsartan on lipid metabolism in patients with chronic kidney disease combined with chronic heart failure: a retrospective study, Lipids Health Dis 23 (2024) 63. https://doi.org/10.1186/s12944-024-02051-x.

[784] H.A. Barman, S. Tanyolaç, O. Dogan, E. Bal, A. Atıcı, S. Özyıldırım, et al., Impact of Sacubitril/Valsartan on Lipid Parameters in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction, Clin Drug Investig 42 (2022) 533–540. https://doi.org/10.1007/s40261-022-01161-7.

[785] J. Habibi, A.R. Aroor, N.A. Das, C.M. Manrique-Acevedo, M.S. Johnson, M.R. Hayden, et al., The combination of a neprilysin inhibitor (sacubitril) and angiotensin-II receptor blocker (valsartan) attenuates glomerular and tubular injury in the Zucker

Obese rat, Cardiovasc Diabetol 18 (2019) 40. https://doi.org/10.1186/s12933-019-0847-8.

[786] F. Alqahtani, M. Mohany, A.F. Alasmari, A.Z. Alanazi, O.M. Belali, M.M. Ahmed, et al., Angiotensin II receptor Neprilysin inhibitor (LCZ696) compared to Valsartan attenuates Hepatotoxicity in STZ-induced hyperglycemic rats, Int J Med Sci 17 (2020) 3098–3106. https://doi.org/10.7150/ijms.49373.

[787] N.I. Cole, R.J. Suckling, P.A. Swift, F.J. He, G.A. MacGregor, W. Hinton, et al., The association between serum sodium concentration, hypertension and primary cardiovascular events: a retrospective cohort study, J Hum Hypertens 33 (2019) 69–77. https://doi.org/10.1038/s41371-018-0115-5.

[788] H. Hu, M. Eguchi, T. Miki, T. Kochi, I. Kabe, A. Nanri, et al., Serum sodium and risk of hypertension: a cohort study, Hypertens Res 45 (2022) 354–359. https://doi.org/10.1038/s41440-021-00797-w.

[789] F.R. Mc Causland, M.P. Lefkowitz, B. Claggett, M. Packer, M. Senni, M. Gori, et al., Angiotensin–neprilysin inhibition and renal outcomes across the spectrum of ejection fraction in heart failure, Eur J Heart Fail 24 (2022) 1591–1598. https://doi.org/10.1002/ejhf.2421.

[790] F.R. Mc Causland, M.P. Lefkowitz, B. Claggett, N.S. Anavekar, M. Senni, M. Gori, et al., Angiotensin-Neprilysin Inhibition and Renal Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circulation 142 (2020) 1236–1245. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047643.

[791] D. Chicco, G. Jurman, Machine learning can predict survival of patients with heart failure from serum creatinine and ejection fraction alone, BMC Med Inform Decis Mak 20 (2020) 16. https://doi.org/10.1186/s12911-020-1023-5.

[792] W. Mullens, K. Damman, J.M. Testani, P. Martens, C. Mueller, J. Lassus, et al., Evaluation of kidney function throughout the heart failure trajectory – a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Eur J Heart Fail 22 (2020) 584–603. https://doi.org/10.1002/ejhf.1697.

[793] M. Mohany, A.Z. Alanazi, F. Alqahtani, O.M. Belali, M.M. Ahmed, S.S. Al-Rejaie, LCZ696 mitigates diabetic-induced nephropathy through inhibiting oxidative stress, NF-κB mediated inflammation and glomerulosclerosis in rats, PeerJ 8 (2020) e9196. https://doi.org/10.7717/peerj.9196.

[794] S.S. Abbas, M.F. Schaalan, S.M. Gebril, F.E. Hassan, M.O. Mahmoud, S.O. Hassanin, LCZ696 (sacubitril/valsartan) protects against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in adult male rats: Up-regulation of Apelin-13/ACE2, miR-200, and down-regulation of TGF-β/SMAD 2/3 and miR-192, Life Sci 306 (2022) 120850. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120850.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[795] X. Liu, L. Huang, G. Tse, T. Liu, J. Che, Effects of sacubitril-valsartan in the treatment of chronic heart failure patients with end-stage renal disease undergoing dialysis, Clin Cardiol 46 (2023) 930–936. https://doi.org/10.1002/clc.24075.

[796] A.A. Voors, M. Gori, L.C.Y. Liu, B. Claggett, M.R. Zile, B. Pieske, et al., Renal effects of the angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in patients with heart failure and preserved ejection fraction, Eur J Heart Fail 17 (2015) 510–517. https://doi.org/10.1002/ejhf.232.

[797] P. Pericas, C. Mas-Lladó, M.F. Ramis-Barceló, I. Valadrón, M. Noris Mora, L. Pasamar Márquez, et al., Impact of Sacubitril–Valsartan Treatment on Diastolic Function in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction, High Blood Press Cardiovasc Prev 28 (2021) 167–175. https://doi.org/10.1007/s40292-021-00437-x.

[798] W. Zhang, J. Liu, Y. Fu, H. Ji, Z. Fang, W. Zhou, et al., Sacubitril/Valsartan Reduces Fibrosis and Alleviates High-Salt Diet-Induced HFpEF in Rats, Front Pharmacol 11 (2021) 600953. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.600953.

[799] Y. Zhang, M. Yuan, Y. Suo, Q. Yang, S. Shao, Y. Li, et al., Angiotensin receptor-neprilysin inhibitor attenuates cardiac hypertrophy and improves diastolic dysfunction in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction, Clin Exp Pharmacol Physiol 49 (2022) 848–857. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13672.

[800] E.S. Nordén, B.A. Bendiksen, H. Andresen, K.K. Bergo, E.K. Espe, A. Hasic, et al., Sacubitril/valsartan ameliorates cardiac hypertrophy and preserves diastolic function in cardiac pressure overload, ESC Heart Fail 8 (2021) 918–927. https://doi.org/10.1002/ehf2.13177.

[801] S. V. Raman, Y. Chandrashekhar, Myocardial Fibrosis: A Viable Imaging Target in Diastolic Dysfunction and Heart Failure?, JACC Cardiovasc Imaging 16 (2023) 870–872. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2023.05.001.

[802] A. Mazza, D.M. Townsend, G. Torin, L. Schiavon, A. Camerotto, G. Rigatelli, et al., The role of sacubitril/valsartan in the treatment of chronic heart failure with reduced ejection fraction in hypertensive patients with comorbidities: From clinical trials to real-world settings, Biomed Pharmacother 130 (2020) 110596. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110596.

[803] C. Cloro, I. Zaffina, L. Sacchetta, F. Arturi, C. Clausi, S. Lucà, et al., Effects of sacubitril/valsartan on both metabolic parameters and insulin resistance in prediabetic non-obese patients with heart failure and reduced ejection fraction, Front Endocrinol (Lausanne) 13 (2022) 940654. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.940654.

[804] E. Gamarra, C. Baffoni, G. Borretta, M. Feola, F. Tassone, Reduction of Insulin Requirement After Starting Treatment With Sacubitril/Valsartan in a Patient with Diabetes Treated With Continuous Subcutaneous Insulin Infusion (CSII): A case report, J Diabetes Sci Technol 12 (2018) 1254–1255. https://doi.org/10.1177/1932296818785644.

[805] G. Uno, T. Nagoshi, A. Yoshii, Y. Inoue, Y. Tanaka, H. Kimura, et al., Collaborative Activities of Noradrenaline and Natriuretic Peptide for Glucose Utilization in Patients with Acute Coronary Syndrome, Sci Rep 9 (2019) 7822. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44216-0.

[806] J. Jordan, A.L. Birkenfeld, O. Melander, C. Moro, Natriuretic Peptides in Cardiovascular and Metabolic Crosstalk, Hypertension 72 (2018) 270–276. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11081.

[807] K. Myakala, B.A. Jones, X.X. Wang, M. Levi, Sacubitril/valsartan treatment has differential effects in modulating diabetic kidney disease in db/db mice and KKAy mice compared with valsartan treatment, Am J Physiol Renal Physiol 320 (2021) F1133–F1151. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00614.2020.

[808] T.D. Nguyen, P.C. Schulze, Cardiac Metabolism in Heart Failure and Implications for Uremic Cardiomyopathy, Circ Res 132 (2023) 1034–1049. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321759.

[809] J.J.F.P. Luiken, J.F.C. Glatz, D. Neumann, Cardiac contraction-induced GLUT4 translocation requires dual signaling input, Trends Endocrinol Metab 26 (2015) 404–410. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.002.

[810] E.L. Saw, J.T. Pearson, D.O. Schwenke, P.E. Munasinghe, H. Tsuchimochi, S. Rawal, et al., Activation of the cardiac non-neuronal cholinergic system prevents the development of diabetes-associated cardiovascular complications, Cardiovasc Diabetol 20 (2021) 50. https://doi.org/10.1186/s12933-021-01231-8.

[811] R. Stinkens, B.W. van der Kolk, J. Jordan, T. Jax, S. Engeli, T. Heise, et al., The effects of angiotensin receptor neprilysin inhibition by sacubitril/valsartan on adipose tissue transcriptome and protein expression in obese hypertensive patients, Sci Rep 8 (2018) 3933. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22194-z.

[812] J.L. Jefferies, J.E. Saffitz, Autophagy and Reverse Remodeling, J Am Coll Cardiol 79 (2022) 802–804. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.12.019.

[813] S. Sciarretta, Y. Maejima, D. Zablocki, J. Sadoshima, The Role of Autophagy in the Heart, Annu Rev Physiol 80 (2018) 1–26. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121427.

[814] A. Li, M. Gao, B. Liu, Y. Qin, L. chen, H. Liu, et al., Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease, Cell Death Dis 13 (2022) 444. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04906-6.

[815] A. Shirakabe, P. Zhai, Y. Ikeda, T. Saito, Y. Maejima, C.P. Hsu, et al., Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload–Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure, Circulation 133 (2016) 1249–1263. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[816] W. Ding, H. Feng, W. Li, H. Liao, Q. Tang, Research Progress on the Interaction Between Autophagy and Energy Homeostasis in Cardiac Remodeling, Front Pharmacol 11 (2020) 587438. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.587438.

[817] D.A. Kubli, Å.B. Gustafsson, Cardiomyocyte health: adapting to metabolic changes through autophagy, Trends Endocrinol Metab 25 (2014) 156–164. https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.11.004.

[818] H.C. Kenny, E.D. Abel, Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus, Circ Res 124 (2019) 121–141. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311371.

[819] C.C. Yang, Y.T. Chen, C.H. Chen, Y.C. Li, P.L. Shao, T.H. Huang, et al., The therapeutic impact of entresto on protecting against cardiorenal syndrome-associated renal damage in rats on high protein diet, Biomed Pharmacother 116 (2019) 108954. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108954.

[820] T. Khamis, A.E. Alsemeh, D.M. Abdullah, Sacubitril/valsartan (LCZ696) ameliorates hyperthyroid-induced cardiac hypertrophy in male rats through modulation of miR-377, let-7 b, autophagy, and fibrotic signaling pathways, Sci Rep 12 (2022) 14654. https://doi.org/10.1038/s41598-022-18860-y.

[821] H.W. Chiu, C.H. Wu, W.Y. Lin, W.T. Wong, W.C. Tsai, H.T. Hsu, et al., The Angiotensin II Receptor Neprilysin Inhibitor LCZ696 Inhibits the NLRP3 Inflammasome By Reducing Mitochondrial Dysfunction in Macrophages and Alleviates Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in a Mouse Model, Inflammation 47 (2024) 696–717. https://doi.org/10.1007/s10753-023-01939-7.

[822] G. Vergaro, A. Del Franco, A. Carecci, Y.F. Ferrari Chen, A. Aimo, F. Forini, et al., Effects of sacubitril-valsartan on remodelling, fibrosis and mitochondria in a murine model of isoproterenol-induced left ventricular dysfunction, Int J Cardiol 409 (2024) 132203. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2024.132203.

[823] J.N. Yeh, Y. Yue, Y.C. Chu, C.R. Huang, C.C. Yang, J.Y. Chiang, et al., Entresto protected the cardiomyocytes and preserved heart function in cardiorenal syndrome rat fed with high-protein diet through regulating the oxidative stress and Mfn2-mediated mitochondrial functional integrity, Biomed Pharmacother 144 (2021) 112244. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112244.

[824] X. Li, J. Braza, U. Mende, G. Choudhary, P. Zhang, Cardioprotective effects of early intervention with sacubitril/valsartan on pressure overloaded rat hearts, Sci Rep 11 (2021) 16542. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95988-3.

[825] A. Sorrentino, B. Steinhorn, L. Troncone, S.S.S. Saravi, S. Badole, E. Eroglu, et al., Reversal of heart failure in a chemogenetic model of persistent cardiac redox stress, Am J Physiol Heart Circ Physiol 317 (2019) H617–H626. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00177.2019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[826] R.W. McGarrah, S.B. Crown, G.F. Zhang, S.H. Shah, C.B. Newgard, Cardiovascular Metabolomics, Circ Res 122 (2018) 1238–1258. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311002.

[827] L. Lind, T. Fall, J. Ärnlöv, S. Elmståhl, J. Sundström, Large-Scale Metabolomics and the Incidence of Cardiovascular Disease, J Am Heart Assoc 12 (2023) e026885. https://doi.org/10.1161/JAHA.122.026885.

[828] J. Gan, Y. Wang, Y. Deng, J. Zhang, S. Wang, X. Jiang, et al., Sacubitril/valsartan ameliorates cardiac function and ventricular remodeling in CHF rats via the inhibition of the tryptophan/kynurenine metabolism and inflammation, Sci Rep 14 (2024) 12377. https://doi.org/10.1038/s41598-024-62472-7.

[829] P. Donato, P. Dugo, L. Mondello, Liquid Chromatography, Separation of Lipids, Chapter 9, 203–248, 2013. ISBN: 0128071141, 9780128071144.

[830] V.G. DeMarco, D.A. Ford, E.J. Henriksen, A.R. Aroor, M.S. Johnson, J. Habibi, et al., Obesity-Related Alterations in Cardiac Lipid Profile and Nondipping Blood Pressure Pattern during Transition to Diastolic Dysfunction in Male db/db Mice, Endocrinology 154 (2013) 159–171. https://doi.org/10.1210/en.2012-1835.

[831] Q. Han, S.C. Yeung, M.S.M. Ip, J.C.W. Mak, Dysregulation of cardiac lipid parameters in high-fat high-cholesterol diet-induced rat model, Lipids Health Dis 17 (2018) 255. https://doi.org/10.1186/s12944-018-0905-3.

[832] V.A. Dato, M.C. Paz, F.E. Rey, M.C. Sánchez, V. Llorente-Cortés, G.A. Chiabrando, et al., Transcriptional analysis reveals that the intracellular lipid accumulation impairs gene expression profiles involved in insulin response-associated cardiac functionality., Res Sq. Preprint (2023). https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2688729/v1.

[833] V. Samouillan, E. Garcia, A. Benitez-Amaro, M.T. La Chica Lhoëst, J. Dandurand, V. Actis Dato, et al., Inhibitory Effects of LRP1-Based Immunotherapy on Cardiac Extracellular Matrix Biophysical Alterations Induced by Hypercholesterolemia, J Med Chem 66 (2023) 6251–6262. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c02103.

[834] V. Samouillan, E. Revuelta-López, J. Dandurand, L. Nasarre, L. Badimon, C. Lacabanne, et al., Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation, Int J Biochem Cell Biol 55 (2014) 209–219. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.09.005.

[835] V. Actis Dato, A. Benitez-Amaro, E. Garcia, L. Claudi, M.T.L. Lhoëst, A. Iborra, et al., Targeting cholesteryl ester accumulation in the heart improves cardiac insulin response, Biomed Pharmacother 152 (2022) 113270. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113270.

[836] V. Actis Dato, G.A. Chiabrando, Activated Alpha-2 Macroglobulin Improves Insulin Response via LRP1 in Lipid-Loaded HL-1 Cardiomyocytes, Int J Mol Sci 22 (2021) 6915. https://doi.org/10.3390/ijms22136915.

USC COMPOSTELA

[837] A. V. Mathew, E.M. Seymour, J. Byun, S. Pennathur, S.L. Hummel, Altered Metabolic Profile With Sodium-Restricted Dietary Approaches to Stop Hypertension Diet in Hypertensive Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, J Card Fail 21 (2015) 963–967. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2015.10.003.

[838] L.J. Rijzewijk, R.W. van der Meer, J.W.A. Smit, M. Diamant, J.J. Bax, S. Hammer, et al., Myocardial Steatosis Is an Independent Predictor of Diastolic Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus, J Am Coll Cardiol 52 (2008) 1793–1799. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.07.062.

[839] G. Korosoglou, P.M. Humpert, J. Ahrens, D. Oikonomou, N.F. Osman, G. Gitsioudis, et al., Left ventricular diastolic function in type 2 diabetes mellitus is associated with myocardial triglyceride content but not with impaired myocardial perfusion reserve, J Magn Reson Imaging 35 (2012) 804–811. https://doi.org/10.1002/jmri.22879.

[840] L.L. Listenberger, X. Han, S.E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, D.S. Ory, et al., Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 3077–3082. https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100.

[841] V. Sachdev, K. Sharma, S.J. Keteyian, C.F. Alcain, P. Desvigne-Nickens, J.L. Fleg, et al., Supervised Exercise Training for Chronic Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Scientific Statement From the American Heart Association and American College of Cardiology, Circulation 147 (2023) e699-e715. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001122.

[842] I.J. Fuentes-Abolafio, M.R. Bernal-López, R. Gómez-Huelgas, M. Ricci, A.I. Cuesta-Vargas, L.M. Pérez-Belmonte, Relationship between quadriceps femoris muscle architecture and muscle strength and physical function in older adults with heart failure with preserved ejection fraction, Sci Rep 12 (2022) 21660. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26064-7.

[843] T. Anderson, T.M. Cascino, T.M. Koelling, D. Perry, G. Grafton, D.K. Houston, et al., Measured Versus Estimated Resting Metabolic Rate in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, Circ Heart Fail 14 (2021) e007962. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007962.

[844] Y. Sugita, K. Ito, Y. Yoshioka, S. Sakai, Association of complication of type 2 diabetes mellitus with hemodynamics and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: a case–control study in individuals aged 65–80 years, Cardiovasc Diabetol 22 (2023) 97. https://doi.org/10.1186/s12933-023-01835-2.

[845] B. Pieske, R. Wachter, S.J. Shah, A. Baldridge, P. Szeczoedy, G. Ibram, et al., PARALLAX Investigators and Committee members, Effect of Sacubitril/Valsartan vs Standard Medical Therapies on Plasma NT-proBNP Concentration and Submaximal Exercise Capacity in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction, JAMA 326 (2021) 1919. https://doi.org/10.1001/jama.2021.18463.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[846] M.Y. Maslov, S. Foianini, D. Mayer, M. V. Orlov, M.A. Lovich, Interaction Between Sacubitril and Valsartan in Preventing Heart Failure Induced by Aortic Valve Insufficiency in Rats, J Card Fail 25 (2019) 921–931. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2019.09.008.

[847] P. Beltrán, P. Palau, E. Domínguez, M. Faraudo, E. Núñez, O. Guri, et al., Sacubitril/valsartan and short-term changes in the 6-minute walk test: A pilot study, Int J Cardiol 252 (2018) 136–139. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.10.074.

[848] M.Y. Maslov, S. Foianini, D. Mayer, M. V. Orlov, M.A. Lovich, Synergy between sacubitril and valsartan leads to hemodynamic, antifibrotic, and exercise tolerance benefits in rats with preexisting heart failure, Am J Physiol Heart Circ Physiol 316 (2019) H289–H297. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00579.2018.

[849] R. Nogueira-Ferreira, I. Santos, R. Ferreira, D. Fontoura, C. Sousa-Mendes, I. Falcão-Pires, et al., Exercise training impacts skeletal muscle remodelling induced by metabolic syndrome in ZSF1 rats through metabolism regulation, Biochim Biophys Acta 1869 (2023) 166709. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166709.

[850] E.R. Price, E.M. Mager, Respiratory quotient: Effects of fatty acid composition, J Exp Zool A Ecol Integr Physiol 333 (2020) 613–618. https://doi.org/10.1002/jez.2422.

[851] P. Li, H. Ji, S. Cheng, Heart–liver axis implications of the new steatotic liver disease nomenclature, Lancet Gastroenterol Hepatol 8 (2023) 1071–1072. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00353-9.

[852] A. Xanthopoulos, R.C. Starling, T. Kitai, F. Triposkiadis, Heart Failure and Liver Disease, JACC Heart Fail 7 (2019) 87–97. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.10.007.

[853] C. Adamson, L.M. Cowan, R.A. de Boer, M. Diez, J. Drożdż, A. Dukát, et al., Liver tests and outcomes in heart failure with reduced ejection fraction: findings from DAPA-HF, Eur J Heart Fail 24 (2022) 1856–1868. https://doi.org/10.1002/ejhf.2649.

[854] Y. Li, P. Yang, J. Ye, Q. Xu, J. Wu, Y. Wang, Updated mechanisms of MASLD pathogenesis, Lipids Health Dis 23 (2024) 117. https://doi.org/10.1186/s12944-024-02108-x.

[855] L. Chrysavgis, E. Cholongitas, From NAFLD to MASLD: what does it mean?, Expert Rev Gastroenterol Hepatol 18 (2024) 217–221. https://doi.org/10.1080/17474124.2024.2374472.

[856] D. Peng, Z. Yu, M. Wang, J. Shi, L. Sun, Y. Zhang, et al., Association of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease With Left Ventricular Diastolic Function and Cardiac Morphology, Front Endocrinol (Lausanne) 13 (2022) 935390. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.935390.

[857] J.D. Torres-Peña, A.P. Arenas-de Larriva, J.F. Alcala-Diaz, J. Lopez-Miranda, J. Delgado-Lista, Different Dietary Approaches, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease: A Literature Review, Nutrients 15 (2023) 1483. https://doi.org/10.3390/nu15061483.

USC SANTIAGO

[858] S.K. Bansal, M.B. Bansal, Pathogenesis of MASLD and MASH – role of insulin resistance and lipotoxicity, Aliment Pharmacol Ther 59 (2024). https://doi.org/10.1111/apt.17930.

[859] V. Caputo, G. Tarantino, S.J. Santini, G. Fracassi, C. Balsano, The Role of Epigenetic Control of Mitochondrial (Dys)Function in MASLD Onset and Progression, Nutrients 15 (2023) 4757. https://doi.org/10.3390/nu15224757.

[860] T. Sarabhai, S. Kahl, S. Gancheva, L. Mastrototaro, B. Dewidar, D. Pesta, et al., Loss of mitochondrial adaptation associates with deterioration of mitochondrial turnover and structure in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, Metabolism 151 (2024) 155762. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155762.

[861] S. Helgesson, S. Tarai, T. Langner, H. Ahlström, L. Johansson, J. Kullberg, et al., Spleen volume is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease, liver volume and liver fibrosis, Heliyon 10 (2024) e28123. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28123.

[862] L. Barrea, C. Di Somma, G. Muscogiuri, G. Tarantino, G.C. Tenore, F. Orio, et al., Nutrition, inflammation and liver-spleen axis, Crit Rev Food Sci Nutr 58 (2018) 3141–3158. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1353479.

[863] Y. Tsushima, K. Endo, Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver: correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen, Dig Dis Sci 45 (2000) 196–200. https://doi.org/10.1023/A:1005446418589.

[864] K. Suzuki, B. Claggett, M. Minamisawa, M. Packer, M.R. Zile, J. Rouleau, et al., Liver function and prognosis, and influence of sacubitril/valsartan in patients with heart failure with reduced ejection fraction, Eur J Heart Fail 22 (2020) 1662–1671. https://doi.org/10.1002/ejhf.1853.

[865] A. Perez Ruiz de Garibay, A. Kortgen, J. Leonhardt, A. Zipprich, M. Bauer, Critical care hepatology: definitions, incidence, prognosis and role of liver failure in critically ill patients, Crit Care 26 (2022) 289. https://doi.org/10.1186/s13054-022-04163-1.

[866] S.J. Hsu, H.C. Huang, C.L. Chuang, C.C. Chang, M.C. Hou, F.Y. Lee, et al., Dual Angiotensin Receptor and Neprilysin Inhibitor Ameliorates Portal Hypertension in Portal Hypertensive Rats, Pharmaceutics 12 (2020) 320. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040320.

[867] S. Ayalasomayajula, Y. Han, T. Langenickel, K. Malcolm, W. Zhou, I. Hanna, et al., In vitro and clinical evaluation of OATP-mediated drug interaction potential of sacubitril/valsartan (LCZ696), J Clin Pharm Ther 41 (2016) 424–431. https://doi.org/10.1111/jcpt.12408.

[868] N. Schiering, A. D'Arcy, F. Villard, P. Ramage, C. Logel, F. Cumin, et al., Structure of neprilysin in complex with the active metabolite of sacubitril, Sci Rep 6 (2016) 27909. https://doi.org/10.1038/srep27909.

USC COMPOSTELA

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

ANEXO I: CONFLICTO DE INTERESES

La doctoranda Sandra Moraña Fernández declara no tener ningún tipo de conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO II: LISTA DE PUBLICACIONES INCLUÍDAS EN ESTA TESIS Y PERMISOS

The lipidomic and inflammatory profiles of visceral and subcutaneous adipose tissues are distinctly regulated by the SGLT2 inhibitor empagliflozin in Zucker diabetic fatty rats.

Alana Aragón-Herrera[a,b,1], **Sandra Moraña-Fernández[a,c,1]**, Manuel Otero-Santiago[a], Laura Anido-Varela[a,b], Manuel Campos-Toimil[d], Javier García-Seara[a,b,e], Ana Román[a,f], José Seijas[a,b,f], Lucía García-Caballero[g], Javier Rodríguez[h], Estefanía Tarazón[b,i], Esther Roselló-Lletí[b,i], Manuel Portolés[b,i], Ricardo Lage[c], Oreste Gualillo[j], José Ramón González-Juanatey[a,b,f], Sandra Feijóo-Bandín[a,b,*], Francisca Lago[a,b].

[1]These authors have contributed equally.

* Correponding author

[a]Cellular and Molecular Cardiology Research Unit, Institute of Biomedical Research and Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.

[b]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain.

[c]Cardiology Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS) and Institute of Biomedical Research of Santiago de Compostela (IDISSERGAS). Av. Barcelona, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

[d]Group of Pharmacology of Chronic Diseases (CD Pharma), Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Santiago de Compostela, Spain.

[e]Arrhytmia Unit, Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

[f]Cardiology Department, Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

[g]Department of Morphological Sciences, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

[h]Clinical Biochemistry Laboratory, Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

[i]Clinical and Translational Research in Cardiology Unit, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[j]Laboratory of Neuroendocrine Interactions in Rheumatology and Inflammatory Diseases, Institute of Biomedical Research and Xerencia de Xestión Integrada de Santiago, (XXIS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

Contribución de la doctoranda Sandra Moraña Fernández: investigación, análisis formal, redacción del borrador original.

Referencia complete: A. Aragón-Herrera, S. Moraña-Fernández, M. Otero-Santiago, L. Anido-Varela, M. Campos-Toimil, J. García-Seara, et al., The lipidomic and inflammatory profiles of visceral and subcutaneous adipose tissues are distinctly regulated by the SGLT2 inhibitor empagliflozin in Zucker diabetic fatty rats, Biomed Pharmacother 161 (2023) 114535. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114535.

Publicado en mayo del 2023.

Editorial: Elsevier; ISSN: 0753-3322

Factor de impacto (Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023): 6.9 (Q1)

Publicación reproducida en los apartados **“**4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE EMPAGLIFLOZINA SOBRE EL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATAS ZDF” y “5.1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON EMPAGLIFLOZINA EN UN MODELO ANIMAL DE OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS TIPO 2”

Se trata de una publicación de acceso libre bajo licencia Creative Commons: CC BY-NC-ND 4.0 Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International. Canonical URL https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

English Search Donate Explore CC

WHO WE ARE WHAT WE DO LICENSES AND TOOLS BLOG SUPPORT US

CC BY-NC-ND 4.0

ATTRIBUTION-NONCOMMERCIAL-NODERIVATIVES 4.0 INTERNATIONAL

Deed

Canonical URL : https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/ **See the legal code**

You are free to:

Share — copy and redistribute the material in any medium or format

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

Under the following terms:

Attribution — You must give appropriate credit , provide a link to the license, and indicate if changes were made . You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.

NonCommercial — You may not use the material for commercial purposes .

NoDerivatives — If you remix, transform, or build upon the material, you may not distribute the modified material.

No additional restrictions — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

Notices:

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable exception or limitation .

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as publicity, privacy, or moral rights may limit how you use the material.

Notice

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

This deed highlights only some of the key features and terms of the actual license. It is not a license and has no legal value. You should carefully review all of the terms and conditions of the actual license before using the licensed material.

Creative Commons is not a law firm and does not provide legal services. Distributing, displaying, or linking to this deed or the license that it summarizes does not create a lawyer-client or any other relationship.

Creative Commons is the nonprofit behind the open licenses and other legal tools that allow creators to share their work. Our legal tools are free to use.

- Learn more about our work
- **Learn more about CC Licensing**
- Support our work
- Use the license for your own material.
- Licenses List
- Public Domain List

Footnotes

appropriate credit — If supplied, you must provide the name of the creator and attribution parties, a copyright notice, a license notice, a disclaimer notice, and a link to the material. CC licenses prior to Version 4.0 also require you to provide the title of the material if supplied, and may have other slight differences.
- More info

indicate if changes were made — In 4.0, you must indicate if you modified the material and retain an indication of previous modifications. In 3.0 and earlier license versions, the indication of changes is only required if you create a derivative.
- Marking guide
- More info

commercial purposes — A commercial use is one primarily intended for commercial advantage or monetary compensation.
- More info

remix, transform, or build upon — Merely changing the format never creates a derivative.
- More info

technological measures — The license prohibits application of effective technological measures, defined with reference to Article 11 of the WIPO Copyright Treaty.
- More info

exception or limitation — The rights of users under exceptions and limitations, such as fair use and fair dealing, are not affected by the CC licenses.
- More info

publicity, privacy, or moral rights — You may need to get additional permissions before using the material as you intend.
- More info

Contact Newsletter Privacy Policies Terms

CONTACT US

Creative Commons PO Box 1866, Mountain View, CA 94042

[redacted]

[redacted]

SUBSCRIBE TO OUR NEWSLETTER

Your email SUBSCRIBE

Except where otherwise [redacted], content on this site is licensed under a [redacted]. Icons by [redacted].

SUPPORT OUR WORK

Our work relies on you! Help us keep the Internet free and open.

DONATE NOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Publicación actualmente en revisión en la revista Biochemical Pharmacology (factor de impacto 2023: 5.3 (Q1)):

TÍTULO: Cardiometabolic effects of sacubitril/valsartan in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction.

Sandra Moraña-Fernández[1,2*], Xocas Vázquez-Abuín[1,3*], Alana Aragón-Herrera[1,4ǂ], Laura Anido-Varela[1,3,4], Javier García-Seara[1,4,5,6], Óscar Otero-García[1,7], Diego Rodríguez-Penas[1,8], Manuel Campos-Toimil[9], Manuel Otero-Santiago[1,10], Alexandre Rodrigues[11], Alexandre Gonçalves[11], Juliana Pereira Morais[12], Inês N. Alves[11], Cláudia Sousa-Mendes[11], Inês Falcão-Pires[11], José Ramón González-Juanatey[1,4,6,7], Sandra Feijóo-Bandín[1,4*], Francisca Lago[1,4*].

*These authors contributed equally to this work.

ǂCorresponding autor.

[1]Cellular and Molecular Cardiology Research Unit, IDIS, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Área Sanitaria Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.

[2]Cardiology Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, IDIS, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

[3]Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

[4]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

[5]Arrhytmia Unit, Cardiology Department, IDIS, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Área Sanitaria Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.

[6]Department of Psychiatry, Radiology, Public Health, Nursing and Medicine, IDIS, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

[7]Cardiology Department, IDIS, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Área Sanitaria Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.

[8]Cardiology Department Clinical Trial Unit, IDIS, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Área Sanitaria Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.

[9]Physiology and Pharmacology of Chronic Diseases (FIFAEC), Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS), Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

[10]Clinical Biochemistry Laboratory, Área Sanitaria Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.

[11]Cardiovascular R&D Centre - UnIC@RISE, Department of Surgery and Physiology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal.

[12]CINTESIS@RISE, NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa; UnIC@RISE - Cardiovascular Research Centre, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Contribución de la doctoranda Sandra Moraña Fernández: metodología, análisis formal e investigación, redacción y preparación del borrador original.

Los datos recogidos en este borrador se reproducen en los apartados “4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SACUBITRIL/VALSARTÁN EN EL METABOLISMO CARDÍACO DE RATAS ZSF1” y “5.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON SACUBITRIL/VALSARTÁN EN UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDÍACA CON FRACCIÓN DE EYECCIÓN PRESERVADA Y EN CARDIOMIOCITOS EN CULTIVO”

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO III: PERMISOS

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Carlos Rodríguez Moreno, presidente do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 9/15/2016 o estudo:

Título: New effects of empagliflozin at cardiac level: possible regulation of cardiomyocyte metabolism and autophagy/mitophagy in the diabetic heart
Promotor: Boehringer Ingelheim
Tipo de estudo: Outros
Versión:
Código do Promotor:
Código de Rexistro: 2016/346

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo **polo/a investigador/a do centro**:

Centros	Investigadores Principais
C.H. Universitario de Santiago	Francisca Lago Paz; José Ramón González Juanatey

En Santiago de Compostela, a
O presidente

XUNTA DE GALICIA SECRETARÍA XERAL TÉCNICA SECRETARÍA DO COMITÉS DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN CONSELLERÍA DE SANIDADE

Firmado digitalmente por: RODRIGUEZ MORENO CARLOS - 05614327G
ND: CN = RODRIGUEZ MORENO CARLOS - 05614327G C = ES
Fecha: 2016.09.16 10:13:04 +02'00'

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

Carlos Rodríguez Moreno, presidente do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo,

FAI CONSTAR QUE:

1. O Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo cumpre tanto na súa composición coma nos seus PNTs os requisitos legais vixentes (R.D 1090/2015 de ensaios clínicos, e a Lei 14/2007 de Investigación Biomédica).

2. A composición actual do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo é:

Carlos Rodríguez Moreno (Presidente). Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta). Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Juan M. Vázquez Lago (Secretario). Médico especialista en Medicina Preventiva e Saúde Pública. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Francisco Campos Pérez. Investigador. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
Rosana Castelo Domínguez. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Daniel De La Iglesia García. Médico especialista en Dixestivo. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Ricardo García Martínez. Licenciado en Dereito. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Victor Herrán Carreira. Paciente, ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
María Jesús Lamas Díaz. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.
María Isabel Loza García. Licenciada en Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela.
Guillermo José Prada Ramallal. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago. Fundación "Ramón Domínguez". Santiago
María Jesús Wandosell Picatoste. Diplomada en Enfermería. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Para que conste onde proceda, e a petición do promotor / investigador, en Santiago de Compostela, a 19 de abril de 2016.

O presidente do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago Lugo,

XUNTA DE GALICIA SECRETARÍA XERAL TÉCNICA NOGRAMA 2008 COMITÉS DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN CONSELLERÍA DE SANIDADE

Firmado digitalmente por: RODRIGUEZ MORENO CARLOS - 05614327G
ND: CN = RODRIGUEZ MORENO CARLOS - 05614327G C = ES
Fecha: 2016.09.16 10:13:16 +02'00'

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Servizo de Convocatorias e Recursos Humanos de I+S
Edificio CACTUS – Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: citinfo@usc.es
http://imaisd.usc.es

JOSÉ MANUEL CIFUENTES MARTÍNEZ, PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, cuya Sección de Experimentación animal ha sido designada como Órgano Habilitado para la evaluación de proyectos de experimentación animal por resolución de la Xunta de Galicia, con fecha 11 de noviembre de 2013, de acuerdo con lo exigido por el RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia,

INFORMA:

Que el proyecto de investigación titulado: **"Estudio de la regulación de la función cardíaca y del metabolismo en especies murinas por procesos fidiopatológicos del sistema cardiovascular, por hormonas metabólicas y por fármacos utilizados en medicina cardiovascular"** del que es investigadora responsable **Doña Maria Francias Lago paz,** ha sido examinado por el Comité de Bioética de esta Universidad, Sección de Experimentación Animal, llegando a las siguientes conclusiones:

Con respecto a su finalidad, se trata de un proyecto de investigación traslacional o aplicada cuyo objetivo general es el conocimiento de la regulación y el control de la homeostasis energética a nivel cardíaco y su posible papel en la fisiopatología y en el tratamiento de las enfermedades cardiometabólicas

- Con respecto a los requisitos de las 3Rs,
  - No cabe la posibilidad de reemplazo ya que no se han encontrado métodos o estrategias de ensayo que permitan llevar a cabo los experimentos propuestos en este trabajo.
  - La experimentación se realizará en un centro registrado como usuario de animales de experimentación por lo que la manipulación, manejo y supervisión de los animales durante todo el proyecto será llevada a cabo por personas capacitadas. El grupo investigador lo componen personas con capacitaciones C y B, lo que asegura su preparación para garantizar el bienestar animales durante todos los procedimientos (requisito de refinamiento).
  - Finalmente, con respecto al requisito de reducción, se considera que el número de animales a utilizar es el mínimo imprescindible para la obtención de resultados estadísticamente significativos.

- La clasificación de los procedimientos en función de su grado de severidad es de "leve".
- Con respecto al balance de los daños y los beneficios, los procedimientos se efectúan bajo analgesia y anestesia previa a las intervenciones por lo que se minimiza el dolor, angustia y sufrimiento. Los métodos de sacrificio descritos (conmoción cerebral y confirmación por dislocación cervical y posterior decapitación) se encuentran entre los indicados por el propio RD 53/2013.
- Se han examinado las situaciones y excepciones previstas en el punto e) del artículo 34. 2 encontrando que ninguna de ellas es aplicable en este proyecto.
- El proyecto se clasifica como tipo II y por tanto no debe ser sometido a evaluación retrospectiva.

VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Servizo de Convocatorias e Recursos Humanos de I+S
Edificio CACTUS – Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: cittinfo@usc.es
http://imaisd.usc.es

Por todas estas razones, este Comité acordó emitir un **INFORME FAVORABLE.**

En la evaluación de este proyecto NO HA EXISTIDO CONFLICTO DE INTERESES.

Lugo, 23 de octubre de 2018



VICERREITORADO DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: oiitinfo@usc.es
http://imaisd.usc.es

Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago, tras evaluar el Proyecto titulado "Estudio de la regulación de la función cardiaca y del metabolismo en especies murinas por procesos fisiopatológicos del sistema cardiovascular, por hormonas metabólicas y por fármacos utilizados en medicina cardiovascular" del que es Investigadora Responsable Dña. Francisca Lago Paz, acordó con fecha 1 de Octubre de 2018 emitir

INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones del establecimiento usuario Animalario del CIMUS, con número de registro ES150780275701, siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa.

En Santiago, a 3 de Octubre de 2018

Fdo. El secretario

Fdo. El presidente

Responsable administrativo:	Nombre: Raúl Vieira Miguel Cargo: Director de la RIAIDT de la USC	V.ºB. Firma y sello

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA
Xefatura Territorial
da Consellería do Medio Rural

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA
Data 13/12/2016 13:08:41
SAÍDA 154558 / RX 1798831

José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15005/16/004
Interesada: Isabel Moscoso Galán
Procedemento: resolución de autorización
Data de inicio: 19.12.2016
Forma de inicio: solicitude da interesada

Notifícolle que, con data 12 de decembro de 2016, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural emitiu unha resolución de autorización dun establecemento, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 27.09.2016 e rexistro de entrada 114073 RX 2539988, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Bases fisiopatolóxicas do exe AGE-RAGE no remodelado ventricular post-infarto e as súas posibilidades como futura diana terapéutica
Nome do centro usuario: CIMUS (USC)
Persoa responsable do proxecto: Isabel Moscoso Galán
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Facultade de Medicina
Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que se aproba a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución á persoa interesada.

O mencionado proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva aos tres anos da concesión desta autorización.

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 39/2015, de 1 de outubro, (BOE 236, do 2 de outubro de 2015), do procedemento administrativo común das administracións públicas.

A Coruña, 13 de decembro de 2016
O xefe do Servizo de Gandaría

Eugenio Romero Senande

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA | CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xacobeo 21·22

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15011/2022/009
Data de inicio do expediente: 21.4.2022
Persoa solicitante: Isabel Lista Pérez
Procedemento: resolución de autorización
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

A persoa solicitante, como representante da Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), presentou con data 16.3.2022 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro electrónico da Xunta de Galicia 2022/695165), cuxos datos son os seguintes:

Denominación do proxecto: Obtención de cardiomiocitos neonatais de ratas
Nome do centro usuario: Fundación do Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela
Persoa responsable do proxecto: Francisca Lago Paz
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela

Clasificación do proxecto: Tipo I [ ] Tipo II [X] Tipo III [ ]

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL
XEFATURA TERRITORIAL
SERVIZO DE GANDARÍA
Edificio Administrativo Monelos
R/ Vicente Ferrer, 2, 4º andar
15071 A Coruña
T: 981 184 565
servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal
mediorural.xunta.gal

CVE: YDCeOc9zuIq1
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, o Comité de Ética de Investigación Animal do IDIS.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de tres anos e unha vez transcorrido este tempo, esta autorización deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Isabel Lista García esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 17 de xuño de 2022
O xefe territorial
Jose Manuel Santos Maneiro

Asinado por: SANTOS MANEIRO, JOSE MANUEL
Cargo: Xefe Territorial
Data e hora: 17/06/2022 14:51:44

CVE: YDCeOc9zutq1
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

REPÚBLICA PORTUGUESA
AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO

dgav
Direção Geral de Alimentação e Veterinária

C/c:
- DBEA

Exmº(a) Senhor(a)
Dra. Inês Falcão Pires
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro,
4200-319Porto

Nossa referência	Vossa referência	Vossa data
8161/23-S 28-09-2023		-

Assunto: Autorização de projeto - "GOKU: Glucose-tO-Ketones Upgrade in the failing heart" - Decreto-Lei n.º 113/2013 de 7 de agosto

Na sequência do pedido efetuado por V. Exª no sentido de poder ser autorizada adenda ao projeto experimental designado "*GOKU: Glucose-tO-Ketones Upgrade in the failing heart*", autorizado a 29/11/2021 através do ofício n.º 018454 e tendo como investigadora responsável a Doutora Inês Maria Falcão Sousa Pires Marques, cabe-me informar que o mesmo foi avaliado de acordo com o Artigo 44º do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de agosto, relativo à "proteção dos animais utilizados para fins científicos".

Uma vez que o projeto em apreço envolve a realização de procedimentos cuja classificação de severidade prospetiva se enquadra na categoria severa, terá de ser submetido a uma avaliação retrospetiva de acordo com o ponto 3 do Artigo 45º do documento legislativo acima referido

Mais se reforça que, deverá existir uma apertada monitorização dos sinais de dor, sofrimento ou angústia dos animais submetidos aos procedimentos, para que a aplicação dos limites críticos estabelecidos para cada um dos procedimentos se faça de forma adequada a cada animal, tendo em conta a necessidade de impedir que os

Campo Grande, n.º 50 | 1700-093 Lisboa
Tlf.: 213 239 500

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

REPÚBLICA PORTUGUESA
AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO

dgav
Direção Geral de Alimentação e Veterinária

sinais de dor, sofrimento ou angústia severos se prolonguem sem a tomada de medidas mitigantes dos mesmos.

A monitorização dos sinais de dor, sofrimento ou angústia dos animais submetidos aos procedimentos, classificados prospectivamente em termos de severidade nas categorias ligeira e moderada, deverá ser feita no sentido de se atualizar a severidade efetiva a que os mesmos ficarão, na realidade, sujeitos.

Mais se informa V. Exª que o projeto em apreço recebeu uma **avaliação favorável** e foi **autorizado** de acordo com o n.º 1, do Artigo 42º do mesmo diploma legislativo.

Finalmente, resta-me especificar, de acordo, com o discriminado no n.º 2, do Artigo 46º, do atrás referido Decreto-Lei, o seguinte:

- **Os utilizadores que realizam o projeto:** Senhor Reitor da Universidade de Porto, Professor Doutor António Sousa Pereira
- **A pessoa responsável pela execução global do projeto e pela sua conformidade com a autorização do mesmo:** Doutora Inês Falcão Pires
- **Os estabelecimentos onde o projeto vai ser realizado:** Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Com os melhores cumprimentos,

A Diretora de Serviços de Proteção Animal

Yolanda Vaz

Yolanda Vaz

Campo Grande, n.º 50 | 1700-093 Lisboa
Tlf.: 213 239 500

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "b" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

1.- Lexislación nacional (1 hora).

2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).

5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "b"

1.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)

.....

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "b" EUTANASIA DE LOS ANIMALES – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

1.- Legislación nacional (1 hora).

2.- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).

5.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "b"

1.- Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)

CVE: cABmCPQUudZ9
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / *IDENTIFICACIÓN*		
1.1. Apelidos / *Apellidos* **Moraña Fernández**		
1.2. Nome / *Nombre* **Sandra**		DNI / *DNI* **77480711J**
1.3. Función / *Función* **"b"**	1.4. Grupo ou grupos de especies* / *Grupo o grupos de especies** **1**	1.5. Data inicial de vixencia** / *Fecha inicial de vigencia*** **19/12/2021**
2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CERTIFICADO*		
b734		
3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO*		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado* **AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA** **CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA** Rúa do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / *Teléfono* 981 546 657	3.3. Fax / *Fax* 981 546 651	3.4. Correo electrónico / *Correo electrónico* formacion.cmrm@xunta.gal
3.5. Data / *Fecha* **Ver sinatura / *Ver firma***	3.6. Lugar / *Lugar* **Santiago de Compostela**	
3.7. Nome e sinatura / *Nombre y firma* **Santiago de Compostela,** **O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria** **Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)** **O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria** **Manuel López Luaces**		

* Anexo II da Orde ECC/566/2015, do 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, ruminantes e porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (réptiles), 8 (peixes e anfibios), 9 (cefalópodos), 10 (animais silvestres), 11 (outras especies).
* Anexo II de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, rumiantes y porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (reptiles), 8 (peces y anfibios), 9 (cefalópodos), 10 (animales silvestres), 11 (otras especies).
** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /
*** La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.*

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe da Área
Data e hora: 23/08/2023 12:27:43

CVE: cABmCPQUudZ9
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "c" REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

1.- Lexislación nacional (1 hora).

2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).

5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "c"

1.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)

3.- Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)

4.- Anestesia para procedementos menores (5 horas)

5.- Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)

6.- Principios de cirurxía (5 horas)

.....

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "c" REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

1.- Legislación nacional (1 hora).

2.- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).

5.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "c"

1.- Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)

3.- Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)

4.- Anestesia para procedimientos menores (5 horas)

5.- Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)

6.- Principios de cirugía (5 horas)

CVE: 7BRAI5V4ohi0
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / *IDENTIFICACIÓN*

1.1. Apelidos / *Apellidos*

Moraña Fernández

1.2. Nome / *Nombre*	DNI / *DNI*
Sandra	**77480711J**

1.3. Función / *Función*	1.4. Grupo ou grupos de especies* / *Grupo o grupos de especies**	1.5. Data inicial de vixencia** / *Fecha inicial de vigencia***
"c"	**1**	**19/12/2021**

2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CERTIFICADO*

c772

3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO*

3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado*

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA
Rúa do Camiño Francés, 10 baixo
15781 Santiago de Compostela
A Coruña (España)

3.2. Teléfono / *Teléfono*	3.3. Fax / *Fax*	3.4. Correo electrónico / *Correo electrónico*
981 546 657	981 546 651	formacion.cmrm@xunta.gal

3.5. Data / *Fecha*	3.6. Lugar / *Lugar*
Ver sinatura / *ver firma*	**Santiago de Compostela**

3.7. Nome e sinatura / *Nombre y firma*

Santiago de Compostela,

O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria

Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)

O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria

Manuel López Luaces

* Anexo II da Orde ECC/566/2015, do 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, ruminantes e porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (réptiles), 8 (peixes e anfibios), 9 (cefalópodos), 10 (animais silvestres), 11 (outras especies).
* Anexo II de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, rumiantes y porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (reptiles), 8 (peces y anfibios), 9 (cefalópodos), 10 (animales silvestres), 11 (otras especies).
** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /
*** La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.*

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe da Área
Data e hora: 23/08/2023 12:27:43

CVE: 7BRAi5V4ohi0
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO IV: IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS

Todas las imágenes, tablas y figuras presentes en esta tesis doctoral son de autoría propia.

Las figuras se realizaron empleando elementos de BioRender®.com y/o Smart Servier Medical Art bajo una licencia ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL (http://smart.servier.com/, 13 de junio de 2024).

Las estructuras químicas se realizaron con el programa informático ChemDraw® 23.1.1 (licencia proporcionada por la USC).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO V: CHECKLIST Y DOCUMENTO ARRIVE

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EDIUS ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA USC

Autor/a: Sandra Moraña Fernández

Título de la Tesis: Regulación de la homeostasis energética y del metabolismo cardiomiocitario por parte de fárr

Programa de doctorado: Investigación y Desarrollo de Medicamentos

Checklist del Ejemplar de la Tesis

La normativa general de presentación de tesis está recogida en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC (DOG de 16 de septiembre de 2020, capítulo VI), disponible en la página web, en el siguiente enlace: **https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/23274**

Todas las Tesis	
Portada	X
Idioma de la Tesis corresponde con el Idioma del Plan de Investigación	X
Resumen en gallego de ≥ 3000 palabras (excepto tesis en español o gallego)	
Figuras y gráficos, que no son de elaboración propia, cuentan con los permisos correspondientes	X

Tesis monográfica sin publicaciones		
La **estructura** de la tesis debe contener al menos los siguientes apartados que deberán estar reflejados en el índice	Resumen	
	Introducción	
	Objetivos	
	Metodología	
	Resultados	
	Conclusiones	
	Bibliografía	

Checklist do Exemplar da Tese → usc.gal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EDIUS ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA USC

Tesis con reproducción parcial de una o más publicaciones		
La **estructura** de la tesis debe contener al menos los siguientes apartados que deberán estar reflejados en el índice	Resumen	X
	Introducción	X
	Objetivos	X
	Metodología	X
	Resultados	X
	Conclusiones	X
	Bibliografía	X
La tesis debe incluir la relación de publicaciones que aportan contenidos a esta, en consonancia con el Plan de Investigación. De cada publicación se debe incluir la siguiente información:	Año de publicación	X
	El nombre y la filiación de la autoría	X
	Los nombres y filiación de todas las personas coautoras y su orden	X
	La referencia completa de la publicación	X
	La editorial y el ISSN o ISBN. En el caso de artículos con aceptación definitiva para su publicación y que en el momento de la presentación de la tesis aún no estén publicados, se añadirá su código de identificación (o DOI en las publicaciones digitales)	X
	Factor de impacto, posición relativa en la categoría que pertenecen y/u otros índices de calidad	X
	La autorización de la revista/editorial para el uso de la publicación en la tesis doctoral. De no contar con dicha autorización, el doctorando/a deberá proveer una versión publicable en el repositorio sin los contenidos que carezcan de la dicha autorización	X
	Indicación del capítulo (s) de la tesis en los que se reproducen contenidos de la publicación	X
	La contribución del doctorando/a en la publicación, en caso de que haya más personas coautoras	X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EDIUS ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA USC

Tesis por compendio de publicaciones. Al menos tres publicaciones (*)		
La **estructura** de la tesis debe contener al menos los siguientes apartados que deberán estar reflejados en el índice	Resumen	
	Introducción (en la que conste una justificación de la unidad y coherencia temática y metodológica)	
	Hipótesis y objetivos generales y específicos	
	Metodología (con la descripción de las herramientas metodológicas empleadas)	
	Discusión general que dote de coherencia y unidad los diferentes trabajos incluidos en la tesis de ≥ 5000 palabras	
	Conclusiones de la tesis	
	Bibliografía/Fuentes referenciadas	
	Copia íntegra de las publicaciones	
La tesis debe incluir la relación de **publicaciones** que aportan contenidos a esta en consonancia con el Plan de Investigación. De cada publicación se debe incluir la indexación en el año de publicación y la siguiente información:	Año de la publicación	
	El nombre y la filiación de la autoría	
	Los nombres y filiación de todas las personas coautoras y su orden	
	La referencia completa de la publicación	
	La editorial y el ISSN o ISBN. En el caso de artículos con aceptación definitiva para su publicación y que en el momento de la presentación de la tesis aún no estén publicados, se añadirá su código de identificación (o DOI en las publicaciones digitales)	
	Factor de impacto, posición relativa en la categoría que pertenecen y/u otros índices de calidad	
	La autorización de la revista/editorial para el uso de la publicación en la tesis doctoral	
	La contribución del doctorando/a en la publicación, en caso de que haya más personas coautoras	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(*) Requisitos de las publicaciones: ▪ Cuenten con la aceptación definitiva o estén ya editadas en publicaciones de ámbito y prestigio internacional con revisión anónima por pares. ▪ Estén recogidas en revistas de impacto reconocido en el ámbito científico correspondiente, en particular, aquellas incluidas en el Journal Citation Reports, JCR, o Scopus. En las áreas en que no sea aplicable este criterio, podrá sustituirse por las bases de datos relacionadas por la para estas áreas. ▪ Por lo menos una de las publicaciones deberá estar en el primer o segundo cuartil de su categoría. En las grandes áreas de Arte y Humanidades y de Ciencias Sociales y Jurídicas se permitirá que las contribuciones sean libros o capítulos de libro, con sello de calidad en edición académica o que estén incluidos en Scholarly Publishers Indicators in Humanities and Social Sciences. ▪ La contribución del doctorando/a en las publicaciones incluidas en el compendio debe ser sustancial, las publicaciones deberán ajustarse al proyecto de tesis recogido en el plan de investigación y las publicaciones deberán reflejar claramente la adscripción del doctorando/a a la USC. ▪ Ninguno de los artículos incluidos en la tesis podrá ser anterior a la fecha de matriculación en el programa de doctorado en el período de tutela académica. ▪ La afiliación del doctorado en el artículo debe incluir a la USC.	
Criterios específicos Ciencias de la Salud	
Declaración de conflictos de interés	X
Lista de adecuación estadística en caso de no cubrir ninguna de las otras tres checklist específicas.	
Para Tesis que implican a seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal: ▪ Declaración sobre su aprobación por el comité de ética de la investigación y código de registro del estudio	
▪ Copia del informe favorable	
▪ En su caso, declaración de que los datos se basan en información anónima y por tanto no se necesita aprobación del comité de ética de la investigación	
▪ Si el estudio es observacional, checklist STROBE	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EDIUS ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA USC

Para Tesis que describen un ensayo clínico:	▪ Declaración sobre su autorización por la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios	
	▪ Copia de la autorización	
	▪ Checklist CONSORT	
Para Tesis que usan células troncales humanas, embrionarias o inducidas:	▪ Declaración sobre su autorización	
	▪ Referencia de la autorización	
	▪ Copia de la autorización	
Para Tesis que incluyen estudios con animales de experimentación	▪ Número de la autorización del proyecto de experimentación animal y registro del centro de usuario autorizado si es español	X
	▪ Declaración de su autorización	X
	▪ Copia del certificado de capacitación si los experimentos los ha hecho el doctorando	X
	▪ Indicación de la persona, empresa o servicio que llevó a cabo el experimento en su caso	X
	▪ Checklist ARRIVE	X

En Santiago de Compostela **, a** 10 **de** Septiembre **de 20** 24

Firmado, Sandra Moraña Fernández

Fdo. MORAÑA FERNANDEZ SANDRA - 77480711J

Firmado digitalmente por MORAÑA FERNANDEZ SANDRA - 77480711J
Fecha: 2024.09.09 11:38:48 +02'00'

Checklist do Exemplar da Tese → usc.gal

Lista de verificación para Tesis con animales de experimentación. **EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ARRIVE**

Sí/no/NA		página
	Título	
SI	Proporcionar una descripción tan exacta y concisa como sea posible sobre el contenido del trabajo.	
	Resumen	
Si	Proporcionar un resumen preciso de los antecedentes, los objetivos de la investigación, incluyendo detalles de la especie y cepa de los animales utilizados, métodos relevantes, hallazgos principales y conclusiones del estudio.	XV-XX
	Antecedentes	
Si	Incluir suficientes antecedentes científicos (incluyendo las referencias pertinentes al trabajo anterior) a fin de comprender la motivación y el contexto para el estudio, y explicar las bases y el enfoque experimental.	1-70
Si	Explicar cómo y por qué la especie y el modelo animal utilizados permiten abordar los objetivos científicos y, cuando sea apropiado, la relevancia del estudio para la biología humana.	78,79
	Objetivos	
Si	Describir claramente los objetivos primarios y secundarios del estudio, o las hipótesis específicas que se van a probar.	73
	Declaración Ética	
Si	Indicar el permiso del comité ético, y las leyes o decretos pertinentes para el cuidado y uso de animales, bajo las que se realiza la investigación.	77,78, 281-296
	Diseño del estudio	
Si	Número de grupos experimentales y control.	82
Si	Cualquier medida adoptada para minimizar los efectos de sesgo subjetivo al asignar los animales a los grupos de tratamiento (por ej., procedimiento aleatorio) y al evaluar los resultados (por ej., si se hace, describir quiénes eran ciegos y cuándo).	82
Si	La unidad experimental (por ej., un solo animal, grupos o jaulas de animales). Un diagrama cronológico o de flujo pueden ser útiles para ilustrar cómo se realizaron los diseños de estudio complejos.	82
	Procedimientos experimentales	
Si	Cómo (por ej., formulación y dosis del tratamiento, el sitio y la vía de administración, anestesia y analgesia utilizadas [incluyendo la monitorización], procedimiento quirúrgico, el método de eutanasia). Proporcionar detalles de cualquier equipo especializado utilizado, incluyendo proveedor(es).	78-80 82-83
NA	Cuándo (por ej., la hora del día).	
NA	Dónde (por ej., jaula de alojamiento, laboratorio, prueba del laberinto acuático).	
Si	Por qué (por ej., fundamentos para la elección del anestésico específico, la vía de administración, dosis del fármaco utilizado).	82-83
	Animales de experimentación	
Si	Proporcionar detalles de los animales utilizados, incluyendo especie, cepa, sexo, etapa de desarrollo (por ej., edad media o mediana de	78-79

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	edad y rango) y peso (por ej., media o mediana más rango de peso).	
Si	Proporcionar otra información pertinente, como la procedencia de los animales, nomenclatura internacional de la cepa, modificación genética (por ej., animal deficiente o transgénico), genotipo, estado de salud/inmune, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido tratamientos anteriormente, procedimientos previos, etc.	78-79
	Animales	
Si	Alojamiento (tipo de instalación por ej., libre de patógenos específicos [SPF], tipo de jaula o habitáculo, material del lecho, número de animales por jaula, forma y material del tanque, etc. para peces).	78-79
Si	Condiciones de cría (por ej., programa de reproducción, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, calidad de agua, etc. para peces, el tipo de alimentación, el acceso a los alimentos y al agua, enriquecimiento ambiental).	78-79
NA	Evaluaciones e intervenciones relacionadas con el bienestar que se llevaron a cabo antes, durante o después del experimento	
	Tamaño de la muestra	
Si	Especificar el número total de animales utilizados en cada experimento, y el número de animales en cada grupo experimental.	117-132, 139-159
No	Explicar cómo se determinó el número de animales. Proporcionar detalles del cálculo del tamaño muestral utilizado.	
NA	Indicar el número de repeticiones independientes de cada experimento, si es pertinente.	
	Asignación de animales a grupos experimentales	
Si	Proporcionar detalles completos de la forma en que los animales fueron asignados a grupos experimentales, incluyendo distribución aleatoria o asignación específica, si así se hizo.	82
NA	Describir el orden en el que los animales en los diferentes grupos experimentales fueron tratados y evaluados.	
Si	Resultados experimentales 12 Definir claramente los resultados primarios y secundarios evaluados (por ej., muerte celular, marcadores moleculares, cambios de comportamiento).	117-132, 139-159
	Métodos estadísticos	
Si	Proporcionar detalles sobre los métodos estadísticos utilizados para cada análisis.	112-114, 117-132, 139-159
Si	Especificar la unidad de análisis para cada grupo de datos (por ej., un solo animal, grupo de animales, neurona individual).	112-113
No	Describir los métodos utilizados para evaluar si los datos corroboran las suposiciones del método estadístico.	
	Datos basales	
No	Para cada grupo experimental, indicar las características relevantes y estado de salud de los animales (por ej., peso, estado microbiológico, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido drogas anteriormente) antes de iniciar el tratamiento o prueba. (Esta información puede ser a menudo tabulada).	
	Cantidades analizadas	
Si	Indicar el número de animales en cada grupo incluido en cada análisis. Presentar números absolutos (por ej., 10/20, no 50 %2).	117-132,

		139-159
Si	Si alguno de los animales o datos no fue incluido en el análisis, explicar por qué.	82, 112
	Resultados y Discusión	
Si	Indicar los resultados de cada análisis llevado a cabo, con una medida de precisión (por ej., error estándar o intervalo de confianza).	112-114, 117-132, 139-159
	Eventos adversos	
Si	Dar detalles de todos los eventos adversos importantes en cada grupo experimental.	82
NA	Describir las modificaciones a los protocolos experimentales realizadas para reducir los eventos adversos.	
	Interpretación /implicaciones científicas	
Si	Interpretar los resultados, teniendo en cuenta los objetivos y las hipótesis del estudio, la teoría actual y otros estudios pertinentes en la literatura.	117-132, 139-159, 167-186
NA	Comentar las limitaciones del estudio incluyendo cualquier fuente potencial de sesgo, cualquier limitación del modelo animal y la imprecisión asociada con los resultados	
NA	Describir cualquier implicación de los métodos experimentales o hallazgos para el reemplazo, refinamiento o reducción (las 3 R) del uso de los animales en investigación.	
	Capacidad de generalización/aplicabilidad	
NA	Comentar si, y de qué forma, los hallazgos de este estudio son aplicables a otras especies o sistemas, incluyendo cualquier relevancia para la biología humana.	
	Financiación	
Si	Listar todas las fuentes de financiación (incluyendo el número del proyecto) y el papel de la fuente(s) de financiación en el estudio.	309

Basado en The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporrting of In Vivo Experiments.

Firma Doctorando

MORAÑA FERNANDEZ SANDRA - 77480711J

Firmado digitalmente por MORAÑA FERNANDEZ SANDRA - 77480711J
Fecha: 2024.09.12 10:50:02 +02'00'

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO VI: FINANCIACIÓN

Contratos predoctorales:

Resolución 11/2019, da Universidade de Santiago de Compostela, pola que se convoca concurso público de méritos, para a contratación de mozos investigadores que se inicien na labor investigadora dentro do programa científico do Centro de Investigación en Medicina Molecular e Enfermidades Crónicas (CiMUS) (15/10/2019-16/09/2020)

Axudas de apoio á etapa predoutoral 2020 - Modalidade A. Xunta de Galicia (16/09/2020-15/09/2023).

Proyectos:

Instituto Nacional de Salud "Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III" Madrid, España (PI18/00821)

Instituto Nacional de Salud "Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III" Madrid, España (PI21/01145)

Axencia Galega de Innovación (GAIN): Axudas do programa de consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas (GPC IN607B 2021 108).

Contrato privado con la empresa Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, DEU), suministradora del fármaco empagliflozina y financiadora del proyecto.

Contrato privado con la empresa Novartis (Basilea, CHE), suministradora del fármaco sacubitril/valsartán.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA





Los factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial, etc., son cruciales en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (IC). En esta tesis doctoral se han evaluado los efectos cardiometabólicos de dos medicamentos que han destacado en los últimos años en endocrinología y medicina cardiovascular, la empagliflozina, un antidiabético oral, y el sacubitril/valsartán, empleado en el tratamiento de la IC. Este trabajo de tesis se ha centrado en el estudio de la regulación del metabolismo energético a nivel cardíaco y adiposo *in vitro* e *in vivo*, concretamente en un modelo animal de diabetes y obesidad tratado con empagliflozina y en un modelo animal de IC con fracción de eyección preservada tratado con sacubitril/valsartán.