

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Análisis proteómico de las vías de señalización moduladas por
fármacos antidiabéticos en células endoteliales de arteria
coronaria**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Cindy Manríquez Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Cindy Manríquez Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Director de tesis

Dra. Nadia Lizeth Caram Salas

Dr. Israel Marck Martínez Pérez



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Cindy Manríquez Rodríguez © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Cindy Manríquez Rodríguez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Análisis Proteómico de las vías de señalización moduladas por fármacos antidiabéticos en células endoteliales de arteria coronaria

Resumen aprobado por:

Dr. Aldo Moreno Ulloa

Director de tesis

La DMT2 confiere un elevado riesgo de mortalidad por complicaciones cardiovasculares (CVD), a pesar de existir un gran repertorio de fármacos antidiabéticos (ADD) en la clínica que regulan la glucosa en sangre sujetos con DMT2, estos individuos aún bajo tratamiento siguen presentando un mayor riesgo de CVD y mortalidad que sujetos sin la enfermedad. A pesar de esto existen algunos fármacos como la empagliflozina que se ha demostrado en la clínica parecer reducir el riesgo de las CVD y mortalidad en DMT2, por otro lado, hay fármacos como rosiglitazona que incrementan la incidencia de algunas complicaciones cardiacas. Los mecanismos moleculares efectores de daño/protección CDV aún no están esclarecidos. En el presente trabajo de tesis, se planteó investigar los efectos moleculares de cuatro ADD de distintas clases y diferentes mecanismos de acción antihiper glucemiante, en un modelo in vitro de Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) –con papel relevante en el contexto de las CDV –utilizando una metodología de proteómica cuantitativa STWATH. Se realizó el análisis bioinformático a través de dos enfoques distintos; 1) Creamos una red o templado de las vías de señalización asociadas a daño celular, que generamos con una lista de proteínas moduladas por la citocina proinflamatoria TNF- α (10 ng/mL), realizando un análisis de enriquecimiento funcional con las bases de datos de REACTOME y KEGG usando el software ClueGo de Cytoscape. También expandimos nuestra red de daño celular utilizando datos de células endoteliales tratadas con la citocina IL-1B. 2) Utilizamos una red de interacción de proteínas (PPI) con la base de datos STRING en la plataforma en línea OmicsNet. Para obtener los datos se trataron las HCAEC con los ADD en concentraciones fisiológicas (reportadas en la clínica) de metformina (100 μ M), rosiglitazona (1 μ M), saxagliptina (1 μ M), empagliflozina (1 μ M) y vehículo (DMSO) por 4 hrs. Se encontró de manera general que los 4 ADD modularon de manera antagónica las vías pertenecientes a las citocinas principalmente en vías pertenecientes al sistema inmune como degranulación de neutrófilos y señalización por interleucinas; además de modular vías de señalización relacionadas al metabolismo de proteínas. En conclusión, gracias a los dos enfoques bioinformáticos observamos efectos antiinflamatorios modulados en los ADD que pudieran explicar los efectos CVD observados en la clínica.

Palabras clave: fármacos antidiabéticos, endotelio coronario, diabetes, espectrometría de masas

Abstract of the thesis presented by **Cindy Manríquez Rodríguez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Proteomic analysis of the signaling pathways modulated by Antidiabetic Drugs on Coronary Artery Endothelial Cells

Abstract approved by:

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Thesis Director

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) confers an elevated risk of mortality due to cardiovascular disease (CVD). Despite the great repertoire of antidiabetic drugs (ADD) that regulate blood glucose in subjects with T2DM, only a few (e.g., empagliflozin) have demonstrated clear benefits on CVD endpoints, while others are associated with adverse cardiovascular effects (e.g., rosiglitazone). Yet, the direct effects of ADD on coronary endothelium —involved in CVD development— are not known. In this study, we explored the effects of four ADD (including empagliflozin and rosiglitazone) on Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC) using quantitative proteomics and bioinformatics. HCAEC were treated with clinically relevant concentrations of metformin (100 μ M), rosiglitazone (1 μ M), empagliflozin (1 μ M), saxagliptin (1 μ M) or vehicle (DMSO) for 48 hrs. SWATH-based proteomics was used to determine protein abundance differences among groups (ADD vs. vehicle). Two different bioinformatics (OmicsNet and ClueGO) approaches were utilized to explore the signaling pathways (REACTOME and KEGG Databases) modulated by the ADD. We further created an integrated protein network between the ADD and well-known inflammatory cytokines (TNF α and IL-1 β) to explore the anti-inflammatory effects of the ADD. Bioinformatic approaches revealed a down-modulation of signaling pathways linked to inflammation by all ADD, but at different levels. TNF α -triggered activation of p53 and NF-kappaB signaling, while all ADD, excepting saxagliptin, down-modulated proteins involved in p53 signaling (within the top 10 significant pathways). We observed that the 4 ADDs antagonistically modulated the pathways belonging to cytokines, mainly in pathways belonging to the immune system such as neutrophil degranulation and interleukin signaling. We can conclude that ADD modulate signaling pathways associated with inflammation and mitochondrial activity, which may account for their beneficial glucose-lowering independent effects on HCAEC.

Keywords: antidiabetic drugs, coronary endothelium, diabetes, mass spectrometry

Dedicatoria

Para mi mamá, mi papá, mi sista, y mi brother, por su apoyo incondicional, cariño y soporte en todas las etapas de mi formación, en especial en esta maestría, los amo.

Para todos los que siempre están presentes y para los que ya no están, pero no se fueron.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico recibido a través de la beca de maestría con el número de becario: 837732.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), a la División de Biología experimental y aplicada, así como al departamento de Innovación Biomédica por permitirme realizar mis estudios de maestría y hacer uso del equipo necesario para la realización del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Aldo Moreno Ulloa por aceptarme en su laboratorio, ser un guía y mentor para la realización de mi trabajo de tesis y para mi formación en la ciencia, además por alentarme a dar siempre ese esfuerzo extra enfocado.

A mi comité de tesis: Dra. Nadia Lizeth Caram Salas y Dr. Israel Marck Martínez Pérez por sus observaciones y correcciones, además de la disposición y amabilidad que tuvieron conmigo durante el tiempo que realicé mi trabajo de tesis.

A la Psic. Yahaira Castañeda por el apoyo psicológico que fue de gran ayuda durante el último año de mi estancia en CICESE.

A mis amigas Alison, por escucharme y estar presente en mi vida todos estos añitos que atesoro; y a Vero en la que encontré a una de mis mejores amigas, compañera de risas y pláticas de té *in english*. A mis amigos Paloma, Isaí, Sadot, Itzae, Diana y Monse por sus palabras de aliento, apoyo, resolución de dudas, y hasta compartir las dolencias de la maestría, que hicieron de esta experiencia mucho mejor.

A Aran por su tiempo y disposición para las asesorías y correcciones con el idioma inglés. Además de siempre creer en mí.

A todos los miembros del MS2 (actuales y pasados) que de alguna u otra manera han apoyado, con consejos, correcciones, asesorías y amistad.

Al player #1 Erick que estos años no solo fue un hermano mayor académico (con la mejor disposición a resolver todas las dudas académicas que me surgieron), fue un mentor de vida y un gran amigo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Diabetes.....	1
1.1.2 Fisiopatología y complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).....	3
1.1.3 Endotelio coronario y complicaciones macrovasculares.....	5
1.1.4 Terapia farmacológica de la DMT2.....	8
1.1.4.1 Efectos de los fármacos antidiabéticos (ADD) sobre las complicaciones cardiovasculares	9
1.1.4.2 Efectos de los ADD sobre el endotelio	12
1.1.5 Proteómica.....	15
1.1.5.1 Métodos para el estudio del proteoma.....	15
1.1.5.2 Aplicación de la proteómica para el estudio de mecanismos de acción de compuestos y fármacos en patologías	17
1.2 Justificación	19
1.3 Hipótesis	19
1.4 Objetivos.....	20
1.4.1 Objetivo general	20
1.4.2 Objetivos específico.....	20

Capítulo 2. Metodología

2.1 Tratamiento de las Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) con los ADD.....	21
2.2 Extracción y procesamiento de proteínas para la generación de péptidos trípticos.....	22
2.3 Obtención de datos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	23
2.3.1 Análisis por cromatografía de líquidos (LC).....	23

2.3.2 Análisis por adquisición dependiente de datos (DDA)-Preparación de la biblioteca espectral	23
2.3.3 Análisis por adquisición independiente de datos (DIA).....	24
2.4 Análisis de datos y cuantificación diferencial de la abundancia proteínica entre los grupos de fármacos utilizando softwares bioinformáticos	24
2.5 Elucidación y comparación de las vías de señalización moduladas por los fármacos empleando softwares informáticos.....	26
2.5.1 Propagación de los datos mediante ClueGo en Cytoscape	26
2.5.2 Propagación de los datos mediante OmicsNet	27
2.6 Análisis de las vías de señalización resultantes más significativas	28
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Creación de la biblioteca espectral y cuantificación diferencial de la abundancia proteínica entre los grupos de los fármacos utilizando softwares bioinformáticos	29
3.2 Identificación de vías de señalización representadas por las proteínas moduladas por los ADD y las citocinas proinflamatorias	33
3.2.1 Propagación de los datos mediante ClueGo en Cytoscape	33
3.2.2 Propagación de los datos mediante OmicsNet	35
Capítulo 4 . Discusión.....	42
Capítulo 5 . Conclusiones.....	47
Literatura citada.....	48
Anexos.....	60

Lista de figuras

Figura		Página
1	Mortalidad por Diabetes Mellitus (DM) en México (Obtenido de INEGI, 2019).....	2
2	Tabla de mortalidad por Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) de 1990 a 2015 en México..	3
3	Octeto ominoso de la hiperglucemia en la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2).....	4
4	Funciones del endotelio. Diseño propio con imágenes de Servier Medical.....	6
5	Esquema general de los mecanismos de daño vascular inducidos por la hiperglucemia.....	7
6	Espectrometría de masas (MS) en Tándem (MS ²) de alta resolución.....	16
7	Representación gráfica de los enfoques para el estudio del proteoma basado en espectrometría de masas en Tandem (MS ²).....	17
8	Descripción general del método de adquisición de datos SWATH-MS.....	18
9	Esquema de tratamiento seguido en este estudio. Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) fueron tratadas con los fármacos antidiabéticos (ADD) y vehículo (DMSO).....	21
10	Propagación de los datos mediante ClueGo.....	27
11	Propagación de datos mediante OMICsNet.....	28
12	Representación del análisis de enriquecimiento de ontología de genes (GO), empleando el término componente celular, del proteoma de las células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC).....	29
13	Análisis en NormalyzerDE® versión 1.3.4 para encontrar el método de normalización adecuado para nuestros sets de datos.....	30
14	Cuantificación del número de proteínas moduladas (incrementadas y disminuídas) en HCAEC por los fármacos antidiabéticos (ADD) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α).....	32
15	Gráficos de volcán de la expresión diferencial de las proteínas moduladas por los fármacos antifdiabéticos (ADD) y TNF- α con relación al control	32
16	Vías de señalización representadas significativamente empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α . Análisis bioinformatico por ClueGo en Cytoscape con la base de datos de Reactome y KEGG.....	33
17	Vías de señalización representadas significativamente empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α , disminuídas por los fármacos antidiabéticos (ADD) utilizando las bases de datos de Reactome y KEGG...	35

18	Red molecular creada en OmicsNet por el interactoma de las proteínas (PPI) de los fármacos antidiabéticos (ADD) y la base de datos STRING.....	38
19	Diagramas de Venn de las vías de señalización aumentadas y disminuídas con los fármacos antidiabéticos (ADD).....	39
20	Red molecular creada en OmicsNet por el interactoma de las proteínas (PPI) de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL 1B y la base de datos STRING.....	41

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Principales complicaciones vasculares en sujetos con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)	5
2 Terapia farmacológica para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) en los Estados Unidos. Modificada del manual Standars Care of Diabetes 2020.....	8
3 Propiedades y efectos cardiovasculares de los fármacos antidiabéticos utilizados para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2).....	10
4 Lista con los identificadores Uniprot para las proteínas procedentes de los experimentos con los ADD que resultaron con cambios significativos en sus abundancias ($FC \pm 1.2$; $p < 0.05$).....	31
5 Vías de señalización más significativas asociadas a inflamación moduladas por las citocinas.....	34
6 Vías de señalización más significativas empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α , disminuídas por los fármacos antidiabéticos (ADD).....	35
7 Vías de señalización significativas identificadas en OmicsNet para los distintos fármacos antidiabéticos (ADD).....	36
8 Vías de señalización más significativas deducidas con la interacción entre proteínas (PPI) de las citocinas con la base de datos de STRING.	40
9 Metabolismo y farmacocinética de los fármacos antidiabéticos (ADD).....	60
10 Gradiente de elución cromatográfica empleado para la metodología de SAWTH LC-MS ²	61
11 Parámetros para la adquisición dependiente de datos (DDA).....	62
12 Parámetros para la adquisición Independiente de datos (DIA) tipo SWATH-MS.....	62
13 Ventanas de adquisición para la cuantificación SWATH-MS.....	63
14 Identificadores del proteoma de las Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC).....	65
15 Vías de señalización empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α , disminuídas por los fármacos antidiabéticos (ADD) con las bases de datos de Reactome y KEGG.....	70
16 Vías de señalización moduladas por los fármacos antidiabéticos obtenidas con OmicsNet.....	76

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica metabólica caracterizada por niveles anormalmente elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia). Debido a su cronicidad y severidad, la DM conlleva a una atención médica continua por sus afectaciones a la salud humana, requiriendo de medidas que se enfocan en la reducción de riesgos multifactoriales y no solo en la reducción de la hiperglucemia (*American Diabetes Association(ADA), 2020*).

La DM se puede clasificar en varios tipos incluyendo, la DM tipo uno (DMT1), DM tipo dos (DMT2), gestacional (DMG), entre otras (p. ej. inducida por fármacos y de origen genético). La DMT1, se caracteriza por manifestar una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que deriva en una deficiencia absoluta o parcial de la producción de la insulina. La DMG es diagnosticada cuando se presenta hiperglucemia durante el segundo o tercer trimestre del embarazo, sin existir otro tipo de diabetes. Otros tipos de diabetes existentes son el síndrome de diabetes monogénica, enfermedades del páncreas exocrino y la diabetes inducida por medicamentos o sustancias químicas. Estas últimas, sin embargo, son menos frecuentes que la DMT1 y DMT2 (ADA, 2020).

La DMT2 es el tipo de diabetes más común; representando aproximadamente el 90 % de todos los casos diagnosticados. Esta patología se caracteriza por la presencia de resistencia periférica a la insulina e insuficiencia de las células β pancreáticas (DeFronzo et al., 2015; Kahn, 1994). En México, los datos epidemiológicos más recientes muestran una prevalencia de la enfermedad del 9.4% (IC95% 8.3%-10.8%) (Rojas-Martínez et al., 2018), y, se proyecta que siguiendo el comportamiento actual, los porcentajes de prevalencia rondan entre el 13.7% al 22.5% para 2050 (Meza et al., 2015). Según las proyecciones de la Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés), se estima que para el año 2030 aproximadamente 500 millones de personas tendrán DMT2 a nivel mundial (ADA, 2020).

En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que en el año 2018 la segunda causa de muerte entre la población estaba relacionada con la diabetes, según la tasa obtenida de 8.1 muertes por cada 10,000 habitantes. En ese año, la DMT2 contribuyó al 70.81% de todas las muertes relacionadas con algún tipo de DM (**Figura 1**) (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2019)(INEGI,

2019). En las últimas décadas, la tasa de mortalidad por causas relacionadas con la DMT2 ha aumentado (Medina-Gómez y Medina-Reyes, 2018). De 1990 a 2015, la tasa de mortalidad de la DMT2 incrementó del 29.6 (6.1% del total de defunciones por cualquier causa) al 84.4 (15% del total de defunciones por cualquier causa) por cada 100,000 personas (**Figura 2**) (Soto-Estrada et al., 2018).

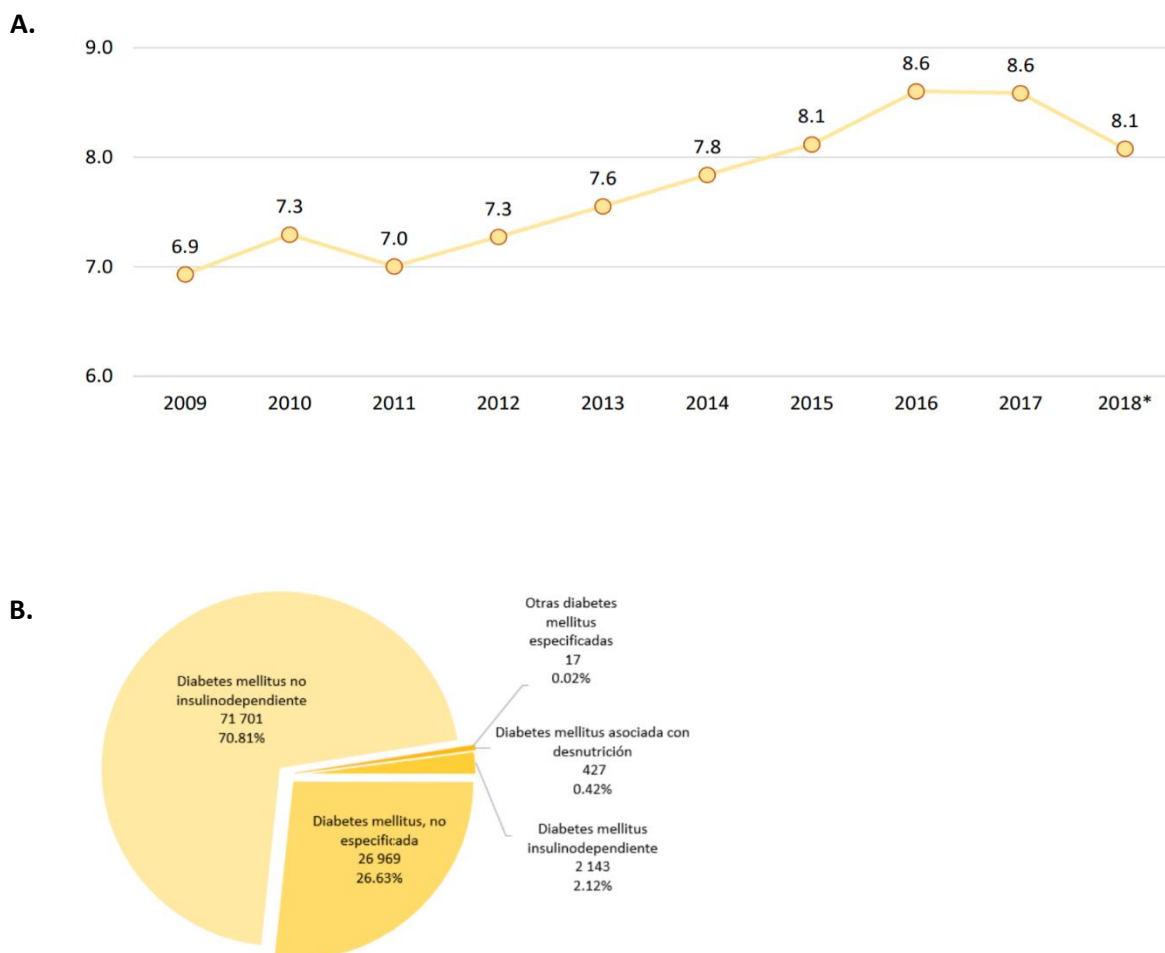


Figura 1. Mortalidad por Diabetes Mellitus (DM) en México (Obtenido de INEGI, 2019). **A.** Se observa el gráfico para la tasa de defunciones registradas por DM por cada 10 000 habitantes del año 2009 al año 2018. *En el año 2018 cambiaron los criterios estadísticos, añadiéndose medidas de exclusión para algunas situaciones. Siguiendo el criterio anterior la tasa resultante para el 2018 sería de 8.6. **B.** Gráfico de la distribución de defunciones entre los distintos tipos de DM.

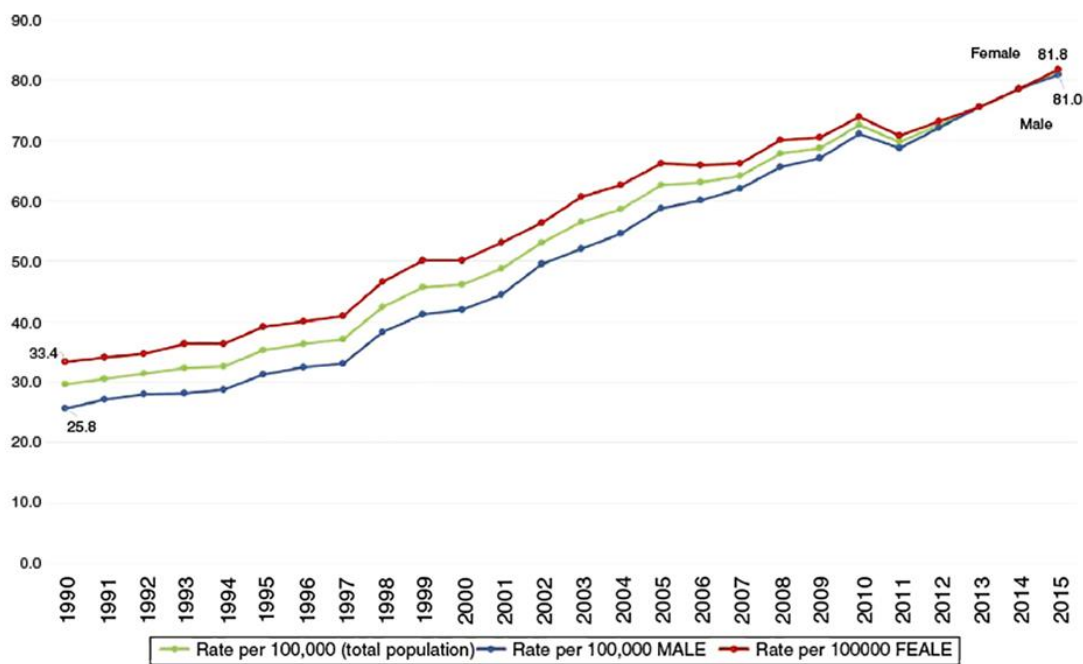


Figura 2. Tabla de mortalidad por Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) de 1990 a 2015 en México (Obtenido de Soto-Estrada et al., 2018).

1.1.2 Fisiopatología y complicaciones de la DMT2

La fisiopatología de la DMT2 se compone de varios procesos moleculares, celulares y fisiológicos en distintos órganos y sistemas tales como el páncreas, hígado, tejido adiposo, cerebro, riñón, sistema vascular, sistema digestivo y músculo esquelético. Algunos autores describen un conjunto de 8 mecanismos en varios órganos como los de mayor relevancia en contribuir a la hiperglucemia, al cual denominan “el octeto ominoso” (**Figura 3**) (Defronzo et al., 2015). Estos mecanismos son: 1) reducido efecto de la incretina, 2) aumento en la lipólisis, 3) aumento en la reabsorción de glucosa, 4) disminución de la captación de la glucosa, 5) disfunción de neurotransmisores, 6) resistencia a la insulina vascular, 7) aumento en la producción hepática de la glucosa y, 8) disminución en la secreción de la insulina con aumento en la secreción de glucagón (Defronzo, 2009). De los varios mecanismos descritos, la resistencia a la insulina periférica y la disfunción progresiva de las células beta pancreáticas han sido los mecanismos de mayor estudio y son descritos como característicos de la DMT2 (López Stewart, 2009).

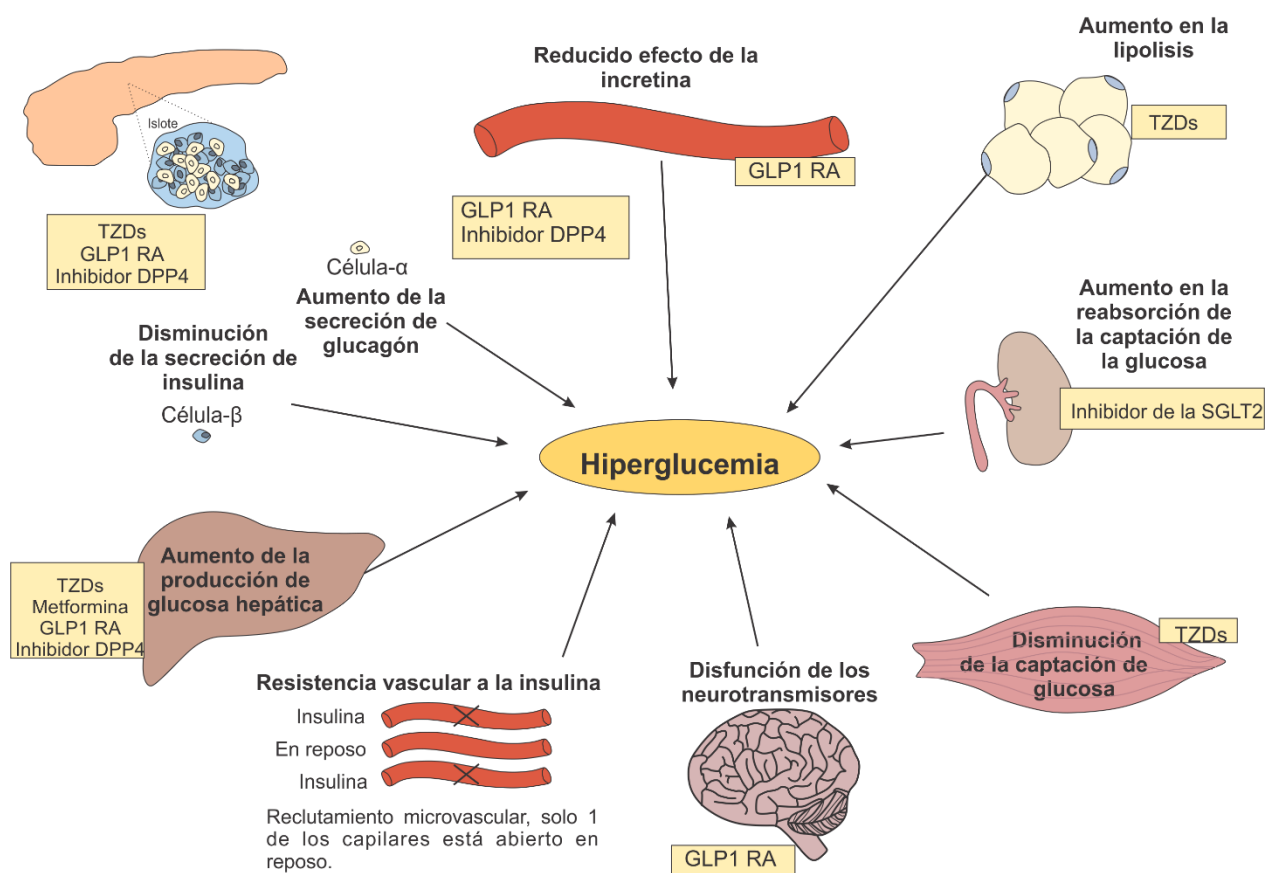


Figura 3. Octeto ominoso de la hiperglucemia en la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) (Modificado de DeFronzo et al., 2015).

Por su cronicidad, la DMT2 provoca afectaciones en la función de distintos órganos, principalmente en los riñones, nervios, ojos, cerebro y corazón (International Diabetes Federation (IDF), 2017). Estas afectaciones se dividen en complicaciones microvasculares (lesiones de vasos sanguíneos de menor grosor) y macrovasculares (lesiones de los vasos sanguíneos de mayor grosor) como se muestra en la **Tabla 1** (DeFronzo et al., 2015; Tancredi et al., 2015). De esta manera notable, las complicaciones macrovasculares <<infarto agudo al miocardio [IAM] y evento cerebrovascular [ECVA]>> contribuyen a la principal causa de muerte en sujetos con DMT2 (Corrales-santander et al., 2018).

Afortunadamente, la reducción de la hiperglucemia se asocia con un menor riesgo de complicaciones microvasculares, sin embargo, el mismo fenómeno no ocurre con las complicaciones macrovasculares (Rawshani et al., 2018; Tancredi et al., 2015).

Tabla 1. Principales complicaciones vasculares en sujetos con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2).

Complicaciones cardiovasculares		
Microvasculares	Macrovasculares	
<i>Nefropatía</i> <i>Neuropatía</i> <i>Retinopatía</i>	<i>Enfermedad arterial coronaria</i>	<i>Enfermedad arterial periférica</i>
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Angina de pecho ▪ Infarto agudo al miocardio (IAM) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Evento cerebrovascular (ECVA) ▪ Encefalopatía diabética <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pie diabético

Las personas con DMT2 son más propensas a desarrollar problemas cardíacos y morir prematuramente comparado con sujetos sin diabetes. Precisamente, estudios epidemiológicos sugieren un incremento en la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares del 29%-70% en distintos grupos de sujetos con DMT2 (con respecto a individuos sin la enfermedad), inclusive cuando estos están bajo tratamiento farmacológico (Rawshani et al., 2018; Tancredi et al., 2015; The Emerging Risk Factors Collaboration, 2011). De esta manera al ser el corazón uno de los órganos intrínsecamente involucrados en la mortalidad de sujetos con DMT2 (M. S. Shah y Brownlee, 2016) se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* que tratan de dilucidar las afectaciones que la hiperglucemia causa en el tejido cardíaco y circundante (Erickson et al., 2013; Luo et al., 2013; Molgat et al., 2014; Ramasamy y Goldberg, 2010; Thornalley et al., 2003; Yao y Brownlee, 2010). Sin embargo, aún faltan más estudios en células que modulan directamente la función del corazón; que permitan con mayor relevancia determinar los mecanismos que participan en el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares.

1.1.3 Endotelio coronario y complicaciones macrovasculares

El adecuado funcionamiento del corazón está modulado por la función del endotelio coronario (Gimbrone y García-Cardena, 2016). El endotelio es un órgano constituido por una monocapa de células endoteliales, que cumple con varias funciones dentro del organismo entre las que destacan la creación de una superficie anti trombogénica, el mantenimiento del tono vascular, la angiogénesis y migración y el reclutamiento de células inmunológicas (**Figura 4**) (Gimbrone y García-Cardena, 2016).

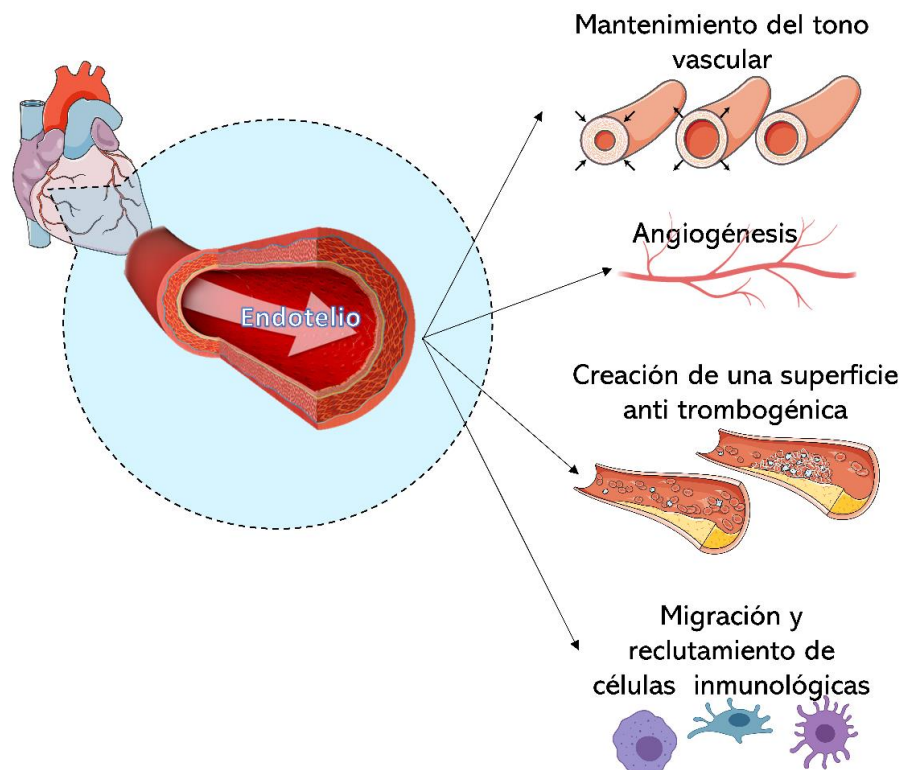


Figura 4. Funciones del endotelio. Diseño propio con imágenes de Servier Medical.

La alteración de alguna de las funciones del endotelio da origen a un fenómeno conocido como disfunción endotelial, la cual se cree propicia el desarrollo y progresión de las complicaciones cardiovasculares (CVD) (p. ej. IAM) (Sena et al., 2013; Widmer y Lerman, 2014). Se ha descrito en la clínica -estudio en 308 sujetos con seguimiento por 46 meses- que la disfunción endotelial coronaria epicárdica y microvascular predice de manera independiente eventos macrovasculares agudos en pacientes con y sin aterosclerosis coronaria (Halcox et al., 2002). Esto indica la importancia de la función del endotelio coronario en la salud cardiovascular.

Perturbaciones a nivel molecular en el endotelio coronario pueden contribuir a la disfunción endotelial. La hiperglucemia es uno de las condiciones que altera la función endotelial mediante mecanismos moleculares como la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución en la producción y biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), formación de productos avanzados de la glicosilación (PAGES), activación de la proteína cinasa C (PKC), inflamación mediada por el factor nuclear

kappa β (NF- κ B), entre otros (**Figura 5**) (Cruz Hernández et al., 2012; Kinaan et al., 2015; Paneni et al., 2013; M. Wang et al., 2015).

Aunque existe una relación directa entre la reducción de la hiperglucemia y el mejoramiento de las complicaciones microvasculares, el mismo fenómeno no ocurre con las complicaciones macrovasculares (Casanova et al., 2017). Esto podría sugerir mecanismos independientes de la hiperglucemia en el desarrollo de dichas complicaciones; no obstante, hasta el momento no existen datos suficientes que traten de explicar este fenómeno.

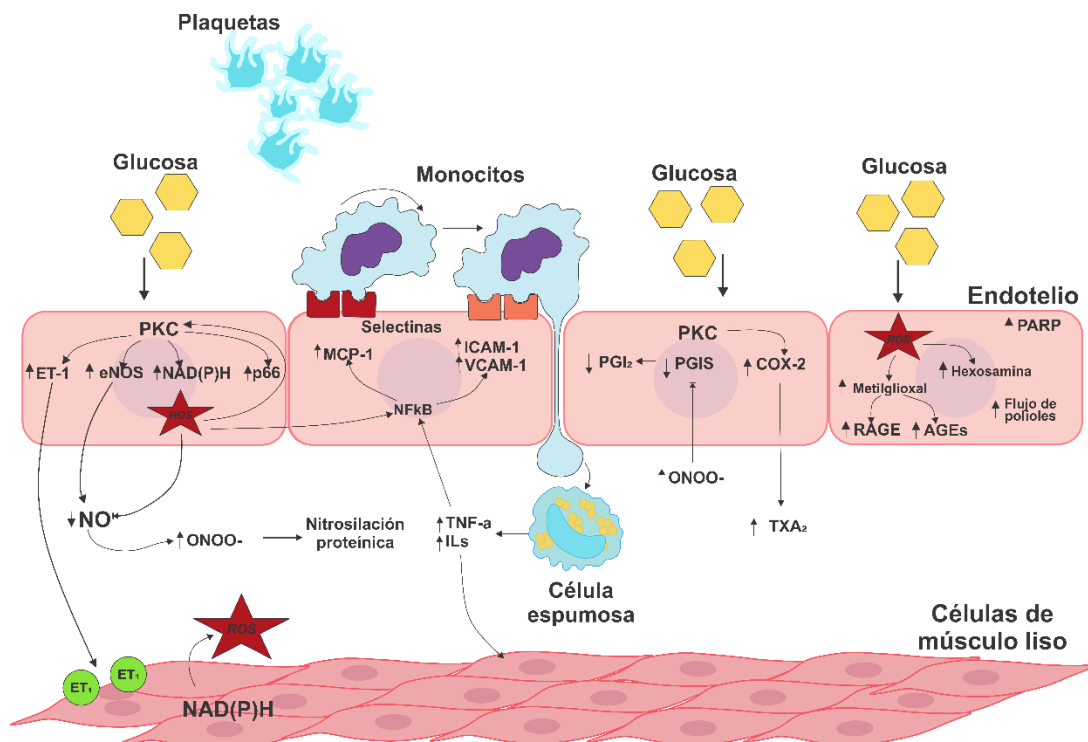


Figura 5. Esquema general de los mecanismos de daño vascular inducidos por la hiperglucemia. (Modificado de Paneni et al., 2013). Abreviaturas: PKC, proteína cinasa C; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; ET1, endotelina 1; ROS, especies reactivas de oxígeno; NO, óxido nítrico; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1; VCAM-1, molécula de adhesión de células vasculares-1; ICAM-1, molécula de adhesión celular intracelular-1; AGE, producto final de glicación avanzada.

1.1.4 Terapia farmacológica de la DMT2

Existen diversas estrategias terapéuticas para la reducción de la hiperglucemia y la hemoglobina glucosilada (HbA1c, parámetro que refleja el valor promedio de glucosa en sangre en los últimos 3 meses) en sujetos con DMT2, las cuales se dividen principalmente en farmacológicas y no farmacológicas. La

estrategia no farmacológica está dirigida a cambios en el estilo de vida, de dieta y actividad física del paciente.

Tabla 2. Terapia farmacológica para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) en los Estados Unidos. Modificada del manual *Standards Care of Diabetes 2020*.

Clase	Compuesto(s)	Máxima dosis diaria aprobada
Biguanidas	<ul style="list-style-type: none"> • Metformina 	2,000 mg 2550 mg 1500 mg
Sulfonilureas (2da generación)	<ul style="list-style-type: none"> • Glimepirida • Glipizida • Glibenclamida 	8 mg 40 mg 20 mg 12 mg 20 mg
Tiazolidinedionas	<ul style="list-style-type: none"> • Pioglitazona • Rosiglitazona 	45 mg 8 mg
Inhibidores de la α-glucosidasa	<ul style="list-style-type: none"> • Acarbosa • Miglitol 	300 mg 300 mg
Meglitinidas(glinidas)	<ul style="list-style-type: none"> • Nateglidina • Repaglinida 	360 mg 16 mg
Inhibidores de la dipeptil peptidasa 4 (DPP-4)	<ul style="list-style-type: none"> • Alogliptina • Saxagliptina • Linagliptina • Sitagliptina 	25 mg 5 mg 5 mg 100 mg
Inhibidores del cotransportador de sodio glucosa 2 (SGLT2)	<ul style="list-style-type: none"> • Ertugliflozina • Dapagliflozina • Empagliflozina • Canagliflozina 	15mg 10 mg 25 mg 300 mg
Receptores agonistas del péptido similar al glucagón 1(GLP-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Exenatida (Liberación prolongada) • Exenatida • Dulaglutida • Semaglutida • Liraglutida • Lixisenatida 	2 mg 20 μ g 1.5 mg 1mg, 14 mg 1.8 mg 20 μ g
Secuestradores de ácidos biliares	<ul style="list-style-type: none"> • Colesevelam 	3.75 mg
Agonistas de la dopamina-2	<ul style="list-style-type: none"> • Bromocriptina 	4.8 mg
Amilina mimética	<ul style="list-style-type: none"> • Pramlintida 	120 μ g/inyección

La terapia farmacológica está enfocada en el uso de fármacos (denominados antidiabéticos) con mecanismos de acción sobre blancos moleculares que modulan el metabolismo de glucosa (**Tabla 2**) (ADA, 2020), sin embargo, el efecto de los ADD sobre las CVD es distinto y la evidencia no muestra una clara

relación entre la disminución de la hiperglucemia ejercida por los fármacos y la reducción de las complicaciones macrovasculares (Defronzo et al., 2015).

1.1.4.1 Efectos de los fármacos antidiabéticos (ADD) sobre las complicaciones cardiovasculares(CVD)

Ciertos estudios clínicos —descritos en la **Tabla 3**— han evaluado el efecto de las distintas clases de ADD en la reducción de las complicaciones macrovasculares en sujetos con DMT2. Se ha notado que algunos fármacos inclusive incrementan el riesgo cardiovascular (p. ej. sulfonilureas) mientras que otros parecen ejercer una reducción (p.ej. SGLT2) en pacientes con DMT2 al evaluar parámetros de resultados como mortalidad, insuficiencia cardiaca, infarto agudo al miocardio entre otras CVD (Rawshani et al., 2017; A. D. Shah et al., 2015; Tancredi et al., 2015). Es preciso señalar que el efecto de los fármacos sobre la reducción de la hiperglucemia y la HbA1c es semejante en magnitud entre las distintas clases (~1%-2%)(Sherifali et al., 2010). No obstante, su efecto en el sistema cardiovascular (protección o daño) es distinto, como se muestra en la **Tabla 3**. Esto nos sugiere mecanismos celulares diferencialmente modulados por los fármacos a nivel del sistema cardiovascular, que no son dependientes de su capacidad antihiper-glucemiante.

La evidencia más sólida, con respecto a la reducción de complicaciones y mortalidad cardiovascular por un fármaco antidiabético existe para la empagliflozina. Esta evidencia surge del gran estudio EMPA-REG OUTCOME (del inglés, *Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients*) realizado en 7020 pacientes con DMT2 tratados con 10 y 25 mg de empagliflozina (Fitchett et al., 2016). El estudio demostró una reducción del 39% y 35% en el riesgo de mortalidad por causas cardiovasculares y de ingreso hospitalario por insuficiencia cardiaca, respectivamente (Fitchett et al., 2016). Para el fármaco de primera línea, metformina, la evidencia clínica sugiere que su uso parece reducir —existen estudios contradictorios (Boussageon et al., 2012; Turner, 1998; Tzoulaki et al., 2009; Wheeler et al., 2013)— el riesgo de mortalidad por complicaciones cardiacas e IAM en sujetos con DMT2 (Paneni y Lüscher, 2017). Por otra parte, resultado del metanálisis de 4 ensayos con rosiglitazona (n=14291, incluyendo 6421 que recibieron rosiglitazona y 7870 que recibieron una terapia control, con una duración de 1-4 años), se calcularon los riesgos relativos de IAM, ICC y mortalidad CDV, demostrando que el fármaco aumentó el riesgo de ICC, IAM y falla cardiaca, pero no se observó un incremento significativo en el riesgo de mortalidad por CVD (Singh et al., 2007). De la misma manera,

estudios clínicos como el SAVOR-TIMI 53 (16 492 pacientes con DMT2, seguimiento de 2.1 años) y EXAMINE (5380 pacientes con DMT2, seguimiento de 40 meses) indican que el uso de ciertos inhibidores de la DPP-4 (saxagliptina y la alogliptina) parecen incrementar el riesgo de IC en personas con DMT2 y con previos eventos cardiovasculares adversos (IAM, angina de pecho o ICC). Sin embargo, otros ensayos como el TECOS (14671 pacientes con DMT2, seguimiento de 3 años), sugiere que el uso de sitagliptina (otro inhibidor de la DPP-4) no parece incrementar el riesgo de CVD (Green et al., 2015; Scirica et al., 2013; White et al., 2014). Por el lado de cardioprotección, el estudio TECOS no sugiere una reducción del riesgo de mortalidad cardiovascular o desarrollo de CVD en sujetos tratados con inhibidores de la DPP-4 (Green et al., 2015). Por lo tanto, algunos ADD parecen reducir y otros incrementar el riesgo de complicaciones macrovasculares, independientemente de sus efectos antihiper glucémicos.

Tabla 3. Propiedades y efectos cardiovasculares de los fármacos antidiabéticos utilizados para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) (Tabla modificada de (Paneni y Lüscher, 2017)).

Clase de fármacos	Efectos cardiovasculares	Uso clínico en pacientes con enfermedades cardiovasculares	Reducción de Hemoglobina A1C (%)
Biguanidas	<ul style="list-style-type: none"> • Pocos estudios aleatorizados, pero varios estudios observacionales disponibles • Reducción del riesgo (39%) de IAM (UKPDS) • Reducción del riesgo (42%) de mortalidad por causas relacionadas con la diabetes (UKPDS) • Reducción de variables (32%) relacionadas con la diabetes (UKPDS) • Reducción del riesgo (36%) de mortalidad (UKPDS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Primera elección en pacientes con DMT2 con y sin enfermedad vascular aterosclerótica • Se deben de tomar precauciones en pacientes con SCA, IC, ECR (Estadios IV y V) • Contraindicación en sujetos con presencia de acidosis o deshidratación 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción en ~1% comparado con placebo en dosis superiores a 1500 mg por día (ADA, 2020) • Reducción general del grupo 1%-2% (Chaudhury et al., 2017)
Sulfonilureas	<ul style="list-style-type: none"> • Varios estudios observacionales disponibles • Reducción de las complicaciones microvasculares (UKPDS) • Incrementa la mortalidad cardiovascular (UGDP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Terapia combinada en pacientes con DMT2 con y sin enfermedad cardiovascular (si la HbA1c deseada no se logra después de 3 meses de monoterapia con metformina) 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción en A1C del ~1.25 % en dosis mayores o iguales a 8 mg por día de glimepirida (ADA, 2020)

	<ul style="list-style-type: none"> • Deterioro del acondicionamiento isquémico (?) 	<ul style="list-style-type: none"> • Se deben tomar precauciones en pacientes con múltiples comorbilidades, SCA, IC y CDK avanzado (estadios IV y V). 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción general del grupo 1%-2%(Chaudhury et al., 2017)
Tiazolidinedionas	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce el riesgo de IAM y accidente cerebrovascular (estudios PROActive e IRIS con pioglitazona) • Mejora la dislipidemia diabética • Aumenta la hospitalización por IC 	<ul style="list-style-type: none"> • Terapia combinada en pacientes con DMT2 con y sin ECV y/o ERC (hasta etapa V, TFGe< 15 mL/min/1,73 m2). • Se deben tomar precauciones en pacientes con SCA. • Contraindicado en pacientes con o en riesgo de IC 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción en ~ 1.25% por Rosiglitazona a 8 mg por día redujo(ADA, 2020) • Reducción en ~1% por Pioglitazona a 30 mg por día(ADA, 2020) • Reducción general 0.5%–1.4%(Chaudhury et al., 2017)
**Agonistas del receptor péptido 1 de glucagón (GLP-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción significativa de variables de valoración compuestas de ECV en los estudios LEADER y SUSTAIN-6 • Liraglutida y semaglutida no presentan efectos significativos sobre la mortalidad por ECV, IAM no fatal y hospitalización por IC. • Semaglutida reduce el riesgo del evento cerebrovascular no fatal 	<ul style="list-style-type: none"> • Terapia combinada en pacientes con DMT2 con y sin ECV (incluyendo IC y SCA) • La eliminación de Exenatida es dada por mecanismos renales, por lo cual no debe administrarse en pacientes con ERT grave. • Liraglutida no se elimina por mecanismos renales o hepáticos, pero se debe utilizar con precaución ya que no existen datos suficientes de estudios en pacientes con insuficiencia renal o hepática 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción general 0.5%–1.5%(Chaudhury et al., 2017)

		<ul style="list-style-type: none"> Datos limitados en pacientes con CDK avanzado (etapas IV y V). 	
Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DDP-4)	<ul style="list-style-type: none"> Sin reducción de las variables de valoración de ECV (SAVOR-TIMI 53, EXAMINE, TECOS) Saxagliptina y alogliptina incrementan el riesgo de IC 	<ul style="list-style-type: none"> Discutible el uso de alogliptina y saxagliptina en pacientes con IC preexistente. Indicado en pacientes con ECR (en cualquier etapa) 	<ul style="list-style-type: none"> Reducción en ~0.75% en dosis superiores a 100mg al día(ADA, 2020) Reducción general 0.5%–0.8%(Chaudhury et al., 2017)
Inhibidores del cotransportador de sodio glucosa 2 (SGLT2)	<p>Acorde al estudio EMPA-REG OUTCOME:</p> <ul style="list-style-type: none"> Empagliflozina reduce reduce el riesgo de muerte por ECV (38%), hospitalización por IC (35%) y mortalidad total (32%) Empagliflozina no presenta efectos directos sobre las tasas del IAM y evento cerebrovascular Reducción de la PA sistólica y diastólica 	<ul style="list-style-type: none"> Terapia combinada en pacientes con DMT2 con y sin ECV (escasez de datos sobre SGLT2 en prevención primaria). Beneficio en pacientes con IC No hay evidencia de beneficio en SCA 	<ul style="list-style-type: none"> Reducción general del 0.65% - 0.74% (Hsia et al., 2017)

(Tabla modificada de Paneni y Luscher, 2017). **SCA**= Síndrome coronario agudo; **PA** = Presión arterial; **ECR** = Enfermedad crónica renal; **ECV**= Enfermedad cardiovascular; **TFGe** =Tasa de filtración glomerular estimada; **EMPA-REG OUTCOME**= *Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patientse Removing Excess Glucose*; **ERT**=Enfermedad renal terminal; **EXAMINE**= Examen de los resultados cardiovasculares con Alogliptina versus el estándar de cuidado; **IC**= insuficiencia cardiaca; **AIT** Intervención de Resistencia a la insulina después de un accidente cerebrovascular isquémico; **LEADER** = Efecto de la liraglutide en diabetes: evaluación de la seguridad cardiovascular; **MACE**= eventos cardiovasculares adversos mayores; **IAM**= Infarto agudo al miocardio; **PROActive**= Ensayo prospectivo clínico de pioglitazona en eventos macrovasculares; **SAVOR-TIMI 53**= Evaluación de los resultados registrados en la evaluación de saxagliptina en pacientes con diabetes mellitus-trombosis en infarto agudo al miocardio; **SGLT2**= cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 ; **SUSTAIN-6**= Ensayo para evaluar eventos cardiovasculares y otros resultados a largo plazo con semaglutide en personas con diabetes tipo 2; **DMT2**= Diabetes mellitus tipo 2; **TECOS**= Ensayo de evaluación de resultados cardiovasculares con sitagliptina; **UGDP**=Grupo Universitario para el programa de diabetes por sus siglas en inglés*; **UKPDS** = Estudio prospectivo de diabetes del reino unido.

1.1.4.2 Efectos de los ADD sobre el endotelio

A pesar de la relevancia de la participación del endotelio coronario en el funcionamiento y desarrollo de patologías del corazón, pocos estudios han evaluado los efectos de los ADD sobre dicho

órgano que podrían explicar sus efectos clínicos sobre las complicaciones macrovasculares. Algunos autores han descrito los efectos de la metformina, empagliflozina, saxagliptina y rosiglitazona sobre células endoteliales, pero, de órganos distintos al corazón.

La metformina perteneciente a la familia de las biguanidas es el fármaco de primera línea recomendado para iniciar el tratamiento en sujetos con DMT2 (ADA,2020). A pesar de que su mecanismo de acción anti hiperglucemiante no está esclarecido con exactitud —existe una larga controversia derivado de las dosis y concentraciones supra fisiológicas utilizadas en los estudios(Arunachalam et al., 2014; Detaille et al., 2005; Tian et al., 2019)—, se han señalado varias vías de señalización mediadoras de sus efectos, incluyendo la activación de la cinasa AMP (AMPK) y la subsecuente inhibición de la gluconeogénesis hepática, oxidación de ácidos grasos, así como la sensibilización a la acción de la insulina en el músculo estriado y tejido adiposo. Con respecto a sus efectos en la vasculatura, datos reportados en la clínica —que emplean dosis terapéuticas— muestran un efecto benéfico y protector del fármaco sobre las complicaciones vasculares (independiente de su efecto antihiperglucemiante), relacionado con su capacidad de mejorar la función endotelial (ADA, 2020; Triggle y Ding, 2017). Se presume que la estimulación en la síntesis y disponibilidad del NO pudieran mediar los efectos vasculares de metformina (Triggle y Ding, 2017). Sin embargo, la mayoría de los estudios mecanísticos que tratan de explicar el efecto de la metformina en la vasculatura han sido realizados en células endoteliales de la microvasculatura o emplean concentraciones supra fisiológicas (Arunachalam et al., 2014; Detaille et al., 2005; Tian et al., 2019). No obstante, el grupo de Eriksson y colaboradores, empleando células de arteria coronaria de humano (HCAEC), han reportado efectos anti apoptóticos (por inhibición de caspasa-3, fragmentación del DNA y modulación de la eNOS) de metformina (en concentraciones 0.1-2 mM) en células cultivadas en ambientes de alta glucosa y ácido palmítico (Eriksson et al., 2012; Eriksson y Nyström, 2014).

Empagliflozina es un fármaco cuyo efecto antihiperglucémico se atribuye a la inhibición del cotransportador de sodio glucosa 2 (SGLT2). Estudios en células endoteliales microvasculares (CMEC)(Juni et al., 2019), células endoteliales derivadas de corazón de rata embrionaria (Andreadou et al., 2019), células endoteliales derivadas de aorta (HAEC)(Cooper et al., 2019; El-Daly et al., 2018) y células endoteliales de vena umbilical (HUVEC)(Iannantuoni et al., 2020; Uthman et al., 2019), han descrito efectos protectores de empagliflozina (concentraciones 1-50 μ M) sobre la función endotelial. Algunos mecanismos moleculares descritos incluyen la modulación de factores de transcripción (p. ej. Factor de transcripción independiente de la vía RISK(STAT-3), un aumento en la disponibilidad del NO y la activación de la AMPK(Andreadou et al., 2017; El-Daly et al., 2018; Uthman et al., 2019; Zhou et al., 2018). En HCAEC se ha reportado que Empagliflozina (1 μ M) restaura la biodisponibilidad del NO, anteriormente reducida

por la exposición de las células al TNF α (10ng/ml), efecto mediado por una disminución en la producción de ROS(Uthman et al., 2019).

Por otra parte, la saxagliptina —inhibidor selectivo de la isoforma 4 de la dipeptidil peptidasa (DPP4) — ha mostrado efectos benéficos sobre el endotelio en la clínica, tales como incremento en la dilatación mediada por flujo (Kajikawa et al., 2019). Derivado de estudios *in vitro* (HUVEC), se ha sugerido que la saxagliptina (rango 1-10 μ M) incrementa la función endotelial mediante la reducción de la producción de ROS, citocinas y moléculas de adhesión celular, parámetros de inflamación y activación de células del sistema inmune(Birnbaum et al., 2016; Brown et al., 2017; Ma et al., 2019).

Uno de los fármacos con mayor controversia sobre sus efectos en el endotelio, es la rosiglitazona —activador del receptor activado por proliferadores peroxisómicos gamma (PPAR γ) —, ya que algunos estudios sugieren tanto efectos protectores como dañinos en el sistema cardiovascular(Baselet et al., 2020; Ji et al., 2018). Algunos autores describen que la rosiglitazona (1 -10 μ M) altera negativamente la función endotelial de HUVEC incluyendo la migración celular y permeabilidad vascular (mediante la vía AKT o proteína cinasa B) (Ku et al., 2017). Por otro lado, algunos autores sugieren un efecto protector de rosiglitazona (5 -50 μ M) en HUVEC dañadas con indoxil sulfato (toxina urémica asociada a efectos deletéreos cardiovasculares), al atenuar lesiones endoteliales causadas por el incremento de NOX4 y NFkB previniendo la activación de las vías de señalización de la proteína activada por la señal cinasa (MAPK)p38 y cinasas 1 y 2 reguladas extracelularmente(ERK $\frac{1}{2}$)(Chou et al., 2015). A su vez existe evidencia que sugiere que rosiglitazona atenúa (in vivo e in vitro) la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas 1 de tipo lectina (LOX-1) (receptor descrito como clave en la disfunción endotelial y desarrollo de la aterosclerosis) mediante la regulación positiva del miR-590-5p (microRNA). El mecanismo molecular descrito sugiere la activación y translocación al núcleo del PPAR γ por rosiglitazona (L. Xu et al., 2019). También se han descrito efectos moduladores de la apoptosis por el fármaco, sin embargo, existe controversia en este aspecto, ya que mientras algunos autores sugieren un incremento en la apoptosis (Ji et al., 2018), otros sugieren una reducción en este proceso (Baselet et al., 2020; Million et al., 2010) en células endoteliales. De igual manera, efectos antiinflamatorios han sido reportados para rosiglitazona en estudios in vitro (HCAEC), al modular la expresión de proteínas proinflamatorias (IL-6 y VCAM-1) en células dañadas con la proteína amiloide A (Lakota et al., 2018).

1.1.5 Proteómica

El proteoma es el conjunto de proteínas presentes en un organismo, tejido, órgano y células en un momento determinado bajo ciertas condiciones ambientales. La proteómica es la disciplina que se encarga del análisis sistemático del proteoma. El uso de la proteómica para el estudio de los mecanismos moleculares celulares se ha acelerado en los últimos años al ofrecer una aproximación más completa sobre la dinámica celular en el contexto del desarrollo de patologías (Khurana et al., 2006), efecto de fármacos y compuestos (Sutton, 2012), y la homeostasis celular (Finka y Goloubinoff, 2013). Con respecto a las aproximaciones tradicionales (p.ej., biología molecular, celular, etc.), la proteómica permite entender la compleja red molecular de la célula al poder analizar en un solo estudio miles de proteínas (Tyers y Mann, 2003). No obstante, existen diversas técnicas analíticas y metodológicas para el estudio del proteoma y cada una presenta características que favorecen su uso con respecto a las demás (Aslam et al., 2017).

1.1.5.1 Métodos para el estudio del proteoma

Una de las herramientas analíticas más relevantes para el estudio del proteoma es la basada en la tecnología de espectrometría de masas (MS) en Tándem (MS^2) de alta resolución (Clarke, 2017) (**Figura 6**). Para la MS existen dos enfoques sobre el estudio del proteoma (**Figura 7**): de arriba hacia abajo o “*top down*” —que analiza proteínas intactas— y el abajo hacia arriba o “*bottom up*” — que analiza péptidos derivados de la digestión de proteínas con enzimas—. Estas dos aproximaciones se apoyan en el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución (LC), siendo esta la encargada de separar (p.ej., hidrofobicidad, tamaño) los péptidos antes de ser detectados por la MS. De estas dos aproximaciones, la MS de tipo *bottom up* facilita la cobertura de detección y cuantificación de proteínas (Sajic et al., 2015). A su vez, los experimentos de tipo *bottom up* se pueden clasificar en: con marcaje isotópico (del inglés, *isotopic* o *labelling*), y sin marcaje (del inglés, *label free*). Los experimentos sin marcaje se pueden realizar de manera dirigida (“*targeted*”), para un grupo específico de proteínas, o tipo “*shotgun*” para el descubrimiento del proteoma de alguna muestra biológica (Välikangas et al., 2017).

La adquisición de datos por LC-MS también presenta variantes; a) adquisición dependiente de datos (por sus siglas en inglés, DDA) y b) adquisición independiente de datos (por sus siglas en inglés, DIA) (Anjo et al., 2017). La DDA consiste en un escaneo de los iones precursores (MS^1) eluidos en cierto punto por una separación cromatográfica, seguido de una selección de un grupo limitado de los mismos para su

posterior fragmentación (MS^2 o MS^2). Cada MS^2 es característico para un péptido dado y puede ser utilizado para identificarlo. Por otro lado, la DIA es un método donde los MS^2 se adquieren dentro de un rango de masa de péptidos en el tiempo en una serie de ciclos sin una previa selección de los iones precursores, esto lleva a un registro de los MS^2 sin el sesgo de todos los péptidos precursores de alguna muestra (Anjo et al., 2017; Sajic et al., 2015; Vowinckel et al., 2018; Yin et al., 2014).

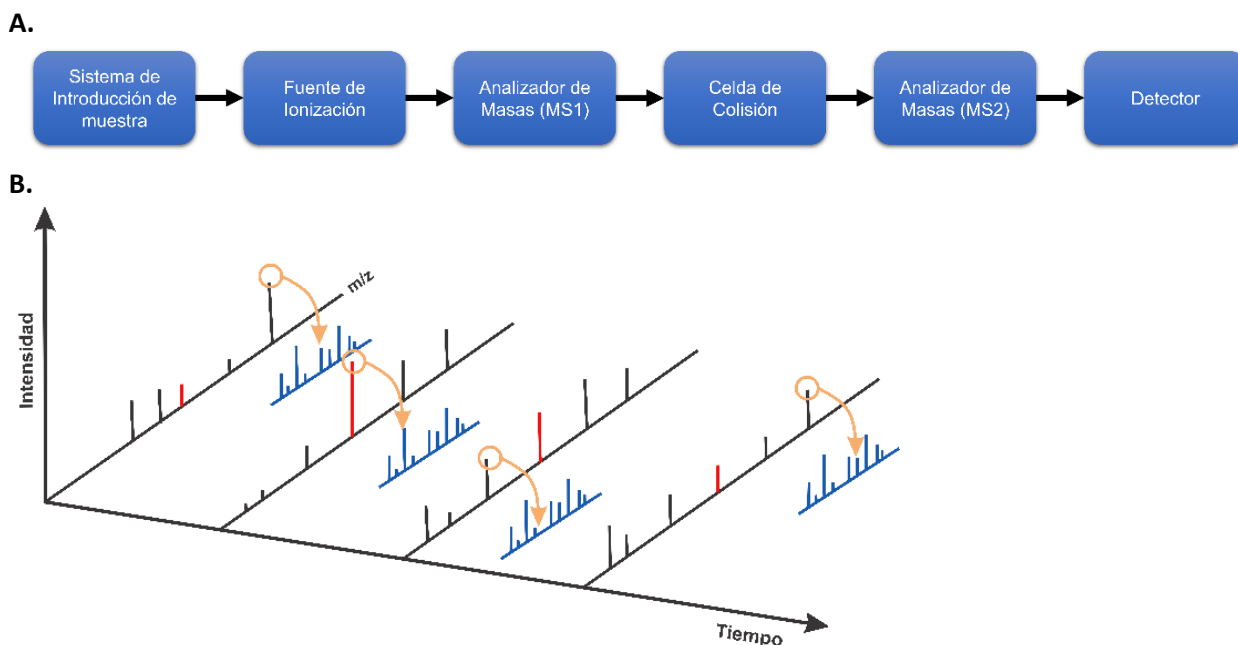


Figura 6. Espectrometría de masas (MS) en Tándem (MS^2) de alta resolución. **A.** Esquema general de un sistema MS^2 . **B.** Flujo de trabajo para los escaneos y selección de picos en el MS^2 . El instrumento escanea periódicamente el radio masa-carga (m/z) de todos los péptidos eluidos (picos negros), selecciona los iones más abundantes en un determinado tiempo de fragmentación y mide el m/z de los iones de fragmentación resultantes (picos azules). Los programas computacionales utilizan el espectro del ion de fragmentación para determinar la secuencia de aminoácidos del péptido. (Figura B extraída de McIntosh y Fitzgibbon, 2009).

Una variante de los métodos de tipo DIA es la adquisición secuencial de ventanas de todos los espectros de masas teóricos (SWATH-MS). Esta consiste en un análisis paralelo de las muestras combinando la adquisición de péptidos con DDA y una cuantificación de la información con un método DIA (**Figura 8**). La cuantificación de proteínas por SWATH-MS es una de las herramientas de mayor precisión y exactitud que existen y, presenta la gran ventaja de crear un archivo digital de cada muestra, que permite su análisis posterior (Anjo et al., 2017; Sajic et al., 2015).

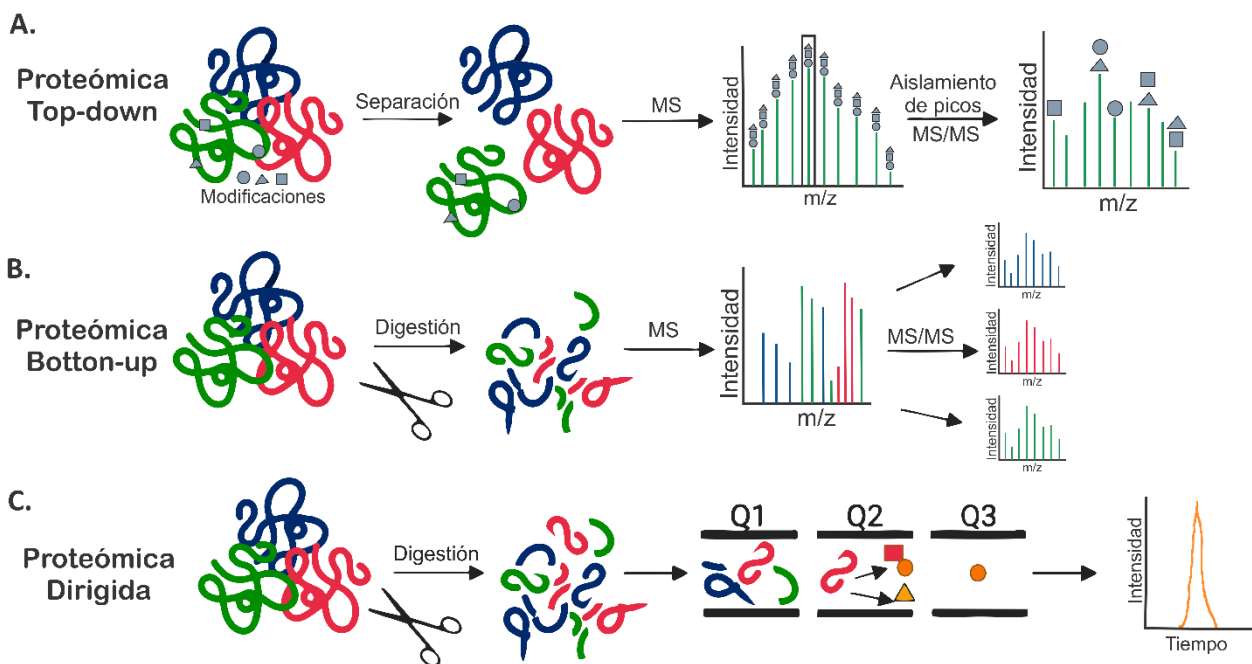


Figura 7. Representación gráfica de los enfoques para el estudio del proteoma basado en espectrometría de masas en Tandem (MS^2). **A.** *Top down proteomics* analiza las proteínas intactas por LC- MS^2 para la identificación y cuantificación de proteoformas únicas seguida de la separación de proteínas por tamaño y picos de detección/isolation. **B.** *Bottom up proteomics* analiza proteínas proteolíticas digeridas (péptidos) por LC- MS^2 para una identificación no tan sesgada y una cuantificación de proteínas dentro de una muestra. **C.** *Targeted proteomics* mide un predefinido grupo de péptidos por LC- MS^2 para la identificación, caracterización y cuantificación de un grupo específico de proteínas y biomarcadores (Imagen extraída de Ball et al., 2019).

1.1.5.2 Aplicación de la proteómica para el estudio de mecanismos moleculares y fármacos en patologías.

La proteómica se ha utilizado para el estudio de enfermedades infecciosas (VIH, dengue, malaria, etc.), cáncer, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal y DMT2, entre otras (Kim et al., 2007). Particularmente, la DMT2 tiene como una de sus diversas consecuencias, alteraciones en el proteoma de los tejidos y órganos del cuerpo humano. Esto es de suma relevancia, ya que las proteínas son las que dictan directamente la función celular (Sundsten y Ortsäter, 2009). Algunos estudios, de los pocos que existen, han utilizado la proteómica para dilucidar mecanismos moleculares relacionados con la fisiopatología de la DMT2 en células endoteliales (De la Herrán et al., 2019). Vías ligadas con la disfunción mitocondrial, estructura de la unión célula-célula y regulación de la síntesis de proteínas han emergido como posibles blancos terapéuticos (Skeie et al., 2018).

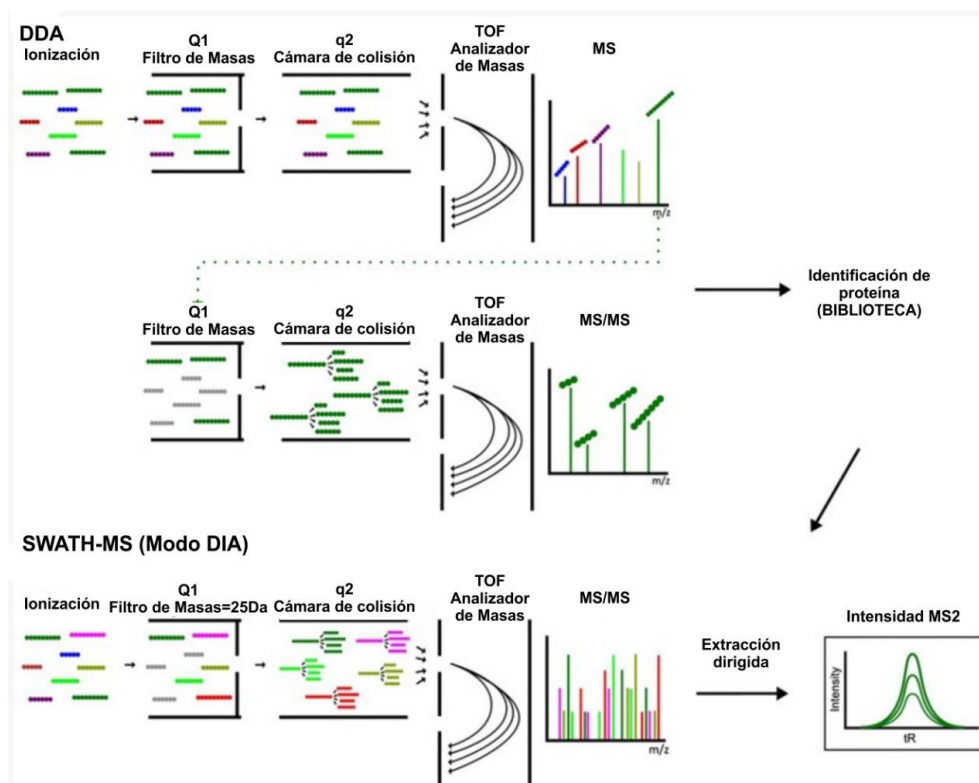


Figura 8. Descripción general del método de adquisición de datos SWATH-MS. El método SWATH-MS generalmente combina un análisis paralelo de las muestras con un método optimizado de DDA para la identificación de los péptidos seguido de una adquisición tipo DIA utilizada para la extracción de los datos cuantitativos de la previa identificación de péptidos (Obtenido de **Anjo et al., 2017**). Abreviaciones: DDA, Adquisición dependiente de datos; DIA, Adquisición independiente de datos.

No obstante, existen pocos estudios que hayan evaluado el efecto de los ADD en el endotelio empleando la proteómica. **Millioni y colaboradores** en el 2010, para evaluar molecularmente los posibles efectos dañinos que se tienen reportados en la clínica para rosiglitazona, cultivaron células endoteliales en condiciones de glucosa normal (5.5 mM) y alta glucosa (20 mM) y las trataron con rosiglitazona (20 μ M). Utilizando un espectrómetro MALDI TOF-TOF 4800, se detectaron 100 proteínas de membrana y 150 citosólicas, observándose que dos tercios de las proteínas moduladas por la condición de alta glucosa fueron moduladas por rosiglitazona de forma antagónica al control, y que estas proteínas estaban relacionadas a procesos apoptóticos (**Millioni et al., 2010**). En el mismo estudio, observaron una reducción del 30-50% de los parámetros de apoptosis, que a su vez derivó en la identificación de potenciales sitios de acción del fármaco en células endoteliales (**Millioni et al., 2010**).

De esta manera la proteómica tiene como gran ventaja, propiciar un panorama un poco más completo de la dinámica celular a gran escala, generando así, un mayor entendimiento de los procesos

moleculares en distintas patologías con respecto a las técnicas más tradicionales (p. ej. electroforesis bidimensional).

1.2 Justificación

La DMT2 es uno de los principales problemas epidemiológicos en México. El IAM y ECVA son las manifestaciones macrovasculares clínicas más letales de la DMT2. A pesar de que existen ADD que permiten controlar los niveles de glucosa en sangre en sujetos con DMT2, estos siguen manifestando un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular que sujetos sin DMT2. Por otra parte, datos epidemiológicos y clínicos sugieren que algunos fármacos inclusive incrementan el riesgo de mortalidad cardiovascular, mientras que otros reducen el riesgo con mayor eficacia. La capacidad anti hiperglucemiante de los fármacos no se relaciona con sus efectos en la salud cardiovascular, por lo cual otros mecanismos parecen estar involucrados. No obstante, pocos estudios han evaluado los efectos moleculares de los distintos fármacos en órganos y tejidos que ejercen un papel importante en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares. El endotelio coronario es un órgano que modula directamente la función del corazón y participa en el desarrollo y empeoramiento de patologías cardíacas. Por lo tanto, es lógico pensar que los ADD pudieran modular —independientemente de sus efectos antihiperglucemiantes— la función del endotelio coronario y, de esta manera, reducir o aumentar el riesgo cardiovascular.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Los ADD que disminuyen el riesgo cardiovascular en la clínica modulan vías de señalización intracelulares que mejoran la función endotelial.

1.3.2 Los ADD que incrementan el riesgo cardiovascular en la clínica modulan vías de señalización intracelulares que empeoran la función endotelial.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificación de las vías de señalización intracelulares moduladas por los ADD mediante un análisis proteómico.

1.4.2. Objetivos específicos

1.4.2.1 Tratamiento de las HCAEC con los fármacos y extracción de proteínas.

1.4.2.2 Generación de péptidos trípticos e identificación del proteoma de HCAEC.

1.4.2.3 Cuantificación diferencial de la abundancia proteínica entre los grupos de fármacos.

1.4.2.4 Elucidación y comparación de las vías de señalización moduladas por los fármacos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Tratamiento de las HCAEC con los ADD

El modelo *in vitro* consistió en HCAEC adquiridas de Cell Applications, Inc (San Diego, CA) procedentes de un hombre diabético de 53 años caucásico y sin antecedentes de VIH. Las células se cultivaron con un medio (MesoEndo Growth Medium), rico en nutrientes, manteniéndose en incubación a 37°C y 5% de CO₂. El medio se renovó cada 48 horas hasta que se alcanzó una confluencia óptima del 80%. Las células fueron cultivadas utilizando 3 platos de 10 cm de diámetro y fueron propagadas en 5 platos de 6 pozos.

Una vez alcanzada la confluencia adecuada, las HCAEC fueron sometidas al tratamiento con los fármacos antidiabéticos como se muestra en la **Figura 9**. Los fármacos Rosiglitazona (1 µM), Empagliflozina (1 µM), Saxagliptina (1 µM) y Metformina (100 µM), fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue utilizado como vehículo de administración y como Control Negativo (CN; tratamiento sin fármaco). Las concentraciones de los fármacos utilizadas para el tratamiento se determinaron con el promedio de las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) reportadas en la clínica (**Tabla 9**, en anexos). Como Control Positivo de daño (CP, inflamación) se trató un grupo de HCAEC con la citocina pro-inflamatoria, TNF-α (10 ng/mL). Los tratamientos se realizaron por un periodo de 48 h. Los experimentos se realizaron por cuatuplicado (4 réplicas biológicas por tratamiento). Cada réplica biológica consiste en un pool de 2 pocillos (placa de 6).

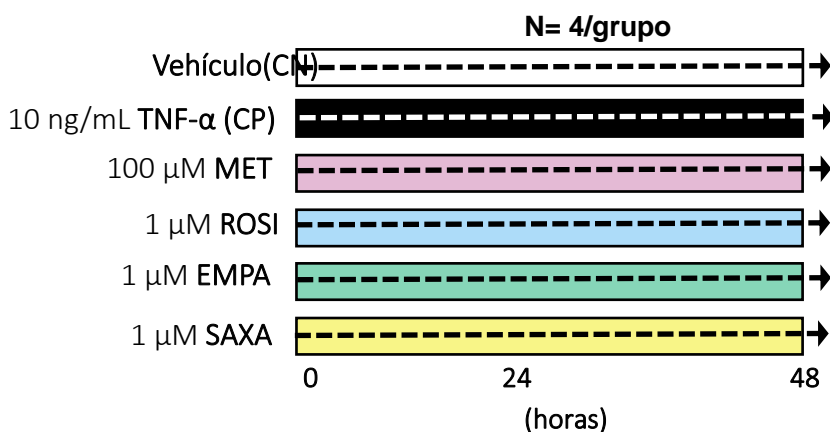


Figura 9. Esquema de tratamiento seguido en este estudio. Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) fueron tratadas con los fármacos antidiabéticos (ADD) y vehículo (DMSO). Abreviaciones: CN, control negativo; CP, control positivo; MET, metformina; ROSI, rosiglitazona; EMPA, empagliflozina; SAXA, saxagliptina.

Una vez transcurrido dicho periodo, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con 2 mL de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) para remover células muertas y residuos celulares. Posteriormente, se agregaron 50 µL/triplicado de buffer de lisis (1% de desoxicolato de sodio (DOC) en bicarbonato de amonio [NH₄HCO₃]) y se lisaron las células mecánicamente mediante un raspador de células. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

2.2 Extracción y procesamiento de proteínas para la generación de péptidos tripticos

Las proteínas procedentes de las HCAEC con los diferentes tratamientos fueron extraídas, reducidas, alquiladas (metiladas) y digeridas (tratamiento enzimático con tripsina) utilizando el kit Pierce™ Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells de la marca Thermo Fisher Scientific (Cat. No. 84840) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se sonicaron por 30 min en hielo, centrifugaron 2X a 20817 rfc (Eppendorf modelo 5417R) por 10 min a 4°C y el sobrenadante se recuperó (extracto proteínico). En todos los pasos las muestras se manejaron en hielo y los tubos eppendorf utilizados fueron de baja adhesión (*Low-protein binding*). Se procedió a la cuantificación de proteínas con el kit Micro BCA™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Se preparó la curva de calibración con un volumen final de 500 µl ajustando todos los demás volúmenes de la curva a sus equivalentes. Se tomó el volumen necesario para procesar 30 µg de proteína, y se completó a 100 µl con buffer de lisis con y sin DOC 1%. La reducción de las proteínas se realizó con 1.26 µl de ditioneitol (DTT) incubándolas por 45 min a 50 °C y la alquilación con 3.45 µL de iodoacetamida (IAA) —incubándolas protegidas de la luz— a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, las proteínas se precipitaron con 460 µl de acetona al 100% (pre-enfriada durante toda la noche a -80 °C). Se agregó 50 µl de acetona al 90% pre-enfriada (-80 °C), centrifugó a 20817 rfc a 4 °C por 5 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y después se le agregó 50 µl de buffer de digestión. Posteriormente, se agregaron 0.3 µg de la enzima Lys-C e incubaron las muestras durante dos horas. Finalmente, se adicionaron 0.6 µg de tripsina e incubaron las muestras por 3 horas.

El detergente DOC (incompatibilidad con el LC-MS) presente en las muestras se removió mediante la adición de 200 µL de acetato de etilo (pureza HPLC) y 2 µl de ácido fórmico (pureza LC-MS) (Masuda, Tomita e Ishihama, 2008).

Los péptidos tripticos fueron secados mediante alto vacío utilizando un sistema SpeedVac (Savant, Thermo Fisher Scientific) por 3 horas a temperatura ambiente. Después, los péptidos se reconstituyeron con 15 μ L de una solución agua:acetonitrilo (95:5) con 0.1% de ácido fórmico. La concentración de péptidos (usando 1 μ L de muestra) se determinó mediante el kit Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Cat. No. 23275) (según las instrucciones del fabricante) y utilizando un Espectrofotómetro UV-VIS-multiplaca 96 EPOCH (Biotek, Winooski, EE. UU) (absorbancia a 480 nm).

2.3 Obtención de datos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

2.3.1 Análisis por LC

La separación de los péptidos se realizó utilizando un sistema de LC modelo Eksigent nanoLC® 400 system (AB Sciex, Foster City CA, USA) con una columna de separación analítica fase C18 (HALO Núcleo sólido 0.3 x 150 mm, 2.7 μ m, tamaño de poro de 90 Å, Eksigent AB Sciex, Foster City, CA, USA). Las fases móviles utilizadas fueron A= 0.1% de ácido fórmico en agua y B= 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo.

La elución de los péptidos fue archivada utilizando un gradiente multilinear empezando con 5% del solvente B por 5 minutos, incrementando a 40% del solvente B por 115 minutos, seguido por un incremento al 50 % del solvente B durante 10 min, e incrementando—por último—a un 100% de B por 10 min manteniéndolo constante por 15 min (**Tabla 10** en anexo). El tiempo total de corrida fue de 150 min. La velocidad de flujo fue de 5 μ L/min y la cantidad de muestra inyectada fue de 4 μ L.

2.3.2 Análisis por DDA-Preparación de la biblioteca espectral

Para crear la biblioteca espectral de SWATH-MS los péptidos tripticos de todas las muestras —1 μ g por muestra— se mezclaron en un solo tubo (pool de muestras) y se sometieron al análisis por LC (como se mencionó anteriormente). El eluato del LC pasó a la fuente TurboV de un MS TripleTOF 5600+ (AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.) usando ionización por electrospray (ESI) con las siguientes condiciones : IonSpray Voltage Floating (ISFV), -5500 V; temperatura de la fuente, 450°C ; cortina de gas (CUR), 30; Fuente de

iones Gas 1 (GS1), 25; Fuente de iones Gas 2 (GS2), 35. En modo de operación DDA en un espectrómetro de masas Triple TOF5600+ cambiando el modo de adquisición automáticamente entre el escaneo completo MS y el MS². El tiempo de acumulación para el análisis MS fue de 0.25 s en el intervalo m/z de 350-1200 Da y para el análisis MS² fue de 0.051 s en el intervalo m/z 500-1200 Da (tiempo de ciclo 1.3 s).

Las configuraciones para la DIA fueron: estado de carga +2 a +4, intensidad 150cps, exclusión de isótopos de 6 Da, tolerancia de masa de 50 Da y un número máximo de iones candidatos de 20. Se seleccionó “excluir iones objetivo-anteriores” 20 s después de dos eventos y también se seleccionó “restar fondo dinámico” (*Dynamic Background Substraction*). Esto significa que los 20 iones más intensos (intensidad >150) con estados de carga de +2 a +4 se aislaron y fragmentaron secuencialmente dentro de la trampa de iones lineal usando CID y finalmente se excluyeron dinámicamente durante 20 s para evitar la selección repetitiva del mismo péptido. El instrumento se calibró automáticamente utilizando soluciones de calibración TOF MS y MS² positivas antes y después de las inyecciones (<3.5 horas) para garantizar una precisión de masa de <5ppm para los datos MS y MS² (**Tabla 11** en anexo).

2.3.3 Análisis por DIA

Para el análisis DIA se generaron 100 ventanas variables de aislamiento de precursores utilizando la calculadora de ventana variable SWATH (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Basado en las frecuencias precursoras m/z en las muestras DDA, con un ancho de ventana de 5 m/z (**Tabla 13** en anexos). El tiempo de acumulación para el análisis MS TOF fue de 150 ms en el intervalo 350-1200 Da y los datos MS² se obtuvieron de 350-1200 Da con un tiempo de acumulación de 35 ms (tiempo de ciclo 3.7 s). Los demás parámetros fueron los mismos para que para el análisis DDA (**Tabla 12** en anexos).

2.4 Análisis de datos y cuantificación diferencial de la abundancia proteínica entre los grupos de fármacos utilizando softwares bioinformáticos

Los datos adquiridos por ADD de las muestras se procesaron con el software Protein Pilot version 4.5 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) con el algoritmo Paragon™ versión 4.5.0.0 ya incluido en el software. Los datos MS² fueron emparejados con una base de datos del proteoma humano (UniProt) en formato FASTA

(20375 entradas revisadas). Los parámetros para la búsqueda fueron los siguientes: tipo de muestra: identificación; alquilación de Cys: yodoacetamida; digestión: tripsina; instrumento: TripleTOF 5600; factores especiales, ninguno; especie, *Homo sapiens*; sin descubrimiento falso (FDR) de software con cut off >0.05 (10% de confianza). La biblioteca de proteínas fue generada y exportada en formato group. Adicionalmente, la biblioteca fue cargada en el programa Peak View version 2.2.0.11391 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) y exportada en formato CVS.

Para la realización de la cuantificación diferencial de proteínas se realizó la extracción de datos dirigida (DIA) de los archivos SWATH, utilizando la aplicación de cuantificación SWATH® Acquisition MicroApp 2.0 en PeakView version 2.2.0.11391 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) junto con la biblioteca espectral generada por ADD. La alineación de las proteínas fue realizada por una curva de calibración del tiempo de retención de los péptidos más intensos (mayor a 10000) que fueron seleccionadas manualmente. La configuración usada para la cuantificación SWATH-MS fue un número máximo de 100 péptidos por proteína que se incluirán de la biblioteca de iones importados, 6 espectros de fragmentación o iones producto por péptido, un umbral de confianza de péptidos de 99%, una tasa de falsos descubrimientos (FDR) menor al 1%, una ventana de tiempo de retención XIC de 75 ppm, 10 min y se activaron los péptidos modificados. Las áreas debajo de las curvas de los picos de las proteínas se exportaron al software Markerview version 1.2.1.1 (AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.). Los contaminantes encontrados invertidos y comunes se eliminaron antes de continuar con el procesamiento.

La normalización se realizó mediante el software NormalyzerDE® version 1.3.4, una herramienta online que evalúa la idoneidad de diferentes métodos de normalización para un conjunto de datos (Chawade et al., 2014). Se evaluaron los métodos y se decidió realizar el análisis diferencial de las proteínas mediante el método de normalización por cuantiles, con el mismo software se realizaron gráficas de volcán para cada uno de los fármacos. Las proteínas con un cambio (*Fold Change*) ≥ 1.2 o $\leq 1/1.2$ y un valor de $p < 0.05$ (Welch's t-test) fueron consideradas diferencialmente abundantes entre las muestras de las diferentes condiciones.

2.5 Elucidación y comparación de las vías de señalización moduladas por los fármacos empleando softwares informáticos

2.5.1 Propagación de los datos mediante Cluego en Cytoscape.

Para evaluar la cobertura del proteoma cuantificado, se analizaron las proteínas por ontología de genes (GO) empleando el término componente celular. El análisis de GO es un método que estructura un conjunto de proteínas en término de los procesos biológicos, componentes celulares o funciones moleculares que representan. Para esto se utilizó el software ClueGo (V.2.5.5) app para Cytoscape (V.3.7.1).

Por otra parte, como primer punto de partida y con el objetivo de determinar ciertas vías de señalización inflamatorias (vías de daño endotelial) en HCAEC, se empleó un análisis por enriquecimiento funcional –método que determina representación estadística de vías de señalización– utilizando las proteínas moduladas (incrementadas y disminuidas) por TNF- α . Además, se incluyó la lista de proteínas derivadas del trabajo de Mohre y colaboradores; donde HUVEC fueron tratadas con 10 ng/mL de IL-1 β por 24 horas. Las bases de datos REACTOME (08/05/2020) y KEGG fueron empleadas mediante el uso de ClueGo (V.2.5.5) app para Cytoscape (V.3.7.1). Se implementó un método de enriquecimiento/agotamiento (prueba hipergeométrica de dos lados) con corrección de reducción de Bonferroni para determinar la significancia.

Como segunda aproximación, las proteínas aumentadas por las citocinas y las proteínas disminuidas por los ADD se analizaron en conjunto, por enriquecimiento funcional, para determinar vías de señalización que los fármacos antagónicamente (efecto opuesto) modulaban con respecto a las citocinas (**Figura 10**). Para la visualización de las vías se utilizó la opción de diseño de la red funcional de agrupación de términos, en una visión general de términos. Los gráficos obtenidos se guardaron como PNG.

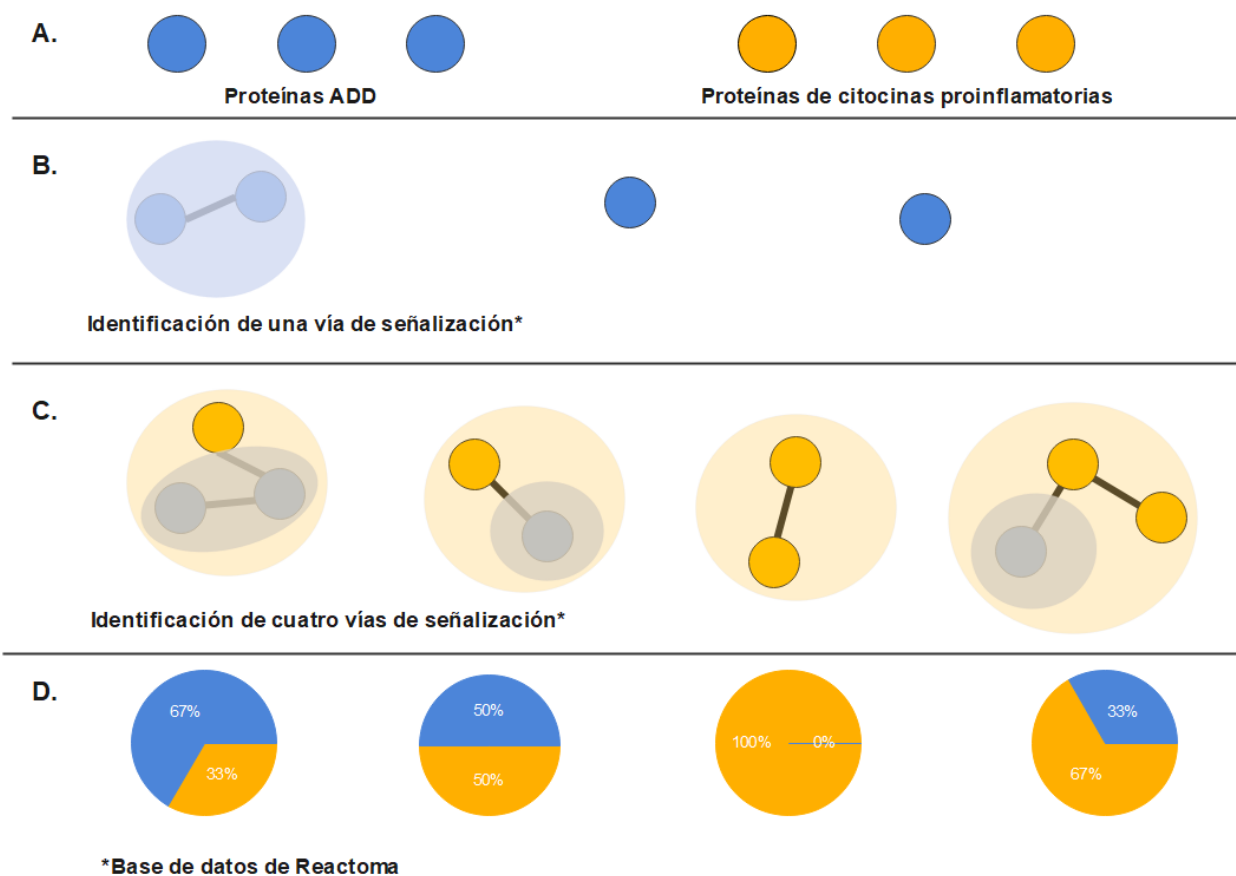


Figura 10. Propagación de los datos mediante ClueGo. **A.** Se observa la representación de las listas de proteínas, que son agregadas al programa ClueGo en Cytoscape en forma de IDs. En color naranja se observan las proteínas procedentes de las citocinas proinflamatorias y en color azul las proteínas provenientes de los experimentos con los fármacos antidiabéticos **B.** El análisis se realiza mediante la base de datos de Reactoma en ClueGo. En el análisis solo con las proteínas de los fármacos que se ve comprometida la cobertura de las vías de señalización identificando una sola vía. **C.** Al realizar el análisis con ambas listas se generan una mayor cantidad de redes moleculares correspondientes a las vías de las citocinas asociadas a las de los ADD. **D.** Como resultado del análisis en Cytoscape resultan diagramas de pastel correspondientes a las vías de señalización, donde se ilustra la contribución de las proteínas de entrada en la identificación de las diferentes vías de señalización.

2.5.2 Propagación de los datos mediante OmicsNet

Para expandir nuestro entendimiento sobre las vías de señalización moduladas por los fármacos, creamos una red de interacción proteína-proteína (PPI) con cada una de las listas de las proteínas aumentadas y disminuidas (por separado) por los fármacos. Este tipo de análisis permite introducir en el análisis las proteínas que interaccionan directamente con las proteínas “input” o moduladas por los ADD, lo cual resulta en una red PPI con más información biológica. El análisis se realizó en línea con la plataforma OmicsNet (<https://www.omicsnet.ca>) utilizando la base de datos STRING PPI (**Figura 11**). Una vez cargados los datos a la plataforma se realizó el análisis de enriquecimiento de las vías utilizando las bases de

Reactome y KEGG. Para realizar el cómputo de los valores de p se empleó la prueba hipergeométrica. La visualización de los módulos (unidades funcionales) se determinó mediante el uso del algoritmo *Walk Trap*. Se exportaron las vías de señalización resultantes en formato Excel y las imágenes de las vías de señalización se descargaron en alta calidad.

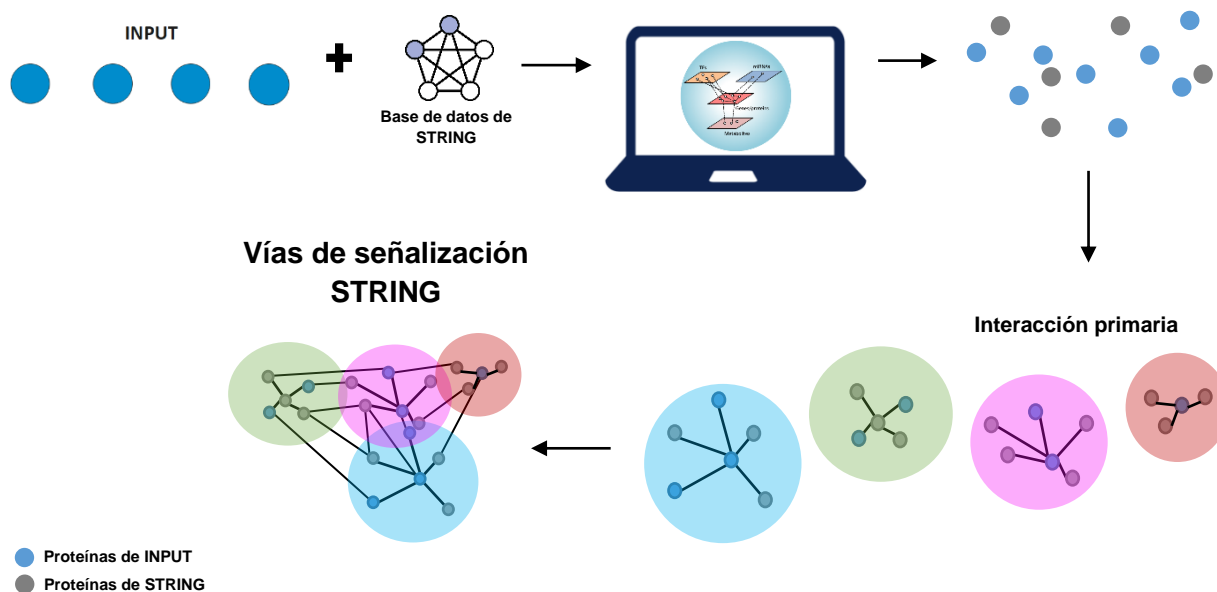


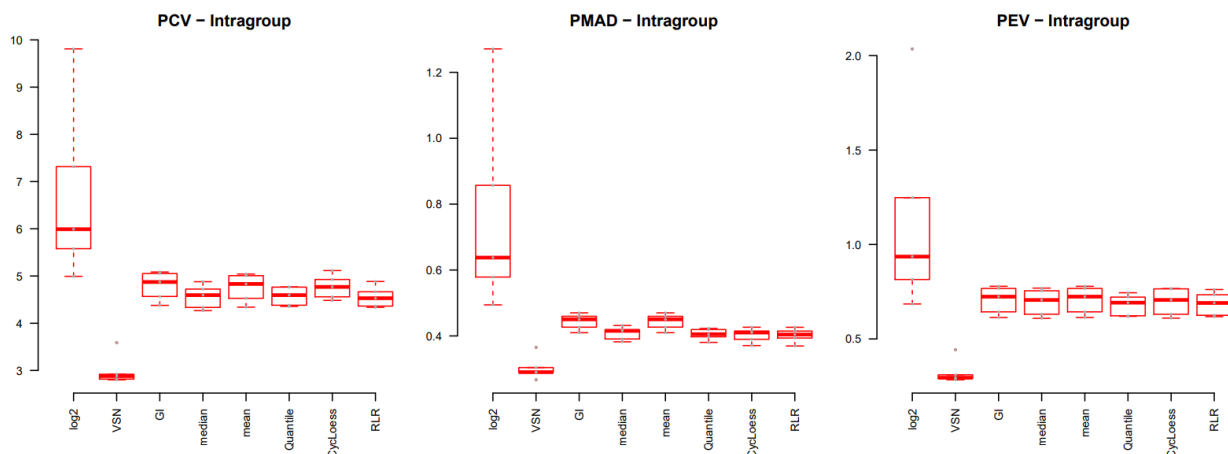
Figura 11. Propagación de datos mediante OmicsNet.

2.6 Análisis de las vías de señalización resultantes más significativas

Para observar vías de señalización únicas y compartidas entre cada uno de los ADD se construyeron diagramas de Venn con la plataforma en línea jVenn (Bardou et al., 2014) de las vías obtenidas con OmicsNet y ClueGo para cada uno de los fármacos. Los resultados se compararon de manera manual con los datos reportados en estudios publicados, empleando como términos de búsqueda, en www.google.com, las vías únicas encontradas en este estudio. Con las vías únicas para los fármacos con respaldo en la literatura, se realizó otra búsqueda para encontrar referencias que nos dieran algún indicio de daño o protección cardiaca.

el método de normalización por cuantiles debido a que presentó un mejor perfil cuantitativo y cualitativo (Figura 13).

A.



B.

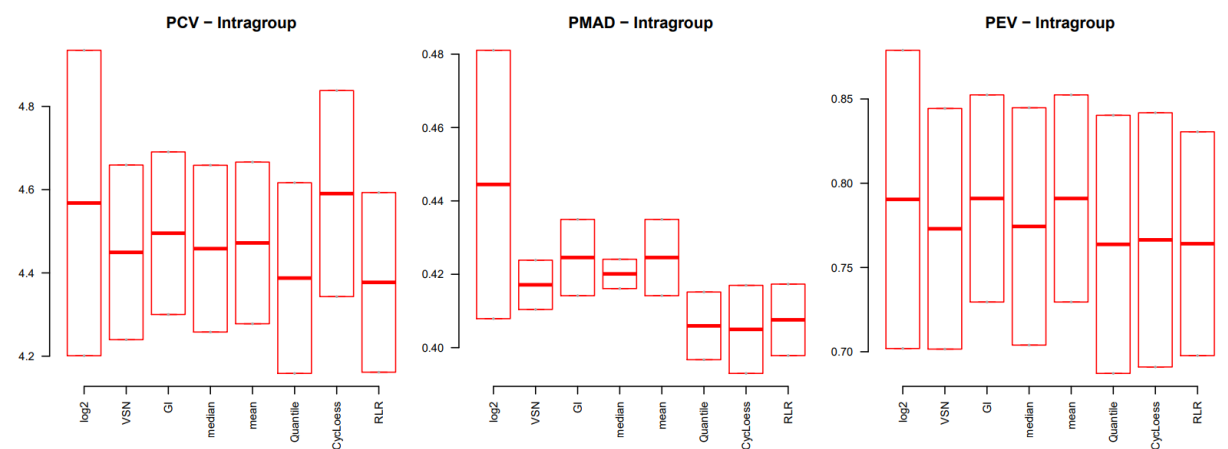


Figura 13. Análisis en NormalyzerDE® versión 1.3.4 para encontrar el método de normalización adecuado para nuestros sets de datos. A. Gráficos para los fármacos antidiabéticos. B. Gráficos para TNF- α . Abreviaciones: PCV, Coeficiente de variación agrupado intragrupal; PMAD, Desviación media absoluta agrupada intragrupal; PEV, Estimación de la varianza agrupada intragrupal.

Con las abundancias de las proteínas normalizadas se calcularon las proporciones de cambio o razón de cambio (FC, de las siglas en inglés Fold Change) para cada proteína entre los diferentes grupos de

ADD con relación al grupo control (Abundancia proteína X_1 Fármaco/abundancia proteína X_1 Control). Las proteínas con una razón de cambio de ± 1.2 y un valor de $p < 0.05$ fueron consideradas diferencialmente moduladas. Con el análisis estadístico t de Student de varianzas desiguales (Welch) se identificaron un total de 24,29,17,15, 25 proteínas con abundancia incrementada para metformina, rosiglitazona, empagliflozina, saxagliptina y TNF- α respectivamente. Y 32,34,33,48 y 42 proteínas con abundancia disminuida para metformina, rosiglitazona, empagliflozina, saxagliptina y TNF- α respectivamente (**Figura 14 y Tabla 4**). Los gráficos de volcán donde se muestra la distribución de las abundancias de las proteínas con cada uno de los tratamientos se encuentran en la **Figura 15**.

Tabla 4. Lista con los identificadores Uniprot para las proteínas procedentes de los experimentos con los ADD que resultaron con cambios significativos en sus abundancias ($FC \pm 1.2$; $p < 0.05$). Abreviaciones: FC, Razón de cambio; MET, metformina; ROS, rosiglitazona; EMPA, empagliflozina; SAXA, saxagliptina; TNF- α , Factor de necrosis tumoral alfa.

	MET	ROS	EMPA	SAXA	TNF- α		MET	ROS	EMPA	SAXA	TNF- α
Proteínas disminuidas	Q9Y266	Q00325-2	P36542	P14618	P18206	Proteínas aumentadas	Q9Y2Q5	O15126	O15126	Q9Y3Y2	O14773
	Q02878	Q00341	P30153	O95197	O43324		A5YKK6-4	Q9Y2Q5	Q9Y2Q5	Q9NU11	P23497
	Q15233	O75396	Q9UBE0	Q6NUK1	P68402		Q9Y315	Q8N8K3	Q9Y5P6-2	Q32MZ4	P05362
	P35270	P46060	Q9Y2W1	Q02952	P07996		Q9UBG0	P35527	P19823	Q8N8K3	O15269
	Q96QK1	P52907	P46779	P40429	P50990		Q13371	P04264	P04264	A5YKK6-4	P04179
	P14618	Q14192	Q02750	Q96QK1	P06744		Q8WWM7	Q9HA64	P35908	Q72739	O43920
	P49407	P18085	P00568	Q12905	P21980		Q14061	P13645	Q13620	Q9P0M9	Q92552
	Q96CW1	P30566	Q7L1Q6	P51114	P16949		P23634	P19823	Q9P0M9	P35637	Q92552-2
	Q9UIQ6	P35237	Q9P2E9	P84098	P54709		Q9NQ30	Q92696	P40222	Q9NQ30	P61769
	P17980	Q9UBQ0	O95218	Q8I283	Q01995		Q15599	A5YKK6-4	Q99961	P14854	P30447
	Q9UHG3	P30153	Q724V5	P61313	O43670		Q8WVJ2	Q32MZ4	Q9H444	P17174	Q06323
	P30153	O75874	O15355	Q02878	P09493-3		P43487	Q72739	O95372	P07942	Q15165
	Q9H2D6-7	Q9Y266	Q9UI10	O00159	O15355		Q15365	Q9NZB2-6	O15143	P54709	P30419
	P62195	O95218	Q9NZM3	P46776	P47914		O00151	Q9P0M9	Q9BZZ5-2	Q9UDY2	Q9BQES
	Q5JPE7	P43897	P62913	P36578	P15586		Q9UKY7	Q9NQ30	Q96HJ9-2	P62258	P47895
	P55084	Q12972	Q96AC1	Q01518	Q16595		O15371	Q53FA7	O15231-3		P02795
	Q96TA1	P84095	P30622-2	P17980	P56545		O43237	O00151	P48507		Q02952
	P09012	P11310	P11047	P27635	Q6NZI2		Q99471	P46108-2			P05121
	Q9NV33	O15305	P49419	P05198	P09493-5		P17174	P09496			P31949
	P09104	Q6IBS0	Q92973	P23396	Q9UBI1		O15143	Q15365			Q15642
	Q12907	Q13724	P61313	Q9NZM3	P08579		P62258	P67936-2			P55209
	Q9NR28	P55265	Q9UHG3	P00568	Q7LSN7		Q8NHG7	P29992			Q14195-2
	Q14974	P13798	Q9Y2W2	Q9H8L6	Q9NRA2		P04632	Q43852-4			P37802
	Q10713	Q9Y376	P33527	Q96H51	P16284		Q9UDY2	Q15075			P29966
	Q5TON5	Q92973	Q99615	Q07960	P07602			Q9UNZ2			P23381
	Q9Y5K5-4	Q9P0T7	Q9Y5K8	O00264	P00352			Q9UK76			
	Q8NDA8	Q10713	O75044	P09496	O15460			P62258			
	O14745	Q07960	Q9Y376	P54105	P31937			O75955			
	Q9NY15	O75477	Q9Y676	Q9NY33	P42224			Q15942			
	P84085	Q8WW59	Q16595	P46781	Q92572						
	P33947	Q15369	Q6UXH1	P55265	Q9BQI0						
	P17568	Q8IUD2	O14745	Q8N3V7-2	Q9UQE7						
		P30038	Q9NWB1	P61221	Q53EL6						
		P33527		Q9Y2W1	O43747						
				P13798	P48637						
				Q9P2E9	Q9UDY4						
				P61619	O95433						
				O95218	Q93009						
				P62854	P43304						
				Q9Y5X1	Q14254						
				Q9UHG3	P30042						
				Q725G4-3	Q15738						
				Q16774							
				Q9Y376							

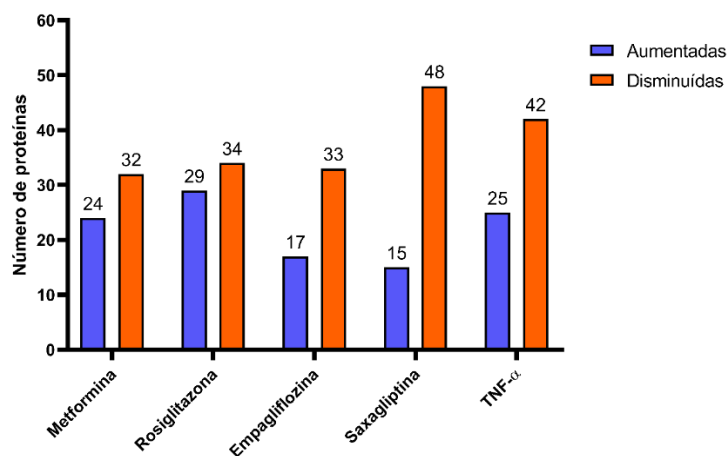


Figura 14. Cuantificación del número de proteínas moduladas (incrementadas y disminuidas) en HCAEC por los fármacos antidiabéticos (ADD) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Las proteínas con una razón de cambio (Abundancia proteína X_1 Fármaco/abundancia proteína X_1 Control, FC) ± 1.2 y valor $p < 0.05$ se consideraron diferencialmente abundantes. MET, metformina; ROS, rosiglitazona; EMPA, empagliflozina; SAXA, saxagliptina; TNF- α , Factor de necrosis tumoral alfa.

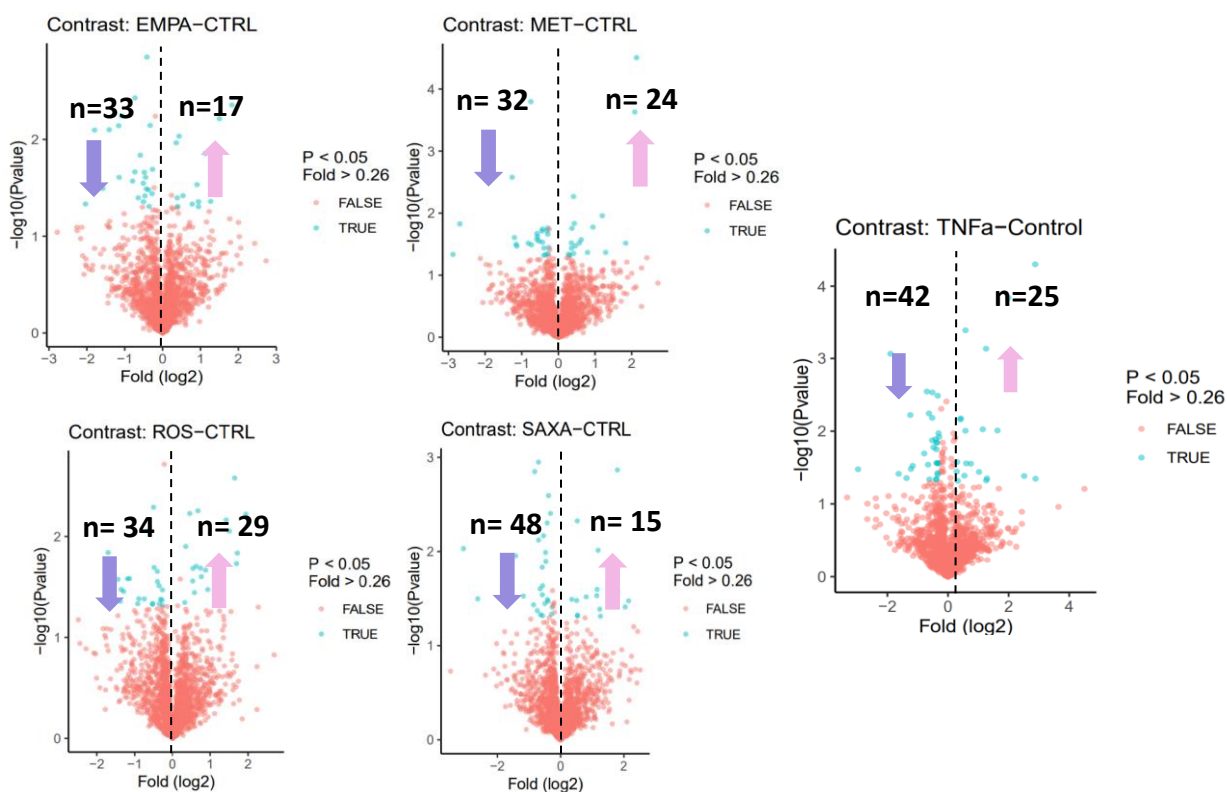


Figura 15. Gráficos de volcán de la expresión diferencial de las proteínas moduladas por los fármacos antidiabéticos (ADD) y TNF- α con relación al control. Se identificaron 299 proteínas diferencialmente abundantes (con una razón de cambio ± 1.2 y valor de p menor a 0.05) entre los fármacos su respectivo control negativo. Abreviaciones: CTRL, control; MET, metformina; ROS, rosiglitazona; EMPA, empagliflozina; SAXA, saxagliptina; TNF- α , Factor de necrosis tumoral alfa.

3.2 Identificación de vías de señalización representadas por las proteínas moduladas por los fármacos antidiabéticos (ADD) y las citocinas proinflamatorias

3.2.1 Propagación de los datos mediante ClueGo en Cytoscape

En la **Figura 16** se muestra la red de vías de señalización significativamente representadas por las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias empleando la base de datos KEGG y REACTOME. Cada nodo o círculo contiene al menos 3 proteínas que representan una vía de señalización. La vía más significativa se indica con letras negras adyacentes al nodo. El área coloreada (rojo, IL-1B y azul, TNF- α) indica la proporcionalidad de proteínas asociadas a la vía de señalización por cada citocina. Por otra parte, en la **Figura 17** se muestra la red de vías de señalización combinada que incluye las proteínas incrementadas y disminuidas por las citocinas y fármacos ADD, respectivamente. Los colores y área se corresponden con los parámetros arriba mencionados.

Las vías de inflamación identificadas con las proteínas disminuídas por las citocinas (TNF- α e IL-1B) y con las proteínas aumentadas por los ADD se muestran en la **Tabla 15** (anexo). Con el fármaco metformina se identificaron un mayor número de vías de señalización de inflamación con 216 vías, seguido de saxaglitina con 210 vías. Para rosiglitazona y empagliflozina se identificaron 82 y 83 vías de señalización respectivamente. De manera general las vías más significativas corresponden con procesos del sistema inmune, como la degradulación de neutrófilos y la señalización por interleucinas (**Figura 17**), además de modular vías correspondientes a procesamiento de proteínas (**Tabla 5**).

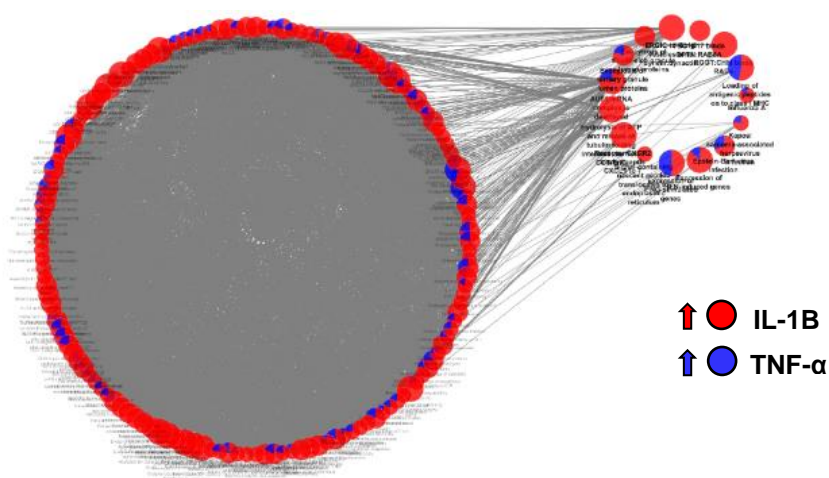


Figura 16. Vías de señalización representadas significativamente empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α . Análisis bioinformático por ClueGo en Cytoscape con la base de datos de Reactome y KEGG.

Tabla 5. Vías de señalización más significativas asociadas a inflamación moduladas por las citocinas.

Citocinas (IL1-B y TNF- α)	
Vía	p-value
Influenza A	0.012248519808054
Exocytosis of ficolin-rich granule lumen proteins	0.00340189225971699
Epstein-Barr virus infection	0.00374148064292967
TBC1D17 binds OPTN:RAB8A	0.00414285575971007
Expression of IFNG-stimulated genes	1.4149004812225E-07

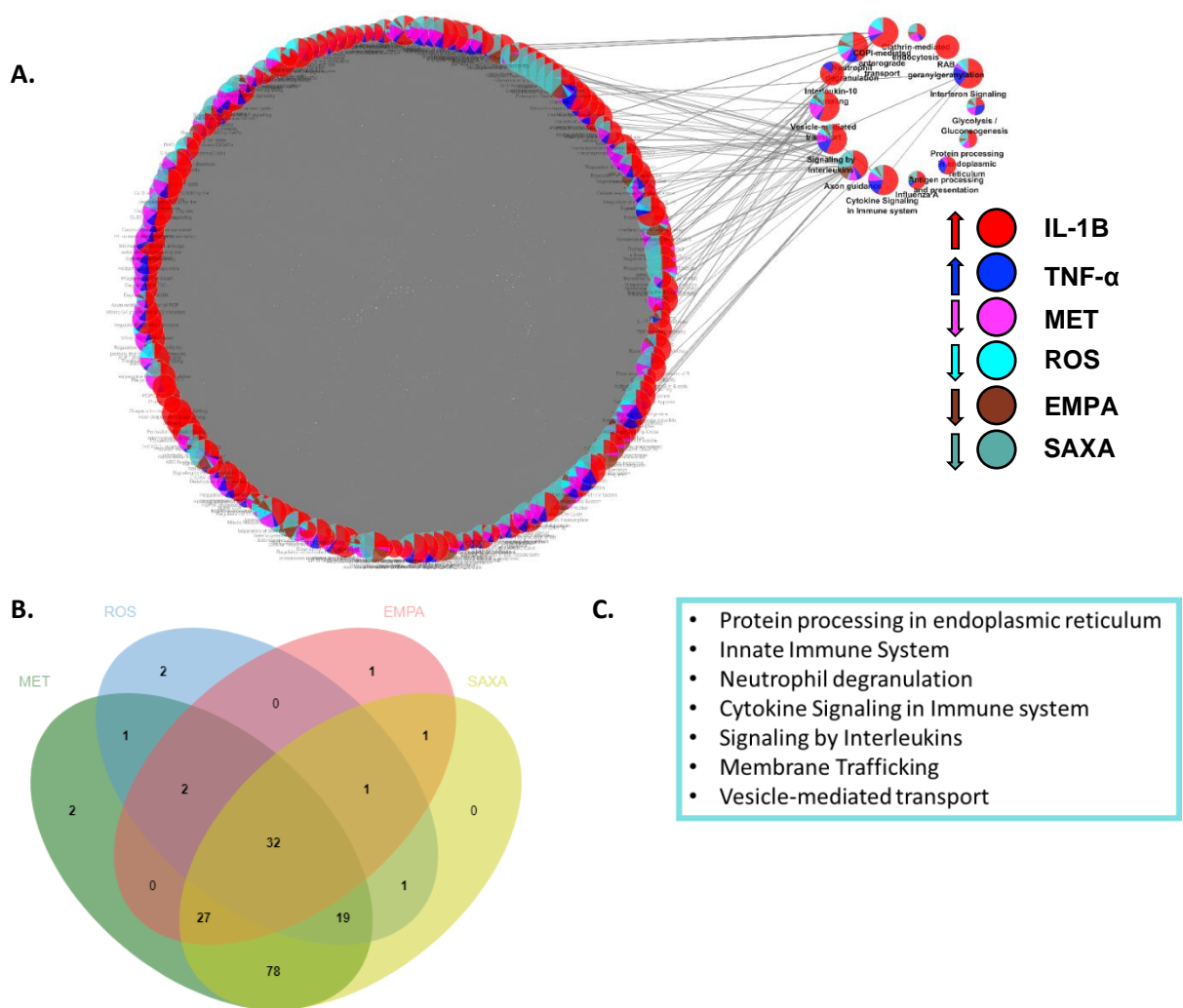


Figura 17. Vías de señalización representadas significativamente empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α , disminuidas por los fármacos antidiabéticos (ADD) utilizando las bases de datos de Reactome y KEGG. **A.** Vías de señalización aumentadas con las citocinas y disminuidas con todos los ADD. **B.** Diagrama de Venn de las vías de señalización de los fármacos con las citocinas. **C.** Vías de señalización significativas compartidas entre los ADD. Abreviaciones: MET, metformina; ROS, rosiglitazona; EMPA, empagliflozina; SAXA, saxagliptina.

Tabla 6. Vías de señalización más significativas empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α , disminuidas por los fármacos antidiabéticos (ADD).

METFORMINA		ROSIGLITAZONA		EMPAGLIFLOZINA		SAXAGLIPTINA	
Vía	p-value	Vía	p-value	Vía	p-value	Vía	p-value
Glucólisis/ Gluconeogénesis	0.01	Glucólisis/ Gluconeogénesis	0.01	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	0.03	Glucólisis/ Gluconeogénesis	0.01
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	0.03	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	0.03	Influenza A	0.01	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	0.03
Presentación y procesamiento de antígenos	0.009	Influenza A	0.01	Endocitosis mediada por clatrina	0.03	Influenza A	0.01
Endocitosis mediada por clatrina	0.03	Sistema inmune innato	6.1E- 09	Sistema inmune innato	6.1E- 09	Endocitosis mediada por clatrina	0.03
Sistema inmune innato	6.1E- 09	Desgranulación de neutrófilos	9.4E- 11	Desgranulación de neutrófilos	9.4E- 11	Sistema inmune innato	6.15E- 09

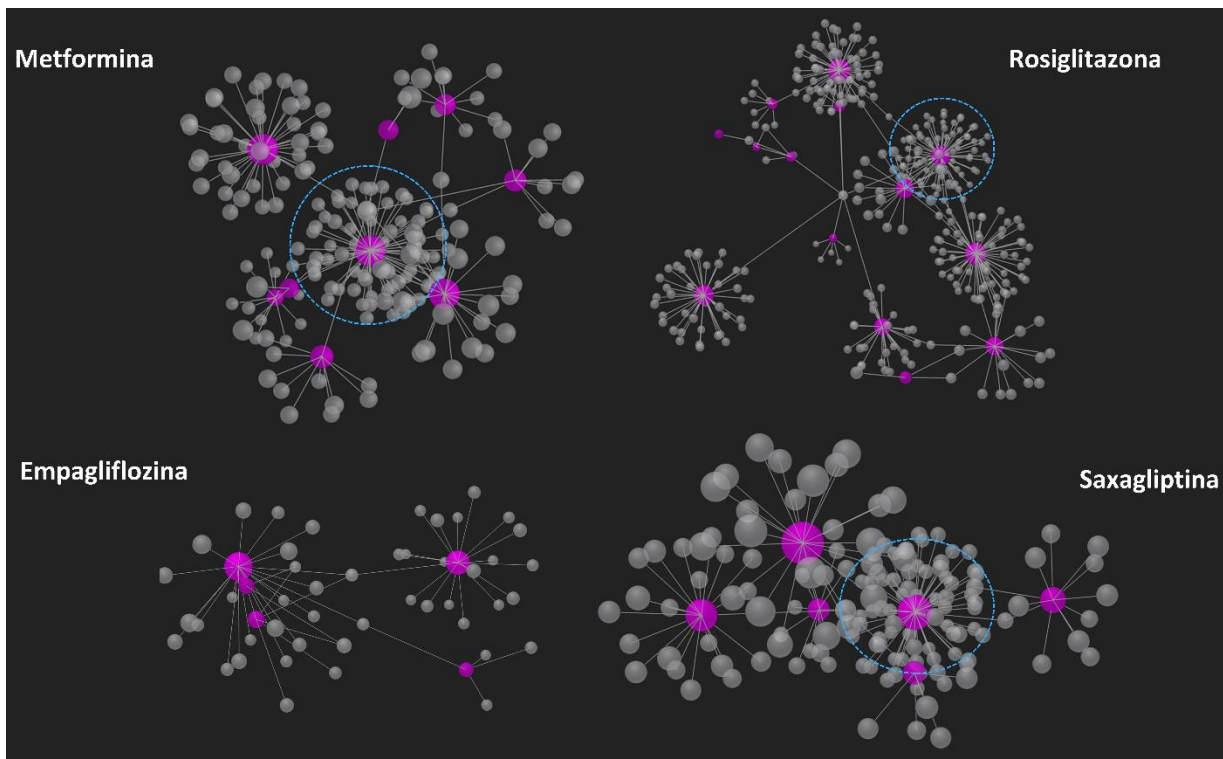
3.2.2 Propagación de los datos mediante OmicsNet

Derivado del análisis funcional con la red PPI con las proteínas incrementadas y disminuidas por los ADD en OmicsNet, se obtuvieron listas de proteínas de más de doscientos elementos (**Tabla 16** de anexos se muestran 50 vías). Las 5 vías más significativas que se obtuvieron con las bases de datos de Reactome y KEGG para cada fármaco se muestran en la **Tabla 7**. En general metformina aumento vías de señalización que corresponden al doblamiento de proteínas, procesamiento de RNA, presentación de antígenos, apoptosis y vías de señalización de sistemas hormonales; pero disminuyo vías de señalización para la degradación de proteínas. Rosiglitazona por otro lado, aumentó vías de señalización de metabolismo celular y proteólisis, pero disminuyo vías de senescencia, apoptosis y muerte celular. Para el caso de Saxagliptina se aumentaron vías de señalización de metabolismo celular, ciclo celular, y procesamiento de proteínas; pero disminuyó vías de expresión genética (transcripción y replicación) y diferenciación celular. Por último, Empagliflozina moduló vías de señalización para el sistema inmune como señalización por interleucina y señalización por neutrófilos además del metabolismo celular, y disminuyó vías de señalización de apoptosis y degradación de proteínas.

En la **Figura 19** se muestra la comparación del número de vías distintas y compartidas entre los fármacos mediante la visualización por diagrama de Venn, además se muestran las vías de señalización más

Reparación de desajustes (mismatch repair)	Metabolismo del RNAm	Ferroptosis	Señalización por Rho GTPasas	Reparación de desajustes	Metabolismo del RNAm	Vía de señalización p53	Iniciación de la traducción cap-dependiente
Reparación por escisión de nucleótidos	Expresión genética	Empalmosoma	Eventos de señalización G alpha (12/13)	Replicación de DNA	Traducción	Infección por virus del papiloma humano	Traducción
Empalmosoma	Enfermedad	Apoptosis – múltiples especies	NRAGE señala la muerte a través de JNK	Vía de señalización mTOR	Iniciación a la traducción eucariótica	Apoptosis-múltiples especies	Hidrolisis de GTP y unión de la subunidad ribosómica 60S
Vía de señalización AMPK	Degradación de beta-cadenina por el complejo de destrucción	Vía de señalización del glucagón	Señalización mediada por el receptor p75 NTR	Vía de señalización AMPK	Iniciación de la traducción cap-dependiente	Biogénesis de ribosomas en eucariotas	Regulación translacional mediada por 3'- UTR
Autofagia - otros	Señalización por Wnt	Autofagia-Otros	Señalización de muerte celular a través de NRAGE, NRIF and NADE	Autofagia - animal	Hidrólisis de GTP u unión de la subunidad ribosómica 60S	Melanoma	Silenciamiento de la traducción de la expresión mediada por L13a
Vía de señalización p53	<i>Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex</i>	Red immune intestinal para la producción de IgA	Señalización por NGF	Interacción ligando-receptor neuro activo	Regulación translacional mediada por 3' - UTR	Ferroptosis	<i>Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex</i>
Replicación del DNA	<i>Nonsense-Mediated Decay</i>	Cáncer de tiroides	Resolución de la cohesión de cromátides hermanas	Carcinogénesis química	Silenciamiento de la traducción de la expresión de ceruplasmina mediado por L13a	Leucemia mieloide crónica	<i>Nonsense-Mediated Decay</i>

A.



B.

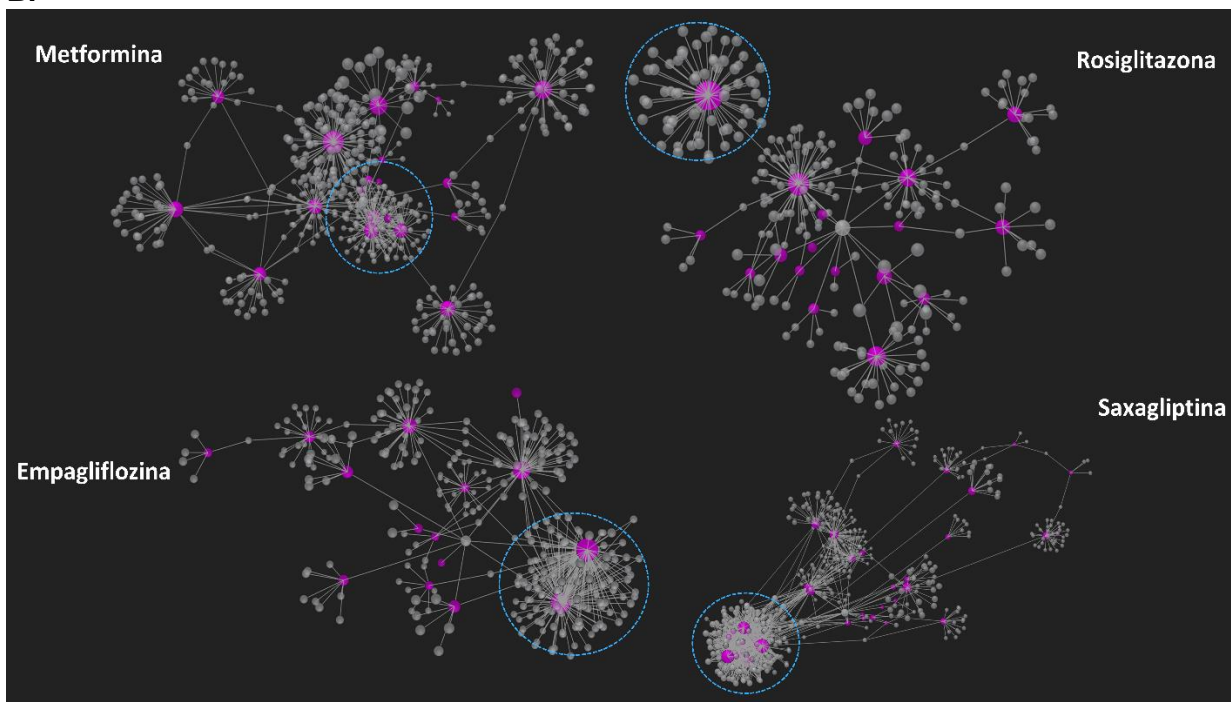


Figura 18. Red molecular creada en OmicsNet por la red molecular de interacción proteína-proteína (PPI) de los fármacos antidiabéticos (ADD) y la base de datos STRING. **A.** Red de PPI para TNF- α . **B.** Red de PPI para IL1B. **B.** Vías enriquecidas con el interactoma de las proteínas disminuidas por los fármacos. Los círculos punteados azules señalan el nodo más significativo.

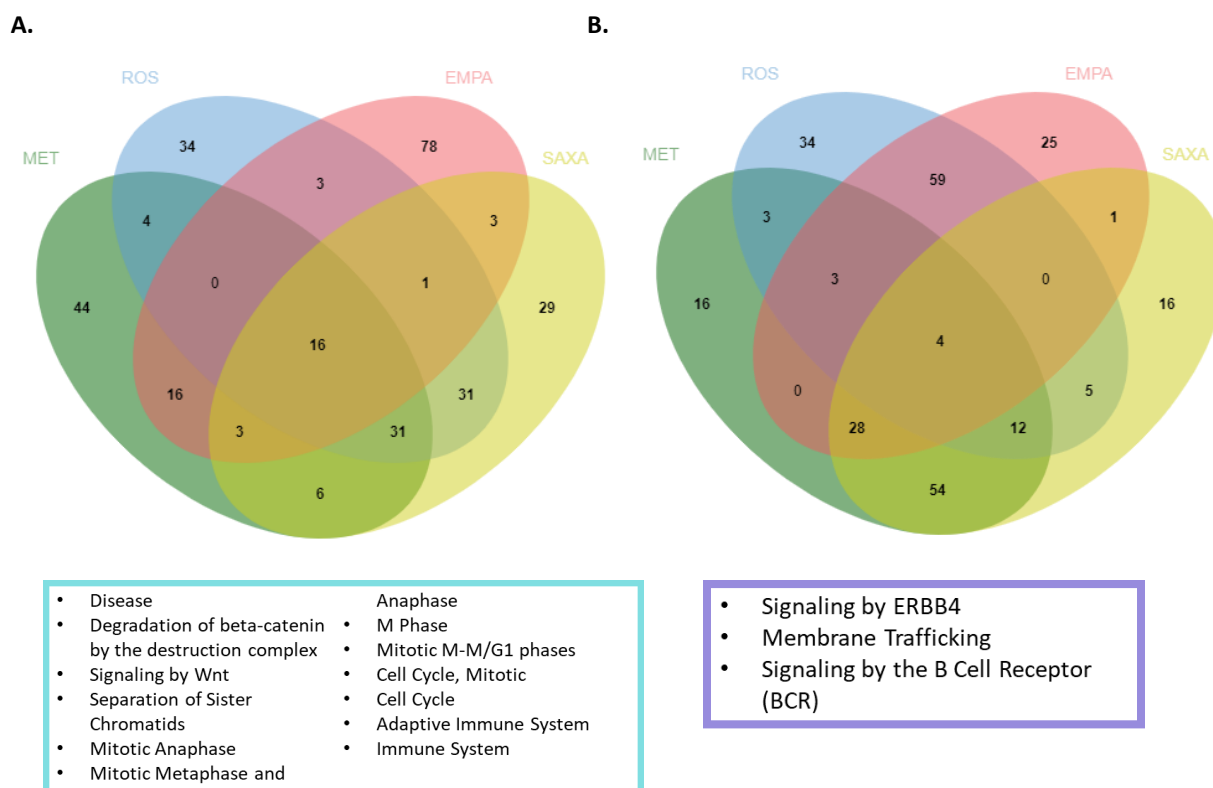


Figura 19. Diagramas de Venn de las vías de señalización aumentadas y disminuidas con los fármacos antidiabéticos (ADD). **A.** Vías de señalización aumentadas por los ADD. Se muestra en el recuadro las vías compartidas entre los fármacos. **B.** Vías de señalización disminuidas. Se muestra en el recuadro las vías compartidas entre los fármacos. Abreviaciones: MET, metformina; ROS, rosiglitazona; EMPA, empagliflozina; SAXA, saxagliptina.

Realizamos el análisis por separado de las vías de señalización de las citocinas proinflamatorias las más significativas se encuentran en la **Tabla 8**. Para el caso de IL-1B de acuerdo con su red PPI (**Figura 20**) IL-1B moduló vías de señalización relacionadas al sistema inmune, metabolismo de RNA, y diferentes procesos de factores de transcripción. Por otro lado TNF- α moduló vías de señalización correspondientes a la degradación de proteínas u presentación cruzada de antígenos, transporte de proteínas y reparación de errores en el RNA. Las principales redes moleculares obtenidas con OmicsNet se muestran en la **Figura 20**.

Tabla 8. Vías de señalización más significativas deducidas con la interacción entre proteínas (PPI) de las citocinas con la base de datos de STRING.

IL-1B				TNF- α			
KEGG	p-value	Reactome	p-value	KEGG	p-value	Reactome	p-value
Factores de transcripción basales	5.17E-56	Sistema Inmune	3.07E-52	Reparación de desajustes/apareamientos incorrectos	7.62E-48	Regulación de PAK-2p34 activada por degradación mediada por proteasomas	1.42E-43
MicroRNAs en cáncer	1.58E-37	Metabolismo de RNA	1.17E-39	Carcinogénesis química	3.86E-11	Presentación cruzada de antígenos exógenos solubles(endosomas)	1.42E-43
Infección por el virus del herpes simple 1	3.37E-36	Metabolismo de RNA	1.26E-38	La potenciación a largo plazo	9.55E-06	Degradación de ciclina D1 dependiente de ubiquitina	2.89E-43
Reparación de desajustes/apareamientos incorrectos	4.23E-30	Degradación de beta-catedina por el complejo de destrucción D	3.10E-36	Infección por citomegalovirus humano	0.000465	Fosforilación mediada por CDK y eliminación de Cdc6	2.89E-43
Vía de señalización de esfingolípidos	1.73E-29	Señalización por Wnt	3.10E-36	Contracción del músculo cardiaco	0.000802	Degradación de ciclina D dependiente de ubiquitina	2.89E-43

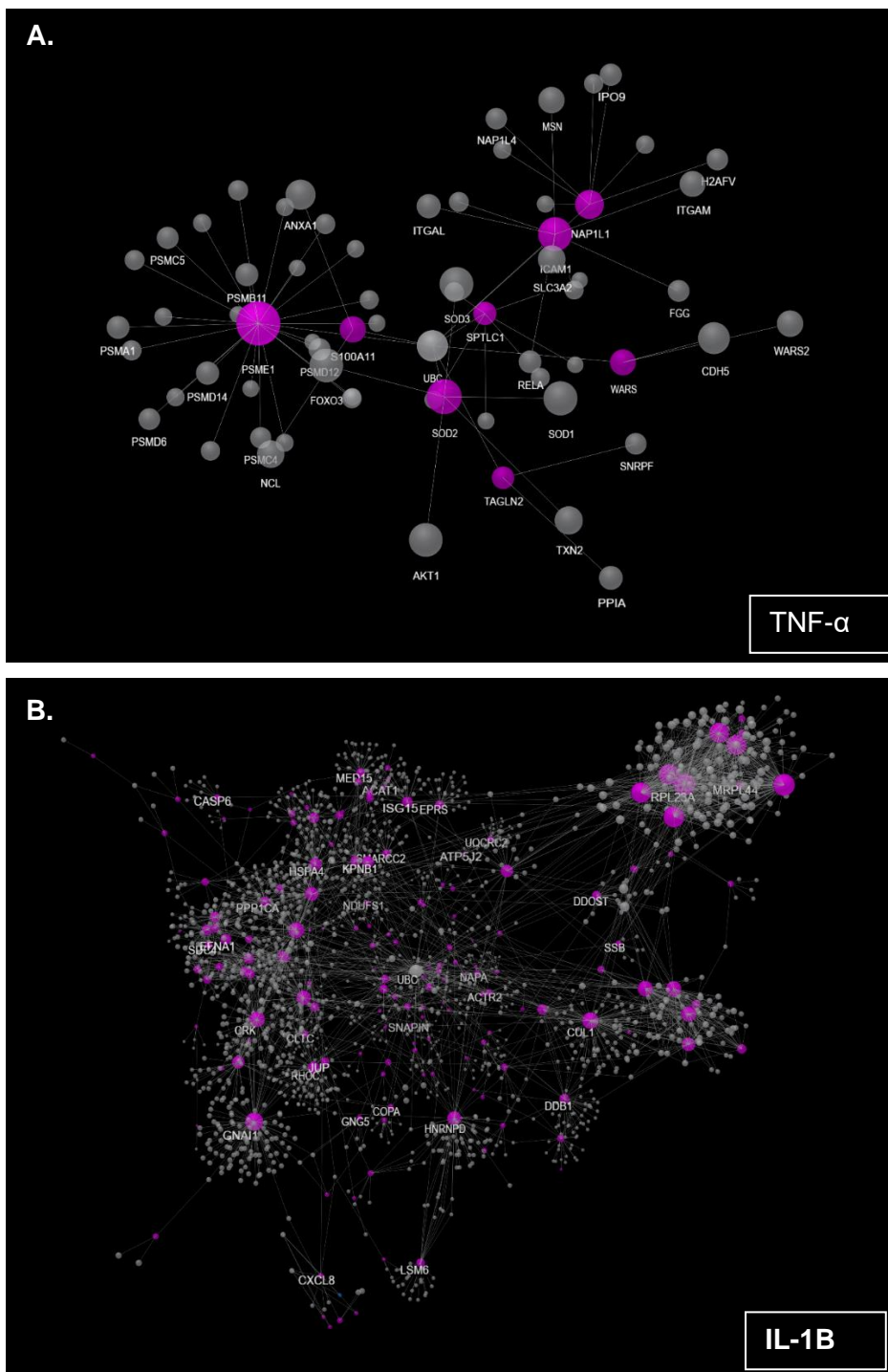


Figura 20. Red molecular creada en OmicsNet por la red de interacción proteína-proteína (PPI) de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL 1B y la base de datos STRING. **A.** Red de PPI para TNF- α . **B.** Red de PPI para IL-1B.

Capítulo 4. Discusión

La DMT2 confiere un elevado riesgo de mortalidad por CVD. A pesar de existir un gran repertorio de ADD en la clínica que regulan la glucosa en sangre en sujetos con DMT2, estos individuos bajo tratamiento farmacológico siguen presentando un mayor riesgo de CVD y mortalidad que sujetos sin la enfermedad. A este fenómeno se le conoce como riesgo residual (Gimeno Orna et al., 2020). No obstante, pocos fármacos como la empagliflozina han demostrado —con suficiente evidencia clínica— reducir el riesgo de complicaciones cardíacas y mortalidad en sujetos con DMT2, mientras que otros —particularmente rosiglitazona— incrementan ciertas complicaciones cardíacas (p.ej., ICC). El mecanismo molecular de los ADD que explica estos efectos clínicos se desconoce. Es por esto, que, en este trabajo de tesis, se planteó investigar los efectos moleculares de cuatro ADD de distintas clases y con distintos mecanismos de acción anti hiperglucemiante en un modelo *in vitro* de HCAEC relevante en el contexto de CVD. Mediante un análisis proteómico por LC-MS² y bioinformático evaluamos las vías de señalización moduladas por los ADD. Esta información puede contribuir a identificar los mecanismos moleculares —independientes de sus efectos antihiperglucemiantes— de los ADD que expliquen sus efectos clínicos sobre la salud cardiovascular en sujetos con DMT2.

La DMT2 es una enfermedad metabólica que se caracteriza por causar hiperglucemia y resistencia a la insulina periférica (DeFronzo et al., 2015; Kahn, 1994). Uno de los problemas más graves de esta enfermedad es que incrementa el riesgo de mortalidad y CVD. Y, a pesar de la terapia farmacológica (ADD) que existe y que mejora el metabolismo de glucosa, los sujetos con esta patología siguen manifestando una mayor prevalencia de IAM y mortalidad que sujetos sin la enfermedad (Tancredi et al., 2015). Uno esperaría que la terapia farmacológica disminuyera el riesgo de mortalidad prematura a niveles de individuos sin la enfermedad. Por esto, mecanismos distintos al control de la glucosa parecen desempeñar un papel relevante en el riesgo cardiovascular en sujetos con DMT2. No obstante, se ha descrito que ciertos ADD sí parecen reducir el riesgo cardiovascular mediante mecanismos independientes de su propiedad antihiperglucemiante, mientras otros incrementan el riesgo cardíaco (p.ej., ICC). En el presente trabajo investigamos los mecanismos moleculares que ciertos ADD, de las clases más representativas, ejercen en el endotelio coronario. Para esto, utilizamos como modelo *in vitro*, HCAEC las cuales proveen de mayor relevancia fisiológica en el contexto de CVD y DMT2. Estudios clínicos han demostrado la importancia de la función del endotelio coronario en el desarrollo de CVD (Halcox et al., 2002). Cabe destacar que la mayoría de la investigación sobre la DMT2 y función endotelial se centra en el uso de células endoteliales provenientes de tejidos distintos al corazón, existiendo una notoria preferencia sobre el uso de HUVEC como modelo para determinar el efecto de fármacos y mecanismos de daño endotelial

(Andreadou et al., 2017; Arunachalam et al., 2014; Baselet et al., 2020; Birnbaum et al., 2016; Brown et al., 2017; Demaille et al., 2005; Eriksson et al., 2012; Eriksson y Nyström, 2014; Iannantuoni et al., 2020; Ma et al., 2019; Millioni et al., 2010; Tian et al., 2019; Uthman et al., 2019; Zhou et al., 2018). Ciertos ADD presentan evidencia clínica acerca de su papel en la reducción de las complicaciones cardiovasculares en sujetos con DMT2 (**Tabla 3**). Empagliflozina por ejemplo es el fármaco con la evidencia más sólida respecto a una aparente reducción de la mortalidad y complicaciones cardiovasculares (Fitchett et al., 2016). Al fármaco de primera línea, metformina, también se le han atribuido efectos positivos sobre la reducción del riesgo de mortalidad por complicaciones cardíacas e IAM, pero, esta evidencia no es tan clara como la existente para empagliflozina (Paneni y Lüscher, 2017). Por otra parte, existe una amplia evidencia de que la rosiglitazona aumenta el riesgo de ciertas complicaciones en sujetos con DMT2, incluyendo la ICC (Singh et al., 2007). Esto ha desencadenado inclusive en la prohibición de rosiglitazona en Europa debido a sus potenciales efectos deletéreos sobre la función cardíaca (Cheung, 2010). De la misma manera se sugiere que ciertos fármacos como la saxagliptina incrementan el riesgo de ICC y previos eventos cardiovasculares adversos (IAM, angina de pecho o ICC), sin embargo, no parecen ejercer una reducción o aumento en la mortalidad cardiovascular (Green et al., 2015; Scirica et al., 2013; White et al., 2014). Derivado de esta evidencia clínica, en este estudio empleamos los ADD anteriormente mencionados; metformina, empagliflozina, saxagliptin y rosiglitazona.

Para evaluar los efectos moleculares de los ADD, tratamos a las HCAEC con concentraciones clínicamente relevantes de metformina, rosiglitazona, empagliflozina, y saxagliptina o vehículo por 48 hrs (**Figura 9**). El parámetro o endpoint (por su definición en inglés) de “efecto” de los ADD fue la medición cuantitativa de la abundancia de las proteínas entre células tratadas y no tratadas (vehículo). Para esto, se utilizó un método de proteómica basado en la metodología SWATH para determinar la abundancia proteínica entre los diferentes grupos estudiados. Esta variante del método DIA presenta una mayor precisión y exactitud para la cuantificación de las proteínas con respecto a otras técnicas por LC-MS, además de ofrecer la gran ventaja de crear un archivo digital de cada muestra para análisis posteriores (Anjo et al., 2017; Sajic et al., 2015). Anteriormente se habían podido identificar 250 proteínas en HCAEC en condiciones alta glucosa y glucosa normal tratados con rosiglitazona, utilizando un espectrómetro MALDI-TOF 4800 (Millioni et al., 2010). En nuestro estudio pudimos realizar la identificación y cuantificación de 1927 proteínas provenientes del proteoma de las HCAEC (**Tabla 14**), lo que demuestra la cobertura de detección de nuestro método. De este número, identificamos globalmente 232 proteínas con cambios significativos por el tratamiento con los 4 ADD (**Figura 4**). El mecanismo de acción responsable de los efectos antihyperglucemiantes para los ADD aquí evaluados está bien estudiado e involucra acciones a nivel de órganos y tejidos como el hígado y páncreas (DeFronzo et al., 2015). A pesar de que el endotelio

no es un órgano principal regulador del metabolismo de la glucosa, encontramos que la saxagliptina - cuyo mecanismo de acción es inhibir a la DPP-4 (ADA, 2020)-moduló la abundancia proteínica de la isoforma DPP-3. La relevancia de este efecto se desconoce, ya que no existe evidencia al respecto.

Para la interpretación de las vías de señalización moduladas por los ADD -provenientes de las proteínas que cambiaron en abundancia- realizamos un análisis de enriquecimiento funcional (Bases de datos KEGG y REACTOME) usando dos enfoques distintos; 1) enfoque dirigido sobre inflamación mediante la creación de una red proteínica (del inglés *protein network*) entre las proteínas moduladas por los ADD y citocinas proinflamatorias IL1B y TNF- α , y 2) enfoque no dirigido sobre las vías de señalización moduladas por los ADD mediante la creación de redes proteínicas (PPI). Con el enfoque 1, encontramos que todos los ADD modulaban antagónicamente vías de señalización inflamatorias activadas por las citocinas, pero a distinto nivel. Específicamente, metformina moduló significativamente un mayor número de vías (216 vías) seguido de saxagliptina (210 vías), rosiglitazona (82) y empagliflozina(83). Las vías de señalización inflamatorias moduladas por ADD se corresponden con procesos del sistema inmune, señalización de interleucinas e interferón y degranulación de neutrófilos. Estos resultados están en concordancia con ciertos estudios clínicos (Hattori, 2018; Njerve et al., 2017), *in vitro* e *in vivo* que sugieren efectos modulatorios por los fármacos en el sistema inmune, sobre todo en mecanismos antiinflamatorios (Jigheh et al., 2019; Pankevich et al., 2017; Schuiveling et al., 2017; Y. Yang et al., 2018).

Por otro lado, con el enfoque 2 encontramos distintas vías de señalización moduladas (activadas y disminuidas) por los ADD. El mayor número de vías activadas se observó con empagliflozina, seguido de rosiglitazona, saxagliptina y metformina. Específicamente, metformina aumentó vías de señalización que corresponden al doblamiento de proteínas, procesamiento de RNA, presentación de antígenos, apoptosis y vías de señalización de sistemas hormonales; además disminuyó vías de señalización para la degradación de proteínas. A pesar de que se han reportado efectos anti apoptóticos en HCAEC bajo el tratamiento con metformina (Eriksson y Nyström, 2014), también existe evidencia donde el uso de metformina en sinergia con FTY720 (fármaco inmunomodulador para el tratamiento de la esclerosis múltiple) induce apoptosis en varias células mieloides en cáncer (Zhao et al., 2018). Además se sugiere que metformina modula vías alternativas de corte y empalme de RNAm(Laustriat et al., 2015; Matsumoto et al., 2020; Yi et al., 2016) que pudieran tener diferentes efectos como la atenuación de retinopatía diabética (Yi et al., 2016). En efecto, en este estudio se encontró un aumento en la señalización del corte y empalme de RNAm en células tratadas con metformina. Cabe señalar que en nuestro estudio la vía AMPK se vio disminuida en células tratadas con metformina, la cual se cree es uno de los principales mediadores de acción del fármaco con respecto a sus efectos antihiper glucemiantes, estimuladores de la función celular, reductores de daño

celular y anticancerígenos (Triggle y Ding, 2017). Dichos estudios reportan un incremento en la activación de AMPK por metformina, contrario a nuestro estudio. Esta discrepancia puede ser atribuida en parte (entre otras que incluyen el tipo de modelo *in vitro*) a que dichos estudios emplean concentraciones supra fisiológicas (1 mM-5 mM), mientras nuestro estudio emplea concentraciones fisiológicas. Es por esto, que existe una gran controversia sobre los mecanismos mediadores de los efectos de metformina, lo cual pudiera ser explicado por la concentración empleada del fármaco (Duca et al., 2015; Tian et al., 2019; F. Yang et al., 2019; J. Ye et al., 2018).

El fármaco rosiglitazona aumentó, en general, vías de señalización del metabolismo celular y proteólisis, pero disminuyó vías de senescencia, apoptosis y muerte celular. Estudios describen efectos moduladores de la apoptosis por el fármaco, sin embargo, existe controversia en este aspecto, ya que mientras algunos autores sugieren un incremento en la apoptosis (Ji et al., 2018), otros sugieren una reducción de este proceso en células endoteliales (Baselet et al., 2020; Millionini et al., 2010). Adicionalmente, rosiglitazona incrementó la vía de la reabsorción de agua regulada por vasopresina (CRK, GNA11), lo cual se ha reportado en modelos animales (Song et al., 2004). En algunos estudios clínicos se ha observado que el fármaco incrementa la retención de líquidos (edema) que eventualmente empeora la función del corazón e incrementa el riesgo de ICC (Home et al., 2009; Tatti et al., 2008). Se sugiere que la activación de la señalización de vasopresina en el riñón por rosiglitazona deriva en la formación de edema, mecanismo independiente de sus efectos antihiperglucemiantes (J. Xu et al., 2017). No obstante, un incremento en la permeabilidad vascular (a nivel del endotelio) puede también propiciar la captación de líquido intravascular y en consecuencia desarrollar edema. Nuestro estudio sugiere que la rosiglitazona activa este proceso en HCAEC.

Por otro lado, nuestros datos sugieren que Rosiglitazona disminuyó la vía de señalización de p53 en HCAEC, sin embargo en varios tipos de líneas celulares de cáncer está descrito que rosiglitazona activa esta vía que deriva en la estimulación de angiogénesis y metástasis (Chiu et al., 2010; Doonan et al., 2009; Sun et al., 2009; Z. Wang et al., 2020). Esto sugiere efectos diferenciales del fármaco entre células malignas y no malignas.

Con el fármaco empagliflozina, observamos una activación de las vías de señalización de AMPK y MAPK en HCAEC. En efecto, algunos reportes han evidenciado la activación de AMPK por el fármaco (Koyani et al., 2020; Lu et al., 2020; Zhou et al., 2018), e inclusive se ha señalado que la activación de esta vía es la responsable de la reducción del gasto energético y los efectos antiinflamatorios de empagliflozina, lo que resulta en el mejoramiento de la función cardíaca (Koyani et al., 2020).

De manera notable, se observó que empagliflozina atenuó vías relacionadas con disfunción endotelial, específicamente la vía de señalización de p53, la cual se asocia con el desarrollo de disfunción endotelial (incremento de procesos de coagulación) (Knight et al., 2018; Kumar et al., 2011). Se ha reportado que el fármaco también está involucrado en la atenuación de la apoptosis, *in vitro*, en células de riñón (Lee et al., 2019) y en diversos estudios *In vivo* (Abdel-latif et al., 2020; Amin et al., 2020; Kabel et al., 2020). En nuestro estudio se observó una reducción de procesos apoptóticos por empagliflozina. Esto sugiere que el fármaco mejora la función endotelial al modular distintas vías de señalización protectoras.

La vía de señalización Hedgehog desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario y postnatal vascular además del mantenimiento de la homeostasis en la vasculatura y el corazón (Salybekov et al., 2018). La proteína Sonic Hedgehog –parte de la vía –regula el crecimiento de las células endoteliales además de promover la migración y estimular la formación de vasos sanguíneos (Fuchs et al., 2012). En este estudio observamos que la saxagliptina aumentó dicha vía de señalización, lo cual sugiere que el fármaco promueve la angiogénesis. Por otro lado encontramos que saxagliptina disminuyó la vía de señalización para mTOR (por sus siglas en inglés *mammalian Target of rapamycin*, o diana de la rapamicina en mamíferos), una proteína con actividad cinasa sobre serina-treonina que funciona como punto de convergencia para diversas señales que median el crecimiento celular, metabolismo energético, la disponibilidad de nutrientes y el estrés celular (Jia et al., 2014). Se ha descrito que la activación de esta vía podría deberse a una respuesta adaptativa metabólica que promueve la resistencia a la insulina, y eventualmente al desarrollo de DMT2 (Suhara et al., 2017), además también se ha asociado con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y disfunción endotelial (Whaley-Connell et al., 2012). Por otro lado, también se ha descrito que la activación de esta vía podría ser una respuesta compensatoria de las células a señales estimulantes continuas, como el exceso de nutrientes (Aroor et al., 2013). Esta vía podría indicarnos un mecanismo por el cual la saxagliptina ejerce una respuesta compensatoria ante el daño endotelial.

Saxagliptina disminuyó también la vía de señalización de AMPK, pero aún no es clara la relación que tiene el fármaco con la modulación de esta vía (Vyas et al., 2013). En modelos *in vivo* se ha reportado un incremento en la expresión de AMPK con saxagliptina, pero solo bajo condiciones de ejercicio (Keller et al., 2015). De manera semejante, se ha observado un incremento de la proteína AMPK en cepas de ratones BTBR bajo tratamiento con saxagliptina en combinación con dapagliflozina (Ye et al., 2017).

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados presentados en este estudio sugieren un posible efecto antagónico de los ADD sobre vías de señalización activadas por las citocinas proinflamatorias IL 1B y TNF- α . El empleo de la bioinformática y redes de PPI, nos sugiere que metformina modula principalmente vías de transcripción de RNA; rosiglitazona, apoptosis y división celular; empagliflozina, apoptosis y procesamiento de DNA; y saxagliptina inflamación, así como vías del metabolismo mitocondrial. Además, nuestros datos sugieren que rosiglitazona estimula vías de señalización que incrementan la permeabilidad vascular en HCAEC, lo cual puede explicar sus efectos sobre la acumulación de líquido intravascular (edema) y falla cardiaca en sujetos tratados con el fármaco. En conclusión, nuestro estudio provee de información mecanicista sobre los efectos que los ADD, de las principales clases químicas, ejercen en el endotelio coronario humano y delinea efectos protectores y negativos que pueden explicar los efectos clínicos observados en sujetos tratados con los fármacos.

Perspectivas futuras: Con el conocimiento de los mecanismos moleculares de los ADD involucrados en los efectos (observables en la clínica) sobre el sistema cardiovascular, podrían desarrollarse nuevas estrategias para la enfermedad, con tratamientos dirigidos no solo al control de la glucosa en sangre, si no en reducir la mortalidad de la DMT2. Se requiere de más estudios confirmatorios (p. ej. western blot) que evalúen los resultados observables en este estudio, además de la integración de más datos (como el metabolóma de las HCAEC) para una generación de vías de señalización más completa.

Literatura citada

- Abdel-latif, R. G., Rifaai, R. A., Amin, E. F. 2020. Empagliflozin alleviates neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through HIF-1 α /VEGF signaling pathway. *Archives of Pharmacal Research*, 43(5), 514–525. doi:10.1007/s12272-020-01237-y
- American Diabetes Association. 2020a. 9. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of medical care in diabetes—2020. *Diabetes Care*, 43(Suppl 1), S98–S110. doi:10.2337/dc20-S009
- American Diabetes Association. 2020b. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*, 43(Suppl 1), S14–S31. doi:10.2337/dc20-S002
- Amin, E. F., Rifaai, R. A., Abdel-latif, R. G. 2020. Empagliflozin attenuates transient cerebral ischemia/reperfusion injury in hyperglycemic rats via repressing oxidative–inflammatory–apoptotic pathway. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 34(5), 548–558. doi:10.1111/fcp.12548
- Andreadou, I., Efentakis, P., Balafas, E., Togliatto, G., Davos, C. H., Varela, A., Dimitriou, C. A., Nikolaou, P.-E., Maratou, E., Lambadiari, V., Ikonomidis, I., Kostomitsopoulos, N., Brizzi, M. F., Dimitriadis, G., Iliodromitis, E. K. 2017. Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects. *Frontiers in Physiology*, 8(DEC), 1077. doi:10.3389/fphys.2017.01077
- Anjo, S. I., Santa, C., Manadas, B. 2017, febrero 1. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics*, Vol. 17. doi:10.1002/pmic.201600278
- Aroor, A. R., McKarns, S., Demarco, V. G., Jia, G., Sowers, J. R. 2013, noviembre 1. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, Vol. 62. doi:10.1016/j.metabol.2013.07.001
- Arunachalam, G., Samuel, S. M., Marei, I., Ding, H., Triggle, C. R. 2014. Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1. *British Journal of Pharmacology*, 171(2), 523–535. doi:10.1111/bph.12496
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., Rasool, M. H. 2017, febrero 1. Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 55. doi:10.1093/chromsci/bmw167
- Ball, B., Bermas, A., Carruthers-Lay, D., Geddes-McAlister, J. 2019. Mass Spectrometry-Based Proteomics of Fungal Pathogenesis, Host–Fungal Interactions, and Antifungal Development. *Journal of Fungi*, 5(2), 52. doi:10.3390/jof5020052
- Baselet, B., Driesen, R. B., Coninx, E., Belmans, N., Sieprath, T., Lambrichts, I., De Vos, W. H., Baatout, S., Sonveaux, P., Aerts, A. 2020. Rosiglitazone Protects Endothelial Cells From Irradiation-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 268. doi:10.3389/fphar.2020.00268
- Birnbaum, Y., Bajaj, M., Qian, J., Ye, Y. 2016. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by Saxagliptin prevents inflammation and renal injury by targeting the Nlrp3/ASC inflammasome. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 4(1), e000227. doi:10.1136/bmjdr-2016-000227
- Boussageon, R., Supper, I., Bejan-Angoulvant, T., Kellou, N., Cucherat, M., Boissel, J.-P., Kassai, B., Moreau, A., Gueyffier, F., Cornu, C. 2012. Reappraisal of Metformin Efficacy in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *PLoS Medicine*, 9(4), e1001204.

doi:10.1371/journal.pmed.1001204

- Brown, S. M., Smith, C. E., Meuth, A. I., Khan, M., Aroor, A. R., Cleeton, H. M., Meininger, G. A., Sowers, J. R., DeMarco, V. G., Chandrasekar, B., Nistala, R., Bender, S. B. 2017. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition With Saxagliptin Ameliorates Angiotensin II–Induced Cardiac Diastolic Dysfunction in Male Mice. *Endocrinology*, 158(10), 3592–3604. doi:10.1210/en.2017-00416
- Casanova, F., Adingupu, D. D., Adams, F., Gooding, K. M., Looker, H. C., Aizawa, K., Dove, F., Elyas, S., Belch, J. J. F., Gates, P. E., Littleford, R. C., Gilchrist, M., Colhoun, H. M., Shore, A. C., Khan, F., Strain, W. D. 2017. The impact of cardiovascular co-morbidities and duration of diabetes on the association between microvascular function and glycaemic control. *Cardiovascular Diabetology*, 16(1), 1–11. doi:10.1186/s12933-017-0594-7
- Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K., Lohani, G. P., Mirza, W. 2017. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 6. doi:10.3389/fendo.2017.00006
- Chawade, A., Alexandersson, E., Levander, F. 2014. Normalyzer: A tool for rapid evaluation of normalization methods for omics data sets. *Journal of Proteome Research*, 13(6), 3114–3120. doi:10.1021/pr401264n
- Cheung, B. M. Y. 2010, noviembre. Behind the rosiglitazone controversy. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, Vol. 3. doi:10.1586/ecp.10.126
- Chiu, S. J., Hsaio, C. H., Tseng, H. H., Su, Y. H., Shih, W. L., Lee, J. W., Chuah, J. Q. Y. 2010. Rosiglitazone enhances the radiosensitivity of p53-mutant HT-29 human colorectal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(3), 774–779. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.068
- Chou, C.-A., Ng, H.-Y., Kuo, W.-H., Chiou, T.-Y. T., Pei, S.-N., Li, L.-C., Lee, Y.-T., Lee, C.-T. 2015. Rosiglitazone attenuates indoxyl sulphate-induced endothelial dysfunction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(3), 287–292. doi:10.1111/1440-1681.12351
- Clarke, W. 2017. Mass spectrometry in the clinical laboratory: Determining the need and avoiding pitfalls. En *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. doi:10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8
- Cooper, S., Teoh, H., Campeau, M. A., Verma, S., Leask, R. L. 2019. Empagliflozin restores the integrity of the endothelial glycocalyx in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 459(1–2), 121–130. doi:10.1007/s11010-019-03555-2
- Corrales-santander, H., Pacheco-ayos, C., Pájaro, N., Corrales-santander, H. 2018. Enfermedad Coronaria en el Paciente con Diabetes Mellitus Tipo 2 Coronary Disease in the Patient with Diabetes Mellitus Type 2. *MedPub*, 14(2:7), 1–3. doi:10.3823/1389
- Cruz Hernández, J., Manuel Emiliano Licea Puig, I., Dra Pilar Hernández García, I., Dra Marelys Yanes Quesada, I., Dra Alena Salvato, I. 2012. Disfunción endotelial y diabetes mellitus Endothelial dysfunction and diabetes mellitus. En *Revista Cubana de Endocrinología (Vol. 23)*. de <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>
- De la Herrán, H. C. D., Donis-Maturano, L., Álvarez-Delgado, C., Villarreal, F., Moreno-Ulloa, A. 2019.

- Formation of multinucleated variant endothelial cells with altered mitochondrial function in cultured coronary endothelium under simulated diabetes. *bioRxiv*, 622407. doi:10.1101/622407
- Deacon, C. F., Holst, J. J. 2009, mayo 14. Saxagliptin: A new dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Advances in Therapy*, Vol. 26. doi:10.1007/s12325-009-0030-9
- DeFronzo, R. A. 2009. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. doi:10.2337/db09-9028
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., Weiss, R. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Publishing Group*, (July), 1–23. doi:10.1038/nrdp.2015.19
- Detaille, D., Guigas, B., Chauvin, C., Batandier, C., Fontaine, E., Wiernsperger, N., Leverve, X. 2005. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*, 54(7), 2179–2187. doi:10.2337/diabetes.54.7.2179
- Doonan, F., Wallace, D. M., O’Driscoll, C., Cotter, T. G. 2009. Rosiglitazone acts as a neuroprotectant in retinal cells via up-regulation of sestrin-1 and SOD-2. *Journal of Neurochemistry*, 109(2), 631–643. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05995.x
- Duca, F. A., Côté, C. D., Rasmussen, B. A., Zadeh-tahmasebi, M., Rutter, G. A., Filippi, B. M., Lam, T. K. T. 2015. Metformin activates a duodenal Ampk – dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. 21(5). doi:10.1038/nm.3787
- El-Daly, M., Pulakazhi Venu, V. K., Saifeddine, M., Mihara, K., Kang, S., Fedak, P. W. M., Alston, L. A., Hirota, S. A., Ding, H., Triggle, C. R., Hollenberg, M. D. 2018. Hyperglycaemic impairment of PAR2-mediated vasodilation: Prevention by inhibition of aortic endothelial sodium-glucose-co-Transporter-2 and minimizing oxidative stress. *Vascular Pharmacology*, 109, 56–71. doi:10.1016/j.vph.2018.06.006
- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M., Bers, D. M. 2013. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, 502(7471), 372–376. doi:10.1038/nature12537
- Eriksson, L., Erdogdu, Ö., Nyström, T., Zhang, Q., Sjöholm, Å. 2012. Effects of some anti-diabetic and cardioprotective agents on proliferation and apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*, 11(1), 1–9. doi:10.1186/1475-2840-11-27
- Eriksson, L., Nyström, T. 2014. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin protects human coronary artery endothelial cells against diabetic lipooptosis. *Cardiovascular Diabetology*, 13(1), 152. doi:10.1186/s12933-014-0152-5
- Finka, A., Goloubinoff, P. 2013. Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. *Cell Stress and Chaperones*, 18(5), 591–605. doi:10.1007/s12192-013-0413-3
- Fitchett, D., Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J. M., Hantel, S., Salsali, A., Johansen, O. E., Woerle, H. J., Broedl, U. C., Inzucchi, S. E. 2016. Heart failure outcomes with empagliflozin in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: Results of the EMPA-REG OUTCOME® trial. *European Heart*

Journal, 37(19), 1526–1534. doi:10.1093/eurheartj/ehv728

- Fuchs, S., Dohle, E., Kirkpatrick, C. J. 2012. Sonic Hedgehog-Mediated Synergistic Effects Guiding Angiogenesis and Osteogenesis. En *Vitamins and Hormones* (Vol. 88). doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00022-5
- Gimbrone, M. A., García-Cardena, G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 620–636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
- Gimeno Orna, J. A., Ortez Toro, J. J., Peteiro Miranda, C. M. 2020, abril 1. Evaluation and management of residual cardiovascular risk in patients with diabetes. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, Vol. 67. doi:10.1016/j.endinu.2019.05.004
- Golightly, L. K., Drayna, C. C., McDermott, M. T. 2012. Comparative Clinical Pharmacokinetics of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*, 51(8), 501–514. doi:10.1007/bf03261927
- Green, J. B., Bethel, M. A., Armstrong, P. W., Buse, J. B., Engel, S. S., Garg, J., Josse, R., Kaufman, K. D., Koglin, J., Korn, S., Lachin, J. M., McGuire, D. K., Pencina, M. J., Standl, E., Stein, P. P., Suryawanshi, S., Van de Werf, F., Peterson, E. D., Holman, R. R. 2015. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 232–242. doi:10.1056/nejmoa1501352
- Halcox, J. P. J., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M. A., Nour, K. R. A., Quyyumi, A. A. 2002. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*, 106(6), 653–658. doi:10.1161/01.CIR.0000025404.78001.D8
- Hattori, S. 2018. Anti-inflammatory effects of empagliflozin in patients with type 2 diabetes and insulin resistance UMIN000021552 UMIN 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences 11 Medical and Health Sciences 1102 Cardiorespiratory Medicine and Haematology. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 10(1), 1–7. doi:10.1186/s13098-018-0395-5
- Home, P. D., Pocock, S. J., Beck-Nielsen, H., Curtis, P. S., Gomis, R., Hanefeld, M., Jones, N. P., Komajda, M., McMurray, J. J. 2009. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *The Lancet*, 373(9681), 2125–2135. doi:10.1016/S0140-6736(09)60953-3
- Hsia, D. S., Grove, O., Cefalu, W. T. 2017. An update on sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, Vol. 24. doi:10.1097/MED.0000000000000311
- Iannantuoni, F., Canet, F., Lopez-Domenech, S., Vezza, T., Morillas, C., Rocha FISABIO-Hospital Peset Victor Victor, M. M. 2020. Empagliflozin Ameliorates Leukocyte-Endothelium Cell Interactions and Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. doi:10.21203/rs.3.rs-40816/v1
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2019. Defunciones Registradas 2019. Consultado el 17 de noviembre de 2020, de <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- International Diabetes Federation (IDF). 2017. Eighth edition 2017. En *IDF Diabetes Atlas*, 8th edition.

doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).

- Ji, X. X., Ji, X. J., Li, Q. Q., Lu, X. X., Luo, L. 2018. Rosiglitazone reduces apoptosis and inflammation in lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells. *Medical Science Monitor*, 24, 6200–6207. doi:10.12659/MSM.910036
- Jia, G., Aroor, A. R., Martinez-Lemus, L. A., Sowers, J. R. 2014. Overnutrition, mTOR signaling, and cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(10), R1198–R1206. doi:10.1152/ajpregu.00262.2014
- Jigheh, Z. A., Haghjo, A. G., Argani, H., Roshangar, L., Rashtchizadeh, N., Sanajou, D., Ahmad, S. N. S., Rashedi, J., Dastmalchi, S., Abbasi, M. M. 2019. Empagliflozin alleviates renal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats partly by repressing HMGB1-TLR4 receptor axis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(4), 384–390. doi:10.22038/ijbms.2019.31788.7651
- Juni, R. P., Kuster, D. W. D., Goebel, M., Helmes, M., Musters, R. J. P., van der Velden, J., Koolwijk, P., Paulus, W. J., van Hinsbergh, V. W. M. 2019. Cardiac Microvascular Endothelial Enhancement of Cardiomyocyte Function Is Impaired by Inflammation and Restored by Empagliflozin. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(5), 575–591. doi:10.1016/j.jacbts.2019.04.003
- Kabel, A. M., Estfanous, R. S., Alrobaian, M. M. 2020. Targeting oxidative stress, proinflammatory cytokines, apoptosis and toll like receptor 4 by empagliflozin to ameliorate bleomycin-induced lung fibrosis. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 273, 103316. doi:10.1016/j.resp.2019.103316
- Kahn, C. R. 1994. Banting lecture: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. En *Diabetes*, el 1 de agosto de 1994, American Diabetes Association Inc., 43(8), pp. 1066–1084. doi:10.2337/diab.43.8.1066
- Kajikawa, M., Maruhashi, T., Hidaka, T., Matsui, S., Yusoff, F. M., Kishimoto, S., Chayama, K., Goto, C., Tomiyama, H., Yagi, S., Amano, R., Yamada, H., Sata, M. 2019. Effect of Saxagliptin on Endothelial Function in Patients with Type 2 Diabetes : A Prospective Multicenter Study. (July), 1–7. doi:10.1038/s41598-019-46726-3
- Keller, A. C., Knaub, L. A., Miller, M. W., Birdsey, N., Klemm, D. J., Reusch, J. E. B. 2015. Saxagliptin restores vascular mitochondrial exercise response in the goto-kakizaki rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(2), 137–147. doi:10.1097/FJC.000000000000170
- Khurana, M., Traum, A. Z., Aivado, M., Wells, M. P., Guerrero, M., Grall, F., Libermann, T. A., Schachter, A. D. 2006. Urine proteomic profiling of pediatric nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*, 21(9), 1257–1265. doi:10.1007/s00467-006-0165-8
- Kim, H. J., Cho, E. H., Yoo, J. H., Kim, P. K., Shin, J. S., Kim, M. R., Kim, C. W. 2007. Proteome analysis of serum from type 2 diabetics with nephropathy. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 735–743. doi:10.1021/pr060489g
- Kinaan, M., Ding, H., Triggie, C. R. 2015, julio 25. Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. *Medical Principles and Practice*, Vol. 24. doi:10.1159/000381643
- Knight, B., Yuan, J., Koegler, S., Pande, P., Hall, J., Hill, J. D., Hart, S. E., Phillips, J. A., Ku, W. W. 2018.

- Pathogenesis of Renal Injury and Gene Expression Changes in the Male CD-1 Mouse Associated with Exposure to Empagliflozin. *Toxicologic Pathology*, 46(6), 671–682. doi:10.1177/0192623318784514
- Koyani, C. N., Plastira, I., Sourij, H., Hallström, S., Schmidt, A., Rainer, P. P., Bugger, H., Frank, S., Malle, E., von Lewinski, D. 2020. Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation. *Pharmacological Research*, 158, 104870. doi:10.1016/j.phrs.2020.104870
- Ku, Y. H., Cho, B. J., Kim, M. J., Lim, S., Park, Y. J., Jang, H. C., Choi, S. H. 2017. Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 18(1), 62. doi:10.1186/s40360-017-0169-y
- Kumar, A., Kim, C. S., Hoffman, T. A., Naqvi, A., Dericco, J., Jung, S. B., Lin, Z., Jain, M. K., Irani, K. 2011. P53 Impairs endothelial function by transcriptionally repressing kruppel-Like factor 2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(1), 133–141. doi:10.1161/ATVBAHA.110.215061
- Lakota, K., Hrušovar, D., Ogrič, M., Mrak-Poljšak, K., Čučnik, S., Tomšič, M., Božič, B., Žigon, P., Sodin-Semrl, S. 2018. Analysis of drug effects on primary human coronary artery endothelial cells activated by serum amyloid a. *Mediators of Inflammation*, 2018. doi:10.1155/2018/8237209
- Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J. F., Bénit, P., Rustin, P., Franc, S., Charpentier, G., Furling, D., Bassez, G., Nissan, X., Martinat, C., ... Baghdoyan, S. 2015. In vitro and in vivo modulation of alternative splicing by the biguanide metformin. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4(11), e262. doi:10.1038/mtna.2015.35
- Lee, W.-C., Chau, Y.-Y., Ng, H.-Y., Chen, C.-H., Wang, P.-W., Liou, C.-W., Lin, T.-K., Chen, J.-B. 2019. Empagliflozin Protects HK-2 Cells from High Glucose-Mediated Injuries via a Mitochondrial Mechanism. *Cells*, 8(9), 1085. doi:10.3390/cells8091085
- López Stewart, G. 2009. Diabetes Mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico. *Medwave*, 9(12). doi:10.5867/medwave.2009.12.4315
- Lu, Q., Liu, J., Li, X., Sun, X., Zhang, J., Ren, D., Tong, N., Li, J. 2020. Empagliflozin attenuates ischemia and reperfusion injury through LKB1/AMPK signaling pathway: Empagliflozin and Cardiac Ischemic Insult. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 501, 110642. doi:10.1016/j.mce.2019.110642
- Luo, M., Guan, X., Luczak, E. D., Lang, D., Kutschke, W., Gao, Z., Yang, J., Glynn, P., Sossalla, S., Swaminathan, P. D., Weiss, R. M., Yang, B., Rokita, A. G., Maier, L. S., Efimov, I. R., Hund, T. J., Anderson, M. E. 2013. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1262–1274. doi:10.1172/JCI65268
- Ma, S., Bai, Z., Wu, H., Wang, W. 2019. The DPP-4 inhibitor saxagliptin ameliorates ox-LDL-induced endothelial dysfunction by regulating AP-1 and NF- κ B. *European Journal of Pharmacology*, 851, 186–193. doi:10.1016/j.ejphar.2019.01.008
- Malinowski, J. M., Bolesta, S. 2000. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A critical review. *Clinical Therapeutics*, 22(10), 1151–1168. doi:10.1016/S0149-2918(00)83060-X
- Matsumoto, E., Akiyama, K., Saito, T., Matsumoto, Y., Kobayashi, K. I., Inoue, J., Yamamoto, Y., Suzuki, T.

2020. AMP-activated protein kinase regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1. *Biochemical Journal*, 477(12), 2237–2248. doi:10.1042/BCJ20190894
- Mcintosh, M., Fitzgibbon, M. 2009. Biomarker validation by targeted mass spectrometry. 27(7), 622–623.
- Medina-Gómez, O. S., Medina-Reyes, I. S. 2018. Mortalidad por diabetes tipo 2 y la implementación del programa PREVENIMSS: un estudio de series de tiempo en México, 1998-2015. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(5), e00103117. doi:10.1590/0102-311x00103117
- Meza, R., Barrientos-Gutierrez, T., Rojas-Martinez, R., Reynoso-Noverón, N., Palacio-Mejia, L. S., Lazcano-Ponce, E., Hernández-Ávila, M. 2015. Burden of type 2 diabetes in Mexico: Past, current and future prevalence and incidence rates. *Preventive Medicine*, 81, 445–450. doi:10.1016/j.ypmed.2015.10.015
- Millioni, R., Puricelli, L., Iori, E., Arrigoni, G., Tessari, P. 2010. The effects of rosiglitazone and high glucose on protein expression in endothelial cells. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 578–584. doi:10.1021/pr900435z
- Molgat, A. S. D., Tilokee, E. L., Rafatian, G., Vulesevic, B., Ruel, M., Milne, R., Suuronen, E. J., Davis, D. R. 2014. Hyperglycemia inhibits cardiac stem cell-mediated cardiac repair and angiogenic capacity. *Circulation*, 130(11), S70–S76. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007908
- Njerve, I. U., Åkra, S., Weiss, T. W., Solheim, S., Øvstebø, R., Aass, H. C. D., Byrkjeland, R., Arnesen, H., Seljeflot, I. 2017. A Double-Blinded Randomized Study Investigating a Possible Anti-Inflammatory Effect of Saxagliptin versus Placebo as Add-On Therapy in Patients with Both Type 2 Diabetes and Stable Coronary Artery Disease. *Mediators of Inflammation*, 2017. doi:10.1155/2017/5380638
- Paneni, F., Beckman, J. A., Creager, M. A., Cosentino, F. 2013, agosto 14. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part i. *European Heart Journal*, Vol. 34. doi:10.1093/eurheartj/eh149
- Paneni, F., Lüscher, T. F. 2017. Cardiovascular Protection in the Treatment of Type 2 Diabetes : A Review of Clinical Trial Results Across Drug Classes. *The American Journal of Cardiology*, 120(1), S17–S27. doi:10.1016/j.amjcard.2017.05.015
- Pankevich, E. V., Astakhova, A. A., Chistyakov, D. V., Sergeeva, M. G. 2017. Antiinflammatory effect of rosiglitazone via modulation of mRNA stability of interleukin 10 and cyclooxygenase 2 in astrocytes. *Biochemistry (Moscow)*, 82(11), 1276–1284. doi:10.1134/S0006297917110050
- Ramasamy, R., Goldberg, I. J. 2010, mayo 14. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circulation Research*, Vol. 106. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213447
- Rawshani, A., Rawshani, A., Franzén, S., Eliasson, B., Svensson, A.-M., Miftaraj, M., McGuire, D. K., Sattar, N., Rosengren, A., Gudbjörnsdóttir, S. 2017. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 376(15), 1407–1418. doi:10.1056/nejmoa1608664
- Rawshani, A., Rawshani, A., Franzén, S., Sattar, N., Eliasson, B., Svensson, A. M., Zethelius, B., Miftaraj, M., McGuire, D. K., Rosengren, A., Gudbjörnsdóttir, S. 2018. Risk factors, mortality, and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*.

doi:10.1056/NEJMoa1800256

- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C. A., Zárate-Rojas, E., Villalpando, S., Barrientos-Gutiérrez, T. 2018. Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 60(3), 224–232. doi:10.21149/8566
- Sajic, T., Liu, Y., Aebersold, R. 2015, abril 1. Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: Perspectives and clinical applications. *Proteomics - Clinical Applications*, Vol. 9. doi:10.1002/prca.201400117
- Salybekov, A. A., Salybekova, A. K., Pola, R., Asahara, T. 2018. Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Endothelial Progenitor Cell Biology for Vascular Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3040. doi:10.3390/ijms19103040
- Sambol, N. C., Chiang, J., O’Conner, M., Liu, C. Y., Lin, E. T., Goodman, A. M., Benet, L. Z., Karam, J. H. 1996. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Metformin in Healthy Subjects and Patients with Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 36(11), 1012–1021. doi:10.1177/009127009603601105
- Scheen, A. J. 2014. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of empagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics*, 53(3), 213–225. doi:10.1007/s40262-013-0126-x
- Schuiveling, M., Vazirpanah, N., Radstake, T. R. D. J., Zimmermann, M., Broen, J. C. A. 2017. Metformin, A New Era for an Old Drug in the Treatment of Immune Mediated Disease? *Current Drug Targets*, 19(8), 945–959. doi:10.2174/1389450118666170613081730
- Scirica, B. M., Bhatt, D. L., Braunwald, E., Steg, P. G., Davidson, J., Hirshberg, B., Ohman, P., Frederich, R., Wiviott, S. D., Hoffman, E. B., Cavender, M. A., Udell, J. A., Desai, N. R., Mosenson, O., McGuire, D. K., Ray, K. K., Leiter, L. A., Raz, I. 2013. Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 369(14), 1317–1326. doi:10.1056/NEJMoa1307684
- Sena, C. M., Pereira, A. M., Seica, R. 2013, diciembre 1. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Vol. 1832. doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.006
- Shah, A. D., Langenberg, C., Rapsomaniki, E., Denaxas, S., Pujades-Rodriguez, M., Gale, C. P., Deanfield, J., Smeeth, L., Timmis, A., Hemingway, H. 2015. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: A cohort study in 1.9 million people. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 3(2), 105–113. doi:10.1016/S2213-8587(14)70219-0
- Shah, M. S., Brownlee, M. 2016, mayo 27. Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes. *Circulation Research*, Vol. 118. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306923
- Sherifali, D., Nerenberg, K., Pullenayegum, E., Cheng, J. E., Gerstein, H. C. 2010. The effect of oral antidiabetic agents on A1C levels: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(8), 1859–1864. doi:10.2337/dc09-1727
- Singh, S., Loke, Y. K., Furberg, C. D. 2007, septiembre 12. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: A meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, Vol. 298. doi:10.1001/jama.298.10.1189

- Skeie, J. M., Aldrich, B. T., Goldstein, A. S., Schmidt, G. A., Reed, C. R., Greiner, M. A. 2018. Proteomic analysis of corneal endothelial cell-descemet membrane tissues reveals influence of insulin dependence and disease severity in type 2 diabetes mellitus. *PLOS ONE*, 13(3), e0192287. doi:10.1371/journal.pone.0192287
- Song, J., Knepper, M. A., Hu, X., Verbalis, J. G., Ecelbarger, C. A. 2004. Rosiglitazone Activates Renal Sodium- and Water-Reabsorptive Pathways and Lowers Blood Pressure in Normal Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(2), 426–433. doi:10.1124/jpet.103.058008
- Soto-Estrada, G., Moreno Altamirano, L., García-García, J. J., Ochoa Moreno, I., Silberman, M. 2018. Trends in frequency of type 2 diabetes in Mexico and its relationship to dietary patterns and contextual factors. *Gaceta Sanitaria*, 32(3), 283–290. doi:10.1016/j.gaceta.2017.08.001
- Su, H., Boulton, D. W., Barros, A., Wang, L., Cao, K., Bonacorsi, S. J., Iyer, R. A., Humphreys, W. G., Christopher, L. J. 2012. Characterization of the in vitro and in vivo metabolism and disposition and cytochrome P450 inhibition/induction profile of saxagliptin in human. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(7), 1345–1356. doi:10.1124/dmd.112.045450
- Suhara, T., Baba, Y., Shimada, B. K., Higa, J. K., Matsui, T. 2017. The mTOR Signaling Pathway in Myocardial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*, 17(6). doi:10.1007/s11892-017-0865-4
- Sun, X., Ritzenthaler, J. D., Zheng, Y., Roman, J., Han, S. W. 2009. Rosiglitazone inhibits $\alpha 4$ nicotinic acetylcholine receptor expression in human lung carcinoma cells through peroxisome proliferator-activated receptor γ -independent signals. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(1), 110–118. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0719
- Sundsten, T., Orsäter, H. 2009. Proteomics in diabetes research. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 297(1–2), 93–103. doi:10.1016/j.mce.2008.06.018
- Sutton, C. W. 2012. The role of targeted chemical proteomics in pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 166(2), 457–475. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01778.x
- Tancredi, M., Rosengren, A., Svensson, A.-M., Kosiborod, M., Pivodic, A., Gudbjörnsdóttir, S., Wedel, H., Clements, M., Dahlqvist, S., Lind, M. 2015. Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 373(18), 1720–1732. doi:10.1056/nejmoa1504347
- Tatti, P., Arrighi, F., Longobardi, A., Costanza, F., Di Blasi, P., Merante, D. 2008. Retrospective analysis of rosiglitazone and macular oedema in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Drug Investigation*, 28(5), 327–332. doi:10.2165/00044011-200828050-00006
- The Emerging Risk Factors Collaboration. 2011. Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *New England Journal of Medicine*, 364(9), 829–841. doi:10.1056/nejmoa1008862
- Thornalley, P. J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-Jadidi, R., Dawnay, A. 2003. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochemical Journal*, 375(3), 581–592. doi:10.1042/BJ20030763
- Tian, R., Li, R., Liu, Y., Liu, J., Pan, T., Zhang, R., Liu, B., Chen, E., Tang, Y., Qu, H. 2019. Metformin ameliorates endotoxemia-induced endothelial pro-inflammatory responses via AMPK-dependent mediation of HDAC5 and KLF2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(6),

1701–1712. doi:10.1016/j.bbadis.2019.04.009

- Triggle, C. R., Ding, H. 2017. Metformin is not just an antihyperglycaemic drug but also has protective effects on the vascular endothelium. *Acta Physiologica*, 219(1), 138–151. doi:10.1111/apha.12644
- Turner, R. 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 352(9131), 854–865. doi:10.1016/S0140-6736(98)07037-8
- Tyers, M., Mann, M. 2003. From genomics to proteomics. 422(March), 193–197.
- Tzoulaki, I., Molokhia, M., Curcin, V., Little, M. P., Millett, C. J., Ng, A., Hughes, R. I., Khunti, K., Wilkins, M. R., Majeed, A., Elliott, P. 2009. Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: Retrospective cohort study using UK general practice research database. *BMJ (Online)*, 339(7736), 35. doi:10.1136/bmj.b4731
- Uthman, L., Homayr, A., Juni, R. P., Spin, E. L., Kerindongo, R., Boomsma, M., Hollmann, M. W., Preckel, B., Koolwijk, P., Van Hinsbergh, V. W. M., Zuurbier, C. J., Albrecht, M., Weber, N. C. 2019. Cellular Physiology and Biochemistry Cellular Physiology and Biochemistry Empagliflozin and Dapagliflozin Reduce ROS Generation and Restore NO Bioavailability in Tumor Necrosis Factor α -Stimulated Human Coronary Arterial Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*, 53, 865–886. doi:10.33594/000000178
- Välikangas, T., Suomi, T., Elo, L. L. 2017. A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteome quantification and imputation. *Briefings in Bioinformatics*, 19(6), 1344–1355. doi:10.1093/bib/bbx054
- Vowinckel, J., Zelez, A., Bruderer, R., Mülleder, M., Reiter, L., Ralser, M. 2018. Cost-effective generation of precise label-free quantitative proteomes in high-throughput by microLC and data-independent acquisition. (February), 1–10. doi:10.1038/s41598-018-22610-4
- Vyas, A. K., Aerni-Flessner, L. B., Payne, M. A., Kovacs, A., Jay, P. Y., Hruz, P. W. 2013. Saxagliptin improves glucose tolerance but not survival in a murine model of dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Endocrinology*, 2(1), 74–82. doi:10.1097/XCE.0b013e32835bfb24
- Wagstaff, A. J., Goa, K. L. 2002, septiembre 16. Rosiglitazone: A review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, Vol. 62. doi:10.2165/00003495-200262120-00007
- Wang, M., Chen, M., Ding, Y., Zhu, Z., Zhang, Y., Wei, P., Wang, J., Qiao, Y., Li, L., Li, Y., Wen, A. 2015. Pretreatment with β -Boswellic Acid Improves Blood Stasis Induced Endothelial Dysfunction: Role of eNOS Activation. *Scientific Reports*, 5(1), 1–11. doi:10.1038/srep15357
- Wang, Z., Gao, J., Ohno, Y., Liu, H., Xu, C. 2020. Rosiglitazone ameliorates senescence and promotes apoptosis in ovarian cancer induced by olaparib. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 85(2), 273–284. doi:10.1007/s00280-019-04025-8
- Whaley-Connell, A. T., Habibi, J., Nistala, R., DeMarco, V. G., Pulakat, L., Hayden, M. R., Joginpally, T., Ferrario, C. M., Parrish, A. R., Sowers, J. R. 2012. Mineralocorticoid Receptor-Dependent Proximal Tubule Injury Is Mediated by a Redox-Sensitive mTOR/S6K1 Pathway. *American Journal of Nephrology*, 35(1), 90–100. doi:10.1159/000335079

- Wheeler, S., Moore, K., Forsberg, C. W., Riley, K., Floyd, J. S., Smith, N. L., Boyko, E. J. 2013. Mortality among veterans with type 2 diabetes initiating metformin, sulfonylurea or rosiglitazone monotherapy. *Diabetologia*, 56(9), 1934–1943. doi:10.1007/s00125-013-2958-1
- White, W. B., Cannon, C. P., Heller, S. R., Nissen, S. E., Bergenstal, R. M., Bakris, G. L., Perez, A. T., Fleck, P. R., Mehta, C. R., Kupfer, S., Wilson, C., Cushman, W. C., Zannad, F., Aiub, J., Albusu, J., Alvarez, C., Astesiano, A., Barcudi, R., ... Knapp, B. 2014, octubre 2. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 7. doi:10.1056/nejmoa1305889
- Widmer, R. J., Lerman, A. 2014. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Global Cardiology Science and Practice*, 2014(3). doi:10.5339/gcsp.2014.43
- Xu, J., Pan, M., Wang, X., Xu, L., Li, L., Xu, C. 2017. Fluid Retention Caused by Rosiglitazone Is Related to Increases in AQP2 and α ENaC Membrane Expression. *PPAR Research*, 2017. doi:10.1155/2017/8130968
- Xu, L., Zhao, G., Zhu, H., Wang, S., Sun, A., Zou, Y., Ge, J. 2019. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ antagonizes LOX-1-mediated endothelial injury by transcriptional activation of miR-590-5p. *PPAR Research*, 2019. doi:10.1155/2019/2715176
- Yang, F., Qin, Y., Wang, Y., Meng, S., Xian, H., Che, H., Lv, J., Li, Y., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L. 2019. Metformin inhibits the NLRP3 inflammasome via AMPK/mTOR-dependent effects in diabetic cardiomyopathy. *International Journal of Biological Sciences*, 15(5), 1010–1019. doi:10.7150/IJBS.29680
- Yang, Y., Lu, Y., Han, F., Chang, Y., Li, X., Han, Z., Xue, M., Cheng, Y., Sun, B., Chen, L. 2018. Saxagliptin regulates M1/M2 macrophage polarization via CaMKK β /AMPK pathway to attenuate NAFLD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(3), 1618–1624. doi:10.1016/j.bbrc.2018.07.090
- Yao, D., Brownlee, M. 2010. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*, 59(1), 249–255. doi:10.2337/db09-0801
- Ye, J., Zhu, N., Sun, R., Liao, W., Fan, S., Shi, F., Lin, H., Jiang, S., Ying, Y. 2018. Metformin Inhibits Chemokine Expression Through the AMPK/NF- κ B Signaling Pathway. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 38(9), 363–369. doi:10.1089/jir.2018.0061
- Ye, Y., Bajaj, M., Yang, H. C., Perez-Polo, J. R., Birnbaum, Y. 2017. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(2), 119–132. doi:10.1007/s10557-017-6725-2
- Yi, Q. Y., Deng, G., Chen, N., Bai, Z. S., Yuan, J. S., Wu, G. H., Wang, Y. W., Wu, S. J. 2016. Metformin inhibits development of diabetic retinopathy through inducing alternative splicing of VEGF-A. *American Journal of Translational Research*, 8(9), 3947–3954. de www.ajtr.org/ISSN:1943-8141/AJTR0033278
- Yin, X., Liu, X., Zhang, Y., Yan, G., Wang, F., Lu, H., Shen, H., Yang, P. 2014. Rapid and sensitive profiling

and quantification of the human cell line proteome by LC-MS/MS without prefractionation. *PROTEOMICS*, 14(17–18), 2008–2016. doi:10.1002/pmic.201300510

Zhao, Y., Sun, H., Feng, M., Zhao, J., Zhao, X., Wan, Q., Cai, D. 2018. Metformin is associated with reduced cell proliferation in human endometrial cancer by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling. *Gynecological Endocrinology*, 34(5), 428–432. doi:10.1080/09513590.2017.1409714

Zhou, H., Wang, S., Zhu, P., Hu, S., Chen, Y., Ren, J. 2018. Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. *Redox Biology*, 15, 335–346. doi:10.1016/j.redox.2017.12.019

Anexos

Tabla 9. Metabolismo y farmacocinética de los fármacos antidiabéticos (ADD).

Fármaco	C _{max} Clínica (mM)	Dosis (mg)	Vida media	Metabolismo	Excreción renal/metabolismo hepático	Tipo de metabolito	Referencias
Empagliflozina	<ul style="list-style-type: none"> •226 •722* •1070* •37 •2980 •309 •2630 •2390 	<ul style="list-style-type: none"> •10 •25* •25* •1 •100 •10 •100 •100(después de 4 semanas de tratamiento) 	10.3hrs – 18.8 hrs después de su administración.	Glucuronidación por la uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasas UGT2B7, UGT1A3, UGT1A8, y UGT1A9	<ul style="list-style-type: none"> •Aclaramiento renal en sujetos sanos a las 72h 11.0% a 18.7% •En sujetos con DMT2 18% del fármaco administrado se excretó sin cambios en la orina 	Sin metabolito activo	(Scheen, 2014)
Saxagliptina	<ul style="list-style-type: none"> •161.95 •161.95 •77.077* •71.978* <p>Saxagliptina (a las 0.5hrs)</p> <ul style="list-style-type: none"> •836.755 <p>hidroxisaxagliptina (a las 1.5hrs)</p> <ul style="list-style-type: none"> •1817.4 	<ul style="list-style-type: none"> •2 tabletas de 10mg •10 •5* •5* •50 	<ul style="list-style-type: none"> •Saxagliptina 2.2-3.8 hrs •5-hidroxisaxagliptina 3-7.4 hrs 	Metabolismo mediado principalmente por las isoenzimas CYP3A4/5 del citocromo P450.	<ul style="list-style-type: none"> •50% de la dosis absorbida de saxagliptina es eliminada por los riñones como medicamento inalterado en la orina. •12-29% es eliminada por los riñones como •21-52% es eliminado como 5- hidroxigliptina saxagliptina 	5-hidroxi saxagliptina (dos veces menos potente vs saxagliptina)	(Deacon y Holst, 2009; Golightly et al., 2012)

Rosiglitazona	<ul style="list-style-type: none"> •1880.098 •1810.1 •212.6302 •1673.0642 •212.6302 •436.45 	<ul style="list-style-type: none"> •8 •8 •8 •1 •2 •8 	3-4 hrs	Se metaboliza mediante la isoforma CYP2C8 del citocromo P450. Sufre reacciones de N-desmetilación o hidroxilación, seguidas de conjugación con sulfato o gluconidación.	<ul style="list-style-type: none"> •Excreción principalmente en la orina (-64%) y por heces (23%) • Ningún medicamento inalterado se excreta a través de los riñones •Dos conjugados de sulfato parahidroxi-sulfato representaron aproximadamente el 35% de la dosis excretada. 	Metabolito mayoritario p-hidroxi-sulfato (AUC 22 veces mayor vs. rosiglitazona). Rosiglitazona parece ser el compuesto activo principal.	(Malinowski y Bolesta, 2000; Su et al., 2012; Wagstaff y Goa, 2002)
Metformina	<ul style="list-style-type: none"> •19355.2383 •13780.929 •10227.3 	<ul style="list-style-type: none"> •1000 •2000 (XR) •1000(IR) 	20hrs		Excreción renal 100%	No metabolitos reportados	(Sambol et al., 1996)

Tabla 10. Gradiente de elución cromatográfica.

Tiempo (min):	% A	% B
0:00	95	5
5:00	95	5
15:00	60	40
130:00:00	50	50
140:00:00	0	100
150:00:00	0	100

Tabla 11. Parámetros para la adquisición dependiente de datos (DDA).

Parámetro	Valor
Desde el estado de carga:	2
Para cargar el estado:	5
Con intensidad superior a:	120
Cambiar después:	20 espectros
Usar configuraciones avanzadas:	Verdadero
Excluir siempre:	Verdadero
Excluir por:	20 seg
Unidades de tolerancia de Masa:	mDa
Tolerancia de Masa	50
Utilizar lista de Inclusión:	Falso
Utilizar lista de Exclusión:	Falso
Ignorar picos dentro del valor:	6 Da
Tiempo real:	Ninguno
Archivo de espectro:	aaa
Sustracción dinámica de fondo:	Verdadero
Energía de colisión dinámica:	Verdadero
Multiplicador de intensidad de fragmentos:	2
Acumulación máxima:	2 seg
Permitir filtros estándar para <i>Smart DIA</i> :	Verdadero
Nunca excluir los iones objetivo-pasados:	Verdadero
Excluir después de evento:	2

Tabla 12. Parámetros para la adquisición Independiente de datos (DIA) tipo SWATH-MS.

Adquisición MS¹		Adquisición MS²	
Tipo de experimento:	TOF MS (CE=5)	Tipo de experimento:	TOF MS² (CE=16.186)
Número de ciclos:	2356	Número de ciclos:	2356
Polaridad:	Positive	Polaridad:	Positive
Periodo de tiempos del ciclo:	3701 ms	Producto:	349.50 to 355.60
Frecuencia del pulsador:	13.569 kHz	Periodo de tiempos del ciclo:	3701 ms
Tiempo de acumulación:	150.0 ms	Frecuencia del pulsador:	13.569 kHz
		Tiempo de acumulación:	35.0 ms
Parámetros experimentales		Parámetros experimentales	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
CUR	35	CUR	35
GS1	35	GS1	35
GS2	45	GS2	45
ISVF	5500	ISVF	5500
Swath	N/A	Swath	352.55
TEM	450	TEM	450

Parámetros de Rango de Masa		Parámetros de Rango de Masa	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
CE	5	CE	16.186
DP	60	CES	5
IDIx	0	DP	100
IDUx	5	IDIx	0
IRDx	15000	IDUx	5
IRWx	10000	IRD	66.633
IWIx	0	IRDx	15000
IWUx	5	IRW	24.917
XA1	149.94	IRWx	10000
		IWIx	0
		IWUx	5
		XA1	126.119
Masa Inicial:	300	Masa Inicial:	100
Masa Final:	1200	Masa Final:	1200
Transmisión RF		Transmisión RF	
Masa	Tiempo (%)	Masa	Tiempo (%)
280	100	80	50.1
		200	49.9

Tabla 13. Ventanas de adquisición para la cuantificación SWATH-MS.

<i>SWATH Exp Index:</i>	Masa Inicial (Da)	Masa de Paro (Da)	CES
SWATH Exp 1:	349.5	355.6	5
SWATH Exp 2:	354.6	361.1	5
SWATH Exp 3:	360.1	366.7	5
SWATH Exp 4:	365.7	372.6	5
SWATH Exp 5:	371.6	378.6	5
SWATH Exp 6:	377.6	384.1	5
SWATH Exp 7:	383.1	389.6	5
SWATH Exp 8:	388.6	395.1	5
SWATH Exp 9:	394.1	400.7	5
SWATH Exp 10:	399.7	405.8	5
SWATH Exp 11:	404.8	410.9	5
SWATH Exp 12:	409.9	416	5
SWATH Exp 13:	415	421.1	5
SWATH Exp 14:	420.1	425.7	5
SWATH Exp 15:	424.7	430.4	5
SWATH Exp 16:	429.4	435.1	5
SWATH Exp 17:	434.1	440.2	5
SWATH Exp 18:	439.2	444.4	5
SWATH Exp 19:	443.4	449.1	5
SWATH Exp 20:	448.1	453.8	5

SWATH Exp 21:	452.8	458	5
SWATH Exp 22:	457	462.7	5
SWATH Exp 23:	461.7	467	5
SWATH Exp 24:	466	471.2	5
SWATH Exp 25:	470.2	475.9	5
SWATH Exp 26:	474.9	480.1	5
SWATH Exp 27:	479.1	484.4	5
SWATH Exp 28:	483.4	488.6	5
SWATH Exp 29:	487.6	492.9	5
SWATH Exp 30:	491.9	497.6	5
SWATH Exp 31:	496.6	501.8	5
SWATH Exp 32:	500.8	506.1	5
SWATH Exp 33:	505.1	510.3	5
SWATH Exp 34:	509.3	515	5
SWATH Exp 35:	514	519.2	5
SWATH Exp 36:	518.2	523.2	5
SWATH Exp 37:	522.1	527.3	5
SWATH Exp 38:	526.3	531.6	5
SWATH Exp 39:	530.6	535.6	5
SWATH Exp 40:	534.4	539.6	5
SWATH Exp 41:	538.6	543.6	5
SWATH Exp 42:	542.5	547.7	5
SWATH Exp 43:	546.7	552	5
SWATH Exp 44:	551	556	5
SWATH Exp 45:	554.8	559.8	5
SWATH Exp 46:	558.6	563.6	5
SWATH Exp 47:	562.4	567.7	5
SWATH Exp 48:	566.7	571.7	5
SWATH Exp 49:	570.5	575.5	5
SWATH Exp 50:	574.3	579.3	5
SWATH Exp 51:	578.1	583.4	5
SWATH Exp 52:	582.4	587.4	5
SWATH Exp 53:	586.2	591.2	5
SWATH Exp 54:	590	595.3	5
SWATH Exp 55:	594.3	599.5	5
SWATH Exp 56:	598.5	604.2	5
SWATH Exp 57:	603.2	608.5	5
SWATH Exp 58:	607.5	613.1	5
SWATH Exp 59:	612.1	617.8	5
SWATH Exp 60:	616.8	622.5	5
SWATH Exp 61:	621.5	627.2	5
SWATH Exp 62:	626.2	631.8	5
SWATH Exp 63:	630.8	636.9	5
SWATH Exp 64:	635.9	641.6	5
SWATH Exp 65:	640.6	646.7	5
SWATH Exp 66:	645.7	651.8	5
SWATH Exp 67:	650.8	657.3	5
SWATH Exp 68:	656.3	662.4	5
SWATH Exp 69:	661.4	668	5
SWATH Exp 70:	667	673.5	5
SWATH Exp 71:	672.5	679.4	5

SWATH Exp 72:	678.4	685.4	5
SWATH Exp 73:	684.4	692.2	5
SWATH Exp 74:	691.2	699	5
SWATH Exp 75:	698	706.6	5
SWATH Exp 76:	705.6	714.3	5
SWATH Exp 77:	713.3	722.4	5
SWATH Exp 78:	721.4	730.9	5
SWATH Exp 79:	729.9	739.4	5
SWATH Exp 80:	738.4	748.3	5
SWATH Exp 81:	747.3	757.2	5
SWATH Exp 82:	756.2	766.6	5
SWATH Exp 83:	765.6	775.9	5
SWATH Exp 84:	774.9	785.3	5
SWATH Exp 85:	784.3	795	5
SWATH Exp 86:	794	805.2	5
SWATH Exp 87:	804.2	816.3	5
SWATH Exp 88:	815.3	827.3	5
SWATH Exp 89:	826.3	839.7	5
SWATH Exp 90:	838.7	852.4	5
SWATH Exp 91:	851.4	866	5
SWATH Exp 92:	865	880.5	5
SWATH Exp 93:	879.5	896.6	5
SWATH Exp 94:	895.6	914.9	5
SWATH Exp 95:	913.9	937.4	5
SWATH Exp 96:	936.4	965	5
SWATH Exp 97:	964	998.2	5
SWATH Exp 98:	997.2	1042	5
SWATH Exp 99:	1041	1097.6	5
SWATH Exp 100:	1096.6	1200	5

Tabla 14. Identificadores del proteoma de las Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC).

Proteoma de las HCAEC									
Q15942	P49207	Q13885	Q9BV81	Q96I99	Q12765	O14548	Q15436	P67870	O75051
Q92504	P62910	P07437	Q15006	Q9P2R7	Q9Y6Y8	P14406	Q8WUY1	O75718	Q15149
O95218	P62899	P68366	P33947	P53597	Q8WVM8	P14854	Q9C0D5	P23786	Q15102
O95159	P62888	P23381	O95208	Q14683	P16615	P10606	Q9Y2Z0	P50416	P68402
O75312	P39023	P67936	P07099	Q13586	P82979	P20674	O43819	P43155	P43034
Q722W4	P47914	Q9NYL9	Q9UBC2	Q9NRL3	P31153	P13073	P06703	P16152	P16284
Q72739	P46779	Q9Y3I0	P42566	Q13033	O43865	P00403	Q99584	Q14444	P13797
Q9Y5A9	P46776	Q08J23	P29317	P31948	Q8NBX0	Q14061	P31949	P56211	P05121
P12956	P61353	P29144	P30084	P38646	Q9Y230	P99999	P60903	P31323	P23634
P13010	P61254	O14773	O75521	Q9UJZ1	Q9Y265	O14949	Q9BY42	P13861	P20020
P12955	P83731	P60174	P42126	Q15738	Q96T51	P07919	Q13123	P10644	P53801
Q9GZV5	P62750	P22102	P84090	P16949	P22087	P22695	Q96PU8	P17612	O00625
Q969T9	P62829	P55084	O60869	Q7KZF4	P35637	P31930	Q96M27	P27797	Q6NYC8
Q9Y2W2	Q6P5R6	P40939	Q9NQ30	Q9NY15	Q01844	O43169	P29590	Q15417	Q9Y617

Q2TAY7	P35268	P53007	Q19T08	Q14247	Q9Y5S9	Q6UXH1	Q9Y570	Q99439	O15067
Q9BV38	P46778	Q92973	Q96AP7	Q9GZT3	P98179	P52943	P41236	P17655	Q15126
O75083	P84098	Q9P0T7	P14625	Q15020	Q96PK6	Q9NZV1	O15355	P07384	O15305
Q8IWB7	Q02543	Q9BTV4	Q969X5	Q8WW59	Q9NTZ6	P21291	P49593	P04632	P36969
Q641Q2	Q07020	P57088	Q9BS26	P23246	P29558	P01034	P35813	P0DP25	Q8IV08
O75348	P18621	Q6UW68	P30040	Q01081	P38159	P04080	Q15435	Q9HB71	Q9Y263
P36543	P61313	Q9HC07	Q92791	Q9Y3B4	Q9Y224	Q86VP6	O14974	Q9Y376	P18669
Q9Y5K8	P50914	Q9H061	P11021	Q9BWJ5	Q9NWB1	Q13620	P49757	Q6NUK1	P00558
P61421	P40429	Q9BVC6	Q9NZ08	Q15427	Q9P2E9	Q13618	Q8IWE2	P63098	Q96G03
P21283	P26373	Q9NUM4	Q9Y371	Q15393	Q9Y3A5	Q9UBG0	Q9ULP0	Q99653	O95394
P21281	P30050	Q9BVK6	Q99961	Q13435	P51812	Q86T13	Q92597	P33151	P48739
P38606	P62913	Q15363	P17813	O75533	P11908	Q9P2B4	Q9Y316	P55290	Q00169
P04275	P62906	P49755	P50402	Q12874	P13489	P17812	Q96A72	P27708	P30086
P54289	P27635	Q9HD45	Q15369	Q15459	P84095	Q13363	Q86UE4	O75844	Q13371
Q9Y277	P05387	P51571	Q9BW60	P21453	P08134	Q7Z7K0	Q9NUP9	P11586	Q9NSD9
P45880	P05386	P43307	P49411	P63208	P62745	Q9P1F3	Q9UNF0	O43670	Q9Y285
P21796	P05388	Q99442	P43897	P52788	O75116	Q9ULV4	Q86V58	Q96CX2	Q7RTV0
P04004	P10155	P13693	P13639	Q01082	Q92974	Q9BR76	Q13045	Q5VW32	Q8WW12
Q9BQB6	P10809	Q9NR50	P24534	P09486	Q8N392	O75367	Q52LJ0	O15382	O95571
P18206	P21589	Q9UI10	P68104	Q9Y5X1	Q68EM7	O00244	Q9NUQ9	P80723	P51659
Q00341	P49189	Q14232	Q8IUD2	Q9UNH7	Q07960	O75131	Q9H0Q0	Q10589	O75381
Q12907	P08195	P29401	P38117	O60493	P52566	Q99829	Q92520	Q9H3K6	O96011
O75396	Q9BRK5	P55072	P13804	O60749	P52565	Q99627	Q96A26	P53004	Q9NUI1
P46459	P08865	O43493	Q15717	Q9UMY4	Q6Z517	Q7L5N1	Q96C01	P21810	P30041
O95292	P46781	P37802	Q92616	Q13596	Q8TC12	Q92905	P49257	P07814	P30044
Q9P0L0	P62241	Q01995	Q9H223	Q9Y512	Q9HB40	Q9BT78	Q8N8S7	O95340	Q13162
O95183	P62081	P61586	Q9NZN4	P30626	P00352	P61201	Q9C005	P07686	P32119
Q9NZ01	P62753	O75410	Q9H4M9	Q00796	Q9NQC3	Q13098	Q96JJ7	P06865	Q06830
Q53GQ0	P46782	Q13595	Q12805	O94875	O95197	P78357	P07237	P49407	Q13610
P49748	P22090	P02786	Q96C19	Q8N357	Q96D15	P29279	Q14554	P25098	O60664
P50552	P62701	Q9Y4P3	Q9HC35	P11166	Q15293	Q07021	P13667	Q13425	Q9Y3E5
P35968	P61247	Q96QR8	Q15075	Q9UP95	P27694	Q96CG8	P30101	P61769	Q9Y3C6
P26640	P62861	Q00577	O94874	P55011	Q8IUW5	P08572	P35659	P02749	Q13526
Q8N1B4	P23396	Q13263	Q96EP0	P54709	Q92900	P39060	O00622	Q9BXX5	Q13451
O75351	P62273	P52657	Q9UNE7	P05023	P18754	P02462	Q9UKY7	Q9NYF8	Q02790
Q9UN37	P62857	Q04206	Q14258	P19634	Q9BRX8	Q14011	Q9Y2B0	P51572	Q00688
Q9H9H4	Q71UM5	P20290	P49792	Q13126	P63244	O75534	Q8WUW1	Q9UHQ4	P62942
Q96QK1	P42677	Q00059	Q14118	Q8NHG7	Q00765	Q9Y6H1	O14744	O95999	Q9NYL4
Q96AX1	P62854	O14776	P63172	P55854	P62070	Q16204	Q99873	Q7L1Q6	Q96AY3
Q9UBQ0	P62851	Q7KZ85	P63167	P14678	P10301	Q8IVM0	Q96IU4	P98160	Q08752
Q9UK41	P62266	P23193	O60313	P62318	P61225	Q96A33	P28062	P50895	P23284
Q4G0F5	P63220	Q9NPA8	P50570	P62316	P11233	Q96CT7	Q99436	O75531	P62937
O75436	P60866	P37837	O00429	P62314	Q92930	Q9Y281	P28072	O43491	O14908
P54727	P15880	Q92844	O00399	P62306	P61006	P23528	P28074	O95816	Q9NR12
P46939	P39019	Q12888	Q9UJW0	P62304	P51149	Q9Y678	P28070	O00571	Q96HC4

Q16851	P62269	Q5JTV8	O75935	O43765	P20340	O14579	P49721	O00148	P50479
P06132	P08708	Q9H0E2	Q13561	P84101	P51148	P48444	P20618	Q9NUU7	Q53GG5
P11172	P62249	Q6P9B6	Q14203	O00193	P61020	P35606	O14818	Q92499	O00151
Q96IX5	P62244	P48307	P51452	O75044	P20337	P53618	P60900	Q08211	P49023
Q9NWV4	P62841	Q9UDY2	P36507	Q04837	Q15286	P53621	P28066	P46063	P20962
Q9HB07	P62263	Q07157	Q02750	O75886	Q13637	P12259	P25789	O76031	P50897
Q9Y4I1	P62277	Q15654	Q9UJU6	P42229	P61019	Q14019	P25788	Q01813	Q9NP74
O94832	P25398	Q9Y2W1	Q16643	P40763	Q9ULC3	O96005	P25787	P17858	Q8WX93
O00159	P62280	P62328	P55265	P42224	Q9UL26	Q12996	P25786	P53396	P22059
Q6ZSR9	P46783	P63313	O95793	Q9UHB9	Q9UL25	P33240	Q5VYK3	Q8NE71	P36551
Q9P0P8	P25325	P23919	P46977	Q9Y5M8	Q9H0U4	Q16630	Q9UL46	P61221	Q86WC4
P30085	P42765	P07996	P61803	P08240	P62820	O43809	Q16186	Q9UII2	Q92882
Q9NYU2	Q6NVY1	P26639	P04844	P49458	Q9NP72	P09497	Q14914	Q9NV17	P04181
O60701	P31937	Q86V81	P04843	P61011	P61106	P09496	Q15185	O43681	Q96CV9
Q9NT62	Q99714	Q16762	P39656	P37108	Q15907	Q14677	Q9H7Z7	P18859	Q9NRP0
Q9BZL1	Q7Z7F7	Q9H3N1	Q99615	Q9BWM7	P61026	Q00610	P07602	P48047	Q9Y3B8
A0AVT1	Q6P161	O43396	Q9H3Z4	Q9H9B4	Q9HB90	Q9NX76	P48147	P36542	Q56VL3
Q9GZZ9	Q9H2W6	P30048	Q9UDY4	Q9NR45	P15153	O75390	O15460	O75964	Q9NX40
P22314	Q9BRJ2	Q9NNW7	Q9UBS4	P45954	P63000	Q0VF96	P13674	P56134	Q9NTK5
Q9Y3C8	Q9Y6G3	P10599	P25685	O75368	Q5U651	P45973	Q9UQ80	P56381	Q8WVJ2
P61960	Q8IXM3	Q8NBS9	O60884	Q9H299	P46940	Q13185	P12004	P56385	Q96RS6
Q9H832	Q9NYK5	Q9BRA2	P31689	P10768	Q9UN86	P83916	Q9HCU5	P30049	Q99733
Q15819	Q9P0M9	O95881	P19388	P02768	Q13283	Q9Y3Y2	Q99623	O75947	P15531
Q13404	Q9BYD1	P52888	P30876	P50454	P52306	P49585	P35232	P06576	P12270
Q712K3	P52815	P37173	P78527	P50453	P43487	Q8WWI5	O75340	P25705	P06748
P61088	O95861	Q99614	P27695	P50452	Q9H6Z4	Q9Y696	Q53EL6	P24539	Q01085
P61086	Q02218	O43657	O00273	P35237	P46060	O00299	Q9BUL8	Q6DD88	P31483
P62837	O43598	O60637	Q16531	P49591	Q9Y2Q5	Q96FZ7	Q8WUM4	Q8WWM7	P19338
P49459	Q9Y2Q9	Q9UGI8	Q13443	Q9Y3F4	Q6IAA8	Q9H444	P07737	Q15121	Q9Y2X3
Q14157	Q9Y676	Q9BQ61	O14672	P36873	P35241	Q9BY43	O00469	P14868	O00567
P62987	Q13442	P40227	P98082	P62140	Q9H2M9	Q9Y3E7	Q02809	P00505	Q8WTT2
P62979	P62195	P50990	Q9NY33	P62136	Q9H5N1	O43633	Q8NBJ5	P17174	P80303
Q96FW1	P35998	P49368	Q16555	Q96HS1	Q15276	Q9HD42	Q9NPF4	O43776	Q02818
Q92890	P43686	Q99832	P09417	Q9BRF8	Q9Y3P9	O43264	Q8TED1	P54136	P67809
P15374	P17980	P48643	P36957	P53041	P50395	P62633	O76071	Q15057	Q9Y2C4
P09936	P62191	P50991	P10515	Q6IN85	P31150	P43121	P26196	P52594	Q9H1E3
P45974	P62333	P78371	P09622	Q8TF05	Q53FA7	Q99459	P17844	Q9Y2X7	P61970
P54578	O00233	P17987	Q9NR28	P62714	P14618	P60953	Q92841	Q9ULZ3	Q9HCD5
Q9UMX0	P51665	Q9NVG8	Q7Z3D6	P30153	Q8NCN5	Q9NV96	Q96IZ0	Q07812	Q8TAT6
O95777	Q15008	Q92804	P60981	P63151	P11177	Q8N163	Q5JRX3	Q9BQE5	P37198
P62312	Q16401	O60784	Q9Y315	Q13177	P08559	O14735	Q9UHG3	P02649	Q8N1F7
Q9Y333	P55036	Q13148	O00115	Q8TD19	Q96C36	Q15642	O43143	P02656	Q99567
Q96DI7	O43242	Q9Y490	O43583	Q9Y5S2	P32322	P14209	Q8NAV1	Q92572	Q92621
O75643	Q13200	O00186	P54886	Q5VT25	O94903	P21926	Q6P2Q9	Q9Y2T2	Q12769
O43290	Q9UNM6	Q9UNK0	P30038	Q13242	A8MWX3	P08962	O94906	O14617	O75694

O43172	O00232	O15400	Q13011	Q16629	Q8NHP8	P13987	Q9UMS4	O00203	Q9Y266
O43818	O00231	Q12846	Q9BTZ2	Q13247	Q2VIR3	P16070	P02545	Q96CW1	Q12972
P09661	O75832	Q86Y82	P51397	P84103	P55786	Q5ZPR3	O15212	P63010	P49321
P09234	Q99460	O00161	Q96HY6	Q01130	P00491	Q13740	Q99471	O94973	P23497
P09012	Q6L8Q7	Q16563	P30046	Q05519	P61457	P48509	P61758	O95782	Q9UNZ2
P08621	Q16698	O15498	Q5TAQ9	Q07955	P06454	Q96F85	Q9UHV9	Q9BXS5	P61916
Q9Y2Z4	P09543	Q99536	Q96GG9	Q9UQ35	P00734	Q03135	O60925	O43747	P22307
P54577	P19174	Q9UH65	Q96EP5	Q92743	Q04941	Q969G5	Q96AQ6	P01008	Q15233
P78324	Q9NUQ2	O15260	Q8TEA8	O15269	P22061	O95810	O60831	P20073	P05204
Q05209	Q9C0C2	P04179	O43175	P83111	P21980	Q6NZI2	Q8TCS8	P08133	P05114
Q06124	P63104	P00441	Q69YQ0	Q13501	P25116	P11717	P26599	P08758	Q5JPE7
P18031	P27348	Q9UH99	Q96KP4	Q9UHD8	Q99497	P20645	Q10471	P12429	P29474
P07947	P61981	P63279	P28838	Q92599	O75695	Q9UBR2	P11940	P50995	P43490
Q61BS0	Q04917	Q9UBT2	Q07065	Q16181	Q08AM6	P07339	Q9UHX1	P04083	P40261
Q12792	P62258	Q9UBE0	P51813	Q15019	Q9H3U1	P07858	Q15366	Q9P0K7	Q92542
Q99816	P31946	O43704	Q7L576	Q9NVA2	Q93096	O60716	Q15365	Q02763	Q969V3
Q5GJ75	Q9NRX4	P0DMN0	O43237	P35270	Q9C0H2	P35222	Q9NX46	Q13685	Q96TA1
Q14166	Q15029	Q9BYNO	Q9Y6G9	P49903	P60468	P35221	Q9UKK3	Q6FI81	P55769
O75347	P61604	Q9Y6N5	Q13409	Q969E2	P61619	P21964	P09874	P05067	Q9UMS0
Q99426	Q04446	O00391	Q14204	O14828	O94979	P04040	P15151	P15144	Q6PIU2
Q9BUF5	Q9BV57	Q8NBK3	P53701	O15127	O94855	P49662	O00592	Q9H4A4	Q15758
Q13509	Q9P0J1	P55809	P08574	O15126	P53992	P42574	Q9Y4D7	Q13155	Q14697
Q12904	Q9Y639	O00170	Q9Y305	P32969	P22234	Q9UKD2	P43243	P07195	Q07866
P21397	O60462	O43488	P49753	P62917	P33527	O15427	Q9NZD8	Q93052	Q86UP2
P40222	O14786	Q9Y4W6	P07108	P62424	Q9H7C9	P53985	P49006	Q9BU23	Q07666
P37840	Q9BYT8	Q9UKK9	Q9BR61	P18124	P11137	P26038	C9JLW8	Q9UHB6	Q9HA64
P54920	Q92686	Q9NVJ2	Q9H845	Q02878	Q66K74	Q96T76	Q13724	Q14847	P08729
Q9NVD7	Q09666	Q15041	P13798	P46777	P46821	O43684	Q96IJ6	P09960	P35908
P17050	Q9HB63	Q8N6T3	Q12979	P36578	O14880	P28482	Q14165	Q9UIQ6	P04264
P06733	P48681	P84085	P53999	P63173	P10620	O75439	P40926	Q9P2J5	P35527
O43768	P61081	P18085	P61158	P83881	Q16891	Q10713	Q14764	Q96AG4	P08727
P61163	Q13564	P61204	Q9BPX5	Q9Y3U8	Q6UXV4	O95202	Q9H0U3	Q8N1G4	P05783
P49419	Q8TBC4	Q10588	O15511	P18077	Q9NX63	Q15070	Q8NDA8	Q32MZ4	P13645
O43707	Q9Y2A7	Q9BW91	P59998	P42766	Q9BV20	O94826	P40121	P42704	Q9H910
P12814	E9PAV3	P12236	O15145	P15586	P54105	O96008	P11279	Q86V48	Q9UK76
P30533	O43847	P05141	O15144	Q15599	Q02252	Q9NS69	Q14108	Q8NC56	Q9Y624
P02765	Q9GZZ1	Q15847	O15143	O14745	P56192	Q15388	P42785	Q9BS40	P14923
Q6NUM9	Q9BXJ9	Q9HDC9	Q92747	O95865	P50579	Q9Y5J7	P10619	Q14767	P26440
Q9BQI0	P41227	Q9HBW9	P61160	O94760	P53582	O60220	O00754	O43813	Q9NSE4
P15121	P22570	Q01518	O96019	P29966	O75431	O43615	P10253	P11047	P41252
P42330	P48163	P30566	P68032	Q9Y217	P02795	Q96DA6	Q96N66	P07942	P04899-4
P05091	Q9UHQ9	P00568	Q99798	P58546	P04732	Q9Y5L4	Q7L5N7	Q16363	Q14195-2
P30837	P17568	P54819	Q92688	O43823	Q8NFW8	P07311	O95336	P49588	Q13423
Q8I283	O43676	P23526	P39687	P11766	P23368	P07741	Q8I2P0	P47895	Q9NX14
P15559	O95372	P63241-2	P55884-2	P36959	P20700	P61978-3	P55795	P62495	Q13838-2

P42892-2	Q27J81	O60763	P26641-2	Q9UBQ7	P42167	Q99729-3	P31943	P38919	P34897-2
O75923-9	P03956	P78347	P29692-2	P30419	Q9Y2S2	P51858-3	P52597	Q14240	Q14257-2
Q13444-8	Q9NZM3	P06396	Q7Z6Z7-2	P46976	P15529-7	Q9H8Y8-3	Q14103	P60842	Q08174-2
Q9H2D6-7	P40189	Q13630	Q8IXB1-2	P06737	P35080-2	P15170-3	P51991	P30042	O15027-2
Q12906-7	Q12905	Q9H488	Q9NZJ9-2	P11216	Q9NZB2-6	Q5T4S7-3	P09651	P27105	Q01105-2
Q9UM54-6	O75569	O95479	P56545-2	P41250	P48735	Q9Y2H0-3	Q13151	Q96HE7	Q96HJ9-2
A0MZ66-6	Q01629	P17900	Q13951-2	P43304	O75874	P49589-3	Q5SSJ5	O94905	Q9H098-2
P23219-6	P13598	O76070	P22694-2	P04406	O43837	P57737-3	Q9Y3E1	O75477	Q93008-1
Q9NZM1-6	P05362	Q16666	P27824-2	P48637	P04062	Q8N684-3	Q7Z4V5	O43402	Q14318-2
O95819-6	Q14624	O75223	P31939-2	P09211	P14314	P30622-2	O14964	Q92696	Q14980-2
P27816-6	P19823	P09104	P55957-2	P78417	P06744	O43852-3	P68871	Q02952	Q9P0J0-2
P20810-6	Q13418	P17931	P35613-2	P21266	P35579	Q92843-2	P69905	O95671	Q9UJ70-2
Q06481-6	P05106	P09382	Q9Y2J2-2	P00390	P55145	O95831-3	Q9Y5Z4	Q53H12	Q8N4Q1-2
O43399-5	P05556	Q96GK7	Q9BZZ5-2	P07203	P62072	P16989-2	Q9NRV9	P52209	Q3ZCQ8-2
P09493-5	P06756	P16930	P07355-2	O76003	Q8NF37	Q04323-2	P30519	Q13201	Q8TCT9-2
Q15637-5	P08648	P07954	Q9Y2D5-5	P47897	Q03252	P67936-2	P09601	P08493	Q99735-2
Q9BXP5-5	P26006	P04075	P02751-13	Q06210	P13473-2	P06753-2	P14317	Q15691	P84157-2
P98175-5	P17301	Q16595	Q12797-10	O94925	Q9UKM9-2	Q16881-2	Q96QV1	P36776	Q9Y5P6-2
Q14155-5	Q16270	P51114	Q15165-1	P48507	P00367	P61764-2	P08238	Q9H0B6	Q86W92-2
Q15084-5	O00425	Q14192	O75608	P08253	Q9UBM7	Q8N3V7-2	P04792	Q92692-2	Q5QNW6-2
Q9UPN3-4	Q9Y6M1	Q5T0N5	P55263	P24752	P14550	Q9H2G2-2	Q12931	Q9H1K1	P52926-2
P53990-5	P29218	Q14254	P62879	Q72434	Q6Y7W6	P60660	Q92598	Q9H8L6	P07900-2
Q13642-5	Q14573	O75955	P62873	Q14696	P28799	O15173	P11142	P50281	P01112-2
O00154-5	P12268	P30043	Q9UBI6	P24666	Q92538	O00264	P34932	Q9BRT3	Q7Z5G4-3
Q8N983-6	P20839	Q8WUP2	P61952	Q04760	Q08378	Q8N4V1	P0DMV9	O95573	Q9HC38-2
Q9NQW7-4	Q9BY32	Q96AC1	Q9NR31	Q08431	Q08379	Q9Y3D6	Q0VDF9	P33176	Q9Y2Q3-2
Q9Y5K5-4	Q15181	Q01469	P62826	P46108-2	Q9H4G4	Q9Y6C9	Q53T59	Q00325-2	P46926-2
Q15424-4	Q9H2U2	P49327	Q9NUV9	P02545-2	Q9H3P7	Q9NZJ7	Q9NPE3	Q9UKU7	P51570-2
Q9BWF3-4	Q70UQ0	Q16658	Q8WWP7	P50213	Q92896	Q15046	P51798	P60983	Q14315-2
P23467-4	Q96P70	Q96CS3	Q9UIJ7	Q96CN7	P49915	P19256	P32455	Q969H8	O75369-2
P55735-4	O95373	P14324	Q9HAV7	P11413	Q9P2T1	P05455	Q16774	O95297	P21333-2
P48634-4	O00410	Q96I24	Q99988	Q96EK6	Q32MZ4-4	Q9Y4L1	Q9HAV0	Q9UNF1	Q86UX7-2
Q9UPN3-5	Q14974	Q92945	P62993	P35580	Q14766-4	P00492	P29992	P11310	P51648-2
Q16891-4	Q8WZA9	Q96AE4	Q12849	P19105	Q70UQ0-4	Q6YN16	P08754	O43772	P47756-2
P09493-3	P16401	P47755	P19367-4	Q16775	P15311	Q06323-3	P26583	Q13347	P78344
Q8TAQ2-3	O00422	P52907	Q12959-4	Q9NX55	A0FGR8	Q32P28-3	P09429	O15372	Q04637
Q13813-3	P12081	Q08945	O60271-4	O75146	Q9BSJ8	Q13310-3	P07910	O75821	O75822
P67812-3	P49773	O60841	A5YKK6-4	Q16543	O43592	O95302-3	P22626	P60228	P35611-4
P61224-3	P37235	Q15056	O43852-4	P50502	P55060	P22392-2	Q1KMD3	O15371	O15231-3
P11234-3	P17096	P06730	Q05682-4	P30462	O14980	P00387-3	Q9BUJ2	Q99613	P49750-3
Q8IVF2-3	O15347	P23588	Q10567-4	P10316	Q9Y2L1	Q9ULC4-3	Q00839	Q14152	P68036-3
P62805	P16104	O60645	P00338-3	Q09028	Q9NPD3	P40925-3	O43390	P20042	P07951-3
Q71DI3	Q71UI9	P56537	P48059-3	Q9UPT5	Q8IYI6	Q8N2G4-3	O60506	P05198	O43324
P14866	P31942	P41567	P33121-3	P52272	P47813				

Tabla 15. Vías de señalización empleando las proteínas incrementadas por las citocinas proinflamatorias IL-1B y TNF- α , disminuídas por los fármacos antidiabéticos (ADD) con las bases de datos de Reactome y KEGG.

METFORMINA	ROSIGLITAZONA	EMPAGLIFLOZINA	SAXAGLIPTINA
<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>
<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	<i>Influenza A</i>	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>
<i>Antigen processing and presentation</i>	<i>Influenza A</i>	<i>Clathrin-mediated endocytosis</i>	<i>Influenza A</i>
<i>Clathrin-mediated endocytosis</i>	<i>Innate Immune System</i>	<i>Innate Immune System</i>	<i>Clathrin-mediated endocytosis</i>
<i>Innate Immune System</i>	<i>Neutrophil degranulation</i>	<i>Neutrophil degranulation</i>	<i>Innate Immune System</i>
<i>Neutrophil degranulation</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Neutrophil degranulation</i>
<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>
<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Interferon Signaling</i>	<i>TNF signaling pathway</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>
<i>Interferon Signaling</i>	<i>Legionellosis</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Interferon Signaling</i>
<i>IL-17 signaling pathway</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Membrane Trafficking</i>	<i>TNF signaling pathway</i>
<i>Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes</i>	<i>Interferon alpha/beta signaling</i>	<i>RHO GTPases activate IQGAPs</i>	<i>Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes</i>
<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Interferon Signaling</i>	<i>Vesicle-mediated transport</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>
<i>Interferon Signaling</i>	<i>ER to Golgi Anterograde Transport</i>	<i>Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane</i>	<i>Interferon alpha/beta signaling</i>
<i>ER to Golgi Anterograde Transport</i>	<i>Membrane Trafficking</i>	<i>Separation of Sister Chromatids</i>	<i>Interferon Signaling</i>
<i>Membrane Trafficking</i>	<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>	<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>	<i>ER to Golgi Anterograde Transport</i>
<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>	<i>Asparagine N-linked glycosylation</i>	<i>Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition</i>	<i>Membrane Trafficking</i>
<i>Asparagine N-linked glycosylation</i>	<i>Vesicle-mediated transport</i>	<i>L1CAM interactions</i>	<i>Asparagine N-linked glycosylation</i>
<i>Vesicle-mediated transport</i>	<i>COPI-mediated anterograde transport</i>	<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>	<i>Vesicle-mediated transport</i>
<i>COPI-mediated anterograde transport</i>	<i>COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>	<i>Cilium Assembly</i>	<i>COPI-mediated anterograde transport</i>
<i>COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>	<i>COPI-independent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>	<i>RHO GTPases activate IQGAPs</i>	<i>COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>
<i>Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic</i>	<i>Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic</i>	<i>Mitotic Anaphase</i>	<i>Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic</i>
<i>Golgi-to-ER retrograde transport</i>	<i>Golgi-to-ER retrograde transport</i>	<i>G2/M Transition</i>	<i>Golgi-to-ER retrograde transport</i>
<i>Transport to the Golgi and subsequent modification</i>	<i>ER to Golgi Anterograde Transport</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Transport to the Golgi and subsequent modification</i>
<i>Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane</i>	<i>MHC class II antigen presentation</i>	<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>	<i>Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane</i>
<i>Gap junction trafficking and regulation</i>	<i>Separation of Sister Chromatids</i>	<i>Interleukin-1 family signaling</i>	<i>Gap junction trafficking and regulation</i>
<i>Gap junction trafficking</i>	<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Gap junction trafficking</i>
<i>ER to Golgi Anterograde Transport</i>	<i>Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition</i>	<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>	<i>ER to Golgi Anterograde Transport</i>
<i>MHC class II antigen presentation</i>	<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>	<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>	<i>MHC class II antigen presentation</i>
<i>Separation of Sister Chromatids</i>	<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>	<i>G1/S Transition</i>	<i>Separation of Sister Chromatids</i>
<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>	<i>Cilium Assembly</i>	<i>Interleukin-1 signaling</i>	<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>
<i>Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition</i>	<i>COPI-mediated anterograde transport</i>	<i>Ribosome</i>	<i>L1CAM interactions</i>

<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>	<i>COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>	<i>Apoptosis</i>	<i>Recycling pathway of L1</i>
<i>L1CAM interactions</i>	<i>COPI-independent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>	<i>L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression</i>	<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>
<i>Recycling pathway of L1</i>	<i>Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic</i>	<i>Eukaryotic Translation Elongation</i>	<i>Hedgehog 'off' state</i>
<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>	<i>Mitotic Anaphase</i>	<i>Peptide chain elongation</i>	<i>COPI-mediated anterograde transport</i>
<i>Hedgehog 'off' state</i>	<i>G2/M Transition</i>	<i>Influenza Infection</i>	<i>COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>
<i>Cilium Assembly</i>	<i>Golgi-to-ER retrograde transport</i>	<i>Influenza Life Cycle</i>	<i>Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic</i>
<i>COPI-mediated anterograde transport</i>	<i>Transport to the Golgi and subsequent modification</i>	<i>Influenza Viral RNA Transcription and Replication</i>	<i>Mitotic Anaphase</i>
<i>COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane</i>	<i>G2/M Transition</i>
<i>Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic</i>	<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>	<i>Viral mRNA Translation</i>	<i>The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint</i>
<i>Mitotic Anaphase</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>	<i>Golgi-to-ER retrograde transport</i>
<i>G2/M Transition</i>	<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>	<i>Signaling by WNT</i>	<i>Transport to the Golgi and subsequent modification</i>
<i>The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint</i>	<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>	<i>Cellular responses to stress</i>	<i>Downstream signaling events of B Cell Receptor (BCR)</i>
<i>Golgi-to-ER retrograde transport</i>	<i>G1/S Transition</i>	<i>Selenoamino acid metabolism</i>	<i>Activation of NF-kappaB in B cells</i>
<i>Transport to the Golgi and subsequent modification</i>	<i>Cellular response to hypoxia</i>	<i>Selenocysteine synthesis</i>	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>
<i>Downstream signaling events of B Cell Receptor (BCR)</i>	<i>Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha</i>	<i>Separation of Sister Chromatids</i>	<i>SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1</i>
<i>Activation of NF-kappaB in B cells</i>	<i>ER-Phagosome pathway</i>	<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>	<i>APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins</i>
<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	<i>Antigen processing-Cross presentation</i>	<i>Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition</i>	<i>Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase</i>
<i>SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1</i>	<i>HIV Infection</i>	<i>Signaling by ROBO receptors</i>	<i>SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21</i>
<i>APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins</i>	<i>Host Interactions of HIV factors</i>	<i>ABC-family proteins mediated transport</i>	<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>
<i>Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase</i>	<i>Vif-mediated degradation of APOBEC3G</i>	<i>Axon guidance</i>	<i>Downstream TCR signaling</i>
<i>SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21</i>	<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>	<i>Interleukin-1 family signaling</i>	<i>FCERI mediated NF-kB activation</i>
<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>	<i>Signaling by WNT</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Interleukin-1 family signaling</i>
<i>Downstream TCR signaling</i>	<i>Cellular responses to stress</i>	<i>Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>
<i>FCERI mediated NF-kB activation</i>	<i>Separation of Sister Chromatids</i>	<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>	<i>Regulation of mitotic cell cycle</i>
<i>Interleukin-1 family signaling</i>	<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>	<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>	<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>
<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition</i>	<i>Programmed Cell Death</i>	<i>Dectin-1 mediated noncanonical NF-kB signaling</i>
<i>Regulation of mitotic cell cycle</i>	<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>	<i>Cilium Assembly</i>	<i>CLEC7A (Dectin-1) signaling</i>
<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>	<i>Signaling by ROBO receptors</i>	<i>RHO GTPases activate IQGAPs</i>	<i>Degradation of GLI1 by the proteasome</i>
<i>Dectin-1 mediated noncanonical NF-kB signaling</i>	<i>ABC-family proteins mediated transport</i>	<i>Infectious disease</i>	<i>Degradation of GLI2 by the proteasome</i>

<i>CLEC7A (Dectin-1) signaling</i>	<i>Axon guidance</i>	<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>	<i>GLI3 is processed to GLI3R by the proteasome</i>
<i>Degradation of GLI1 by the proteasome</i>	<i>Signaling by Interleukins</i>	<i>Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol</i>	<i>C-type lectin receptors (CLRs)</i>
<i>Degradation of GLI2 by the proteasome</i>	<i>Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements</i>	<i>Mitotic Anaphase</i>	<i>TNFR2 non-canonical NF-kB pathway</i>
<i>GLI3 is processed to GLI3R by the proteasome</i>	<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>	<i>M Phase</i>	<i>NIK-->noncanonical NF-kB signaling</i>
<i>C-type lectin receptors (CLRs)</i>	<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>	<i>G1/S Transition</i>	<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>
<i>TNFR2 non-canonical NF-kB pathway</i>	<i>Cilium Assembly</i>	<i>G2/M Transition</i>	<i>Orc1 removal from chromatin</i>
<i>NIK-->noncanonical NF-kB signaling</i>	<i>ABC transporter disorders</i>	<i>Cell Cycle, Mitotic</i>	<i>Switching of origins to a post-replicative state</i>
<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>	<i>Infectious disease</i>	<i>Metabolism of amino acids and derivatives</i>	<i>Cyclin E associated events during G1/S transition</i>
<i>Orc1 removal from chromatin</i>	<i>Defective CFTR causes cystic fibrosis</i>	<i>rRNA processing</i>	<i>G1/S Transition</i>
<i>Switching of origins to a post-replicative state</i>	<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>	<i>Eukaryotic Translation Initiation</i>	<i>Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry</i>
<i>Cyclin E associated events during G1/S transition</i>	<i>Mitotic Anaphase</i>	<i>Formation of a pool of free 40S subunits</i>	<i>FBXL7 down-regulates AURKA during mitotic entry and in early mitosis</i>
<i>G1/S Transition</i>	<i>M Phase</i>	<i>GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit</i>	<i>Transcriptional regulation by RUNX2</i>
<i>Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry</i>	<i>G1/S Transition</i>	<i>Cap-dependent Translation Initiation</i>	<i>Regulation of RUNX2 expression and activity</i>
<i>FBXL7 down-regulates AURKA during mitotic entry and in early mitosis</i>	<i>G2/M Transition</i>	<i>Eukaryotic Translation Termination</i>	<i>Signaling by NOTCH4</i>
<i>Transcriptional regulation by RUNX2</i>	<i>Cell Cycle, Mitotic</i>	<i>Translation</i>	<i>Interleukin-1 signaling</i>
<i>Regulation of RUNX2 expression and activity</i>	<i>Metabolism of amino acids and derivatives</i>	<i>rRNA processing in the nucleus and cytosol</i>	<i>Negative regulation of NOTCH4 signaling</i>
<i>Signaling by NOTCH4</i>	<i>Eukaryotic Translation Termination</i>	<i>Cellular responses to external stimuli</i>	<i>Signaling by the B Cell Receptor (BCR)</i>
<i>Interleukin-1 signaling</i>	<i>Translation</i>	<i>Regulation of expression of SLITs and ROBOs</i>	<i>Ribosome</i>
<i>Negative regulation of NOTCH4 signaling</i>	<i>Cellular responses to external stimuli</i>	<i>Interleukin-1 signaling</i>	<i>Proteasome</i>
<i>Signaling by the B Cell Receptor (BCR)</i>	<i>Regulation of expression of SLITs and ROBOs</i>	<i>Nonsense-Mediated Decay (NMD)</i>	<i>Epstein-Barr virus infection</i>
<i>Ribosome</i>	<i>Nonsense-Mediated Decay (NMD)</i>	<i>Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency</i>	<i>Apoptosis</i>
<i>Proteasome</i>	<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)</i>	<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)</i>	<i>Downstream signaling events of B Cell Receptor (BCR)</i>
<i>Epstein-Barr virus infection</i>		<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)</i>	<i>Activation of NF-kappaB in B cells</i>
<i>Apoptosis</i>			<i>Cellular response to hypoxia</i>
<i>Downstream signaling events of B Cell Receptor (BCR)</i>			<i>Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha</i>
<i>Activation of NF-kappaB in B cells</i>			<i>ER-Phagosome pathway</i>
<i>Cellular response to hypoxia</i>			<i>Antigen processing-Cross presentation</i>
<i>Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha</i>			<i>Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)</i>
<i>ER-Phagosome pathway</i>			<i>L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression</i>

<i>Antigen processing-Cross presentation</i>			<i>Eukaryotic Translation Elongation</i>
<i>Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)</i>			<i>Peptide chain elongation</i>
<i>L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression</i>			<i>HIV Infection</i>
<i>Eukaryotic Translation Elongation</i>			<i>Host Interactions of HIV factors</i>
<i>Peptide chain elongation</i>			<i>Influenza Infection</i>
<i>HIV Infection</i>			<i>Influenza Life Cycle</i>
<i>Host Interactions of HIV factors</i>			<i>Influenza Viral RNA Transcription and Replication</i>
<i>Influenza Infection</i>			<i>Regulation of Apoptosis</i>
<i>Influenza Life Cycle</i>			<i>Autodegradation of Cdh1 by Cdh1:APC/C</i>
<i>Influenza Viral RNA Transcription and Replication</i>			<i>SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1</i>
<i>Regulation of Apoptosis</i>			<i>APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins</i>
<i>Autodegradation of Cdh1 by Cdh1:APC/C</i>			<i>APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin</i>
<i>SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1</i>			<i>APC/C:Cdh1 mediated degradation of Cdc20 and other APC/C:Cdh1 targeted proteins in late mitosis/early G1</i>
<i>APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins</i>			<i>Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A</i>
<i>APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin</i>			<i>Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase</i>
<i>APC/C:Cdh1 mediated degradation of Cdc20 and other APC/C:Cdh1 targeted proteins in late mitosis/early G1</i>			<i>APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins</i>
<i>Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A</i>			<i>Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins</i>
<i>Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase</i>			<i>APC:Cdc20 mediated degradation of cell cycle proteins prior to satisfaction of the cell cycle checkpoint</i>
<i>APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins</i>			<i>SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane</i>
<i>Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins</i>			<i>Vpu mediated degradation of CD4</i>
<i>APC:Cdc20 mediated degradation of cell cycle proteins prior to satisfaction of the cell cycle checkpoint</i>			<i>Vif-mediated degradation of APOBEC3G</i>
<i>SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane</i>			<i>SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21</i>
<i>Vpu mediated degradation of CD4</i>			<i>Viral mRNA Translation</i>
<i>Vif-mediated degradation of APOBEC3G</i>			<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>
<i>SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21</i>			<i>Signaling by WNT</i>
<i>Viral mRNA Translation</i>			<i>Downstream TCR signaling</i>
<i>Degradation of beta-catenin by the destruction complex</i>			<i>Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation</i>
<i>Signaling by WNT</i>			<i>Cellular responses to stress</i>
<i>Downstream TCR signaling</i>			<i>Selenoamino acid metabolism</i>
<i>Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation</i>			<i>Selenocysteine synthesis</i>
<i>Cellular responses to stress</i>			<i>Separation of Sister Chromatids</i>
<i>Selenoamino acid metabolism</i>			<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>

<i>Selenocysteine synthesis</i>			<i>FCER1 mediated NF-κB activation</i>
<i>Separation of Sister Chromatids</i>			<i>Autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1</i>
<i>Mitotic Metaphase and Anaphase</i>			<i>Regulation of ornithine decarboxylase (ODC)</i>
<i>Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition</i>			<i>Metabolism of polyamines</i>
<i>FCER1 mediated NF-κB activation</i>			<i>Signaling by ROBO receptors</i>
<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>			<i>ABC-family proteins mediated transport</i>
<i>Autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1</i>			<i>Beta-catenin independent WNT signaling</i>
<i>Regulation of ornithine decarboxylase (ODC)</i>			<i>PCP/CE pathway</i>
<i>Metabolism of polyamines</i>			<i>Axon guidance</i>
<i>Signaling by ROBO receptors</i>			<i>Interleukin-1 family signaling</i>
<i>ABC-family proteins mediated transport</i>			<i>Signaling by Interleukins</i>
<i>Beta-catenin independent WNT signaling</i>			<i>AUF1 (hnRNP D0) binds and destabilizes mRNA</i>
<i>PCP/CE pathway</i>			<i>Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements</i>
<i>Axon guidance</i>			<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>
<i>Interleukin-1 family signaling</i>			<i>Regulation of mitotic cell cycle</i>
<i>Signaling by Interleukins</i>			<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>
<i>AUF1 (hnRNP D0) binds and destabilizes mRNA</i>			<i>Asymmetric localization of PCP proteins</i>
<i>Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements</i>			<i>Degradation of AXIN</i>
<i>Mitotic G2-G2/M phases</i>			<i>Degradation of DVL</i>
<i>Regulation of mitotic cell cycle</i>			<i>Programmed Cell Death</i>
<i>Mitotic G1 phase and G1/S transition</i>			<i>Hedgehog ligand biogenesis</i>
<i>Asymmetric localization of PCP proteins</i>			<i>Signaling by Hedgehog</i>
<i>Degradation of AXIN</i>			<i>Hh mutants that don't undergo autocatalytic processing are degraded by ERAD</i>
<i>Degradation of DVL</i>			<i>Hh mutants abrogate ligand secretion</i>
<i>Programmed Cell Death</i>			<i>Dectin-1 mediated noncanonical NF-κB signaling</i>
<i>Hedgehog ligand biogenesis</i>			<i>CLEC7A (Dectin-1) signaling</i>
<i>Signaling by Hedgehog</i>			<i>Degradation of GLI1 by the proteasome</i>
<i>Hh mutants that don't undergo autocatalytic processing are degraded by ERAD</i>			<i>Degradation of GLI2 by the proteasome</i>
<i>Hh mutants abrogate ligand secretion</i>			<i>GLI3 is processed to GLI3R by the proteasome</i>
<i>Dectin-1 mediated noncanonical NF-κB signaling</i>			<i>Hedgehog 'off' state</i>
<i>CLEC7A (Dectin-1) signaling</i>			<i>ABC transporter disorders</i>
<i>Degradation of GLI1 by the proteasome</i>			<i>C-type lectin receptors (CLRs)</i>
<i>Degradation of GLI2 by the proteasome</i>			<i>Hedgehog 'on' state</i>
<i>GLI3 is processed to GLI3R by the proteasome</i>			<i>Regulation of RAS by GAPs</i>
<i>Hedgehog 'off' state</i>			<i>Infectious disease</i>
<i>Cilium Assembly</i>			<i>TNFR2 non-canonical NF-κB pathway</i>

<i>ABC transporter disorders</i>			<i>NIK-->noncanonical NF-kB signaling</i>
<i>C-type lectin receptors (CLRs)</i>			<i>Defective CFTR causes cystic fibrosis</i>
<i>Hedgehog 'on' state</i>			<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>
<i>Regulation of RAS by GAPs</i>			<i>MAPK6/MAPK4 signaling</i>
<i>Infectious disease</i>			<i>UCH proteinases</i>
<i>TNFR2 non-canonical NF-kB pathway</i>			<i>Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol</i>
<i>NIK-->noncanonical NF-kB signaling</i>			<i>CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex</i>
<i>Defective CFTR causes cystic fibrosis</i>			<i>Assembly of the pre-replicative complex</i>
<i>MAPK1/MAPK3 signaling</i>			<i>Mitotic Anaphase</i>
<i>MAPK6/MAPK4 signaling</i>			<i>M Phase</i>
<i>UCH proteinases</i>			<i>Orc1 removal from chromatin</i>
<i>Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol</i>			<i>DNA Replication Pre-Initiation</i>
<i>CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex</i>			<i>CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6</i>
<i>Assembly of the pre-replicative complex</i>			<i>Switching of origins to a post-replicative state</i>
<i>Mitotic Anaphase</i>			<i>Cyclin E associated events during G1/S transition</i>
<i>M Phase</i>			<i>G1/S Transition</i>
<i>Orc1 removal from chromatin</i>			<i>G2/M Transition</i>
<i>DNA Replication Pre-Initiation</i>			<i>Cell Cycle, Mitotic</i>
<i>CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6</i>			<i>Stabilization of p53</i>
<i>Switching of origins to a post-replicative state</i>			<i>p53-Dependent G1 DNA Damage Response</i>
<i>Cyclin E associated events during G1/S transition</i>			<i>p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint</i>
<i>G1/S Transition</i>			<i>Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A</i>
<i>G2/M Transition</i>			<i>p53-Independent DNA Damage Response</i>
<i>Cell Cycle, Mitotic</i>			<i>p53-Independent G1/S DNA damage checkpoint</i>
<i>Stabilization of p53</i>			<i>G1/S DNA Damage Checkpoints</i>
<i>p53-Dependent G1 DNA Damage Response</i>			<i>Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry</i>
<i>p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint</i>			<i>Metabolism of amino acids and derivatives</i>
<i>Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A</i>			<i>rRNA processing</i>
<i>p53-Independent DNA Damage Response</i>			<i>Eukaryotic Translation Initiation</i>
<i>p53-Independent G1/S DNA damage checkpoint</i>			<i>Formation of a pool of free 40S subunits</i>
<i>G1/S DNA Damage Checkpoints</i>			<i>GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit</i>
<i>Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry</i>			<i>Cap-dependent Translation Initiation</i>
<i>Metabolism of amino acids and derivatives</i>			<i>Eukaryotic Translation Termination</i>
<i>rRNA processing</i>			<i>Translation</i>
<i>Eukaryotic Translation Initiation</i>			<i>Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D</i>
<i>Formation of a pool of free 40S subunits</i>			<i>The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint</i>

<i>GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit</i>			<i>FBXL7 down-regulates AURKA during mitotic entry and in early mitosis</i>
<i>Cap-dependent Translation Initiation</i>			<i>rRNA processing in the nucleus and cytosol</i>
<i>Eukaryotic Translation Termination</i>			<i>Transcriptional regulation by RUNX3</i>
<i>Translation</i>			<i>Transcriptional regulation by RUNX2</i>
<i>Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D</i>			<i>Regulation of RUNX2 expression and activity</i>
<i>The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint</i>			<i>Regulation of RUNX3 expression and activity</i>
<i>FBXL7 down-regulates AURKA during mitotic entry and in early mitosis</i>			<i>Regulation of PTEN stability and activity</i>
<i>rRNA processing in the nucleus and cytosol</i>			<i>Cellular responses to external stimuli</i>
<i>Transcriptional regulation by RUNX3</i>			<i>Regulation of expression of SLITs and ROBOs</i>
<i>Transcriptional regulation by RUNX2</i>			<i>Signaling by NOTCH4</i>
<i>Regulation of RUNX2 expression and activity</i>			<i>Interleukin-1 signaling</i>
<i>Regulation of RUNX3 expression and activity</i>			<i>Nonsense-Mediated Decay (NMD)</i>
<i>Regulation of PTEN stability and activity</i>			<i>Negative regulation of NOTCH4 signaling</i>
<i>Cellular responses to external stimuli</i>			<i>Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency</i>
<i>Regulation of expression of SLITs and ROBOs</i>			<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)</i>
<i>Signaling by NOTCH4</i>			<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)</i>
<i>Interleukin-1 signaling</i>			<i>Signaling by the B Cell Receptor (BCR)</i>
<i>Nonsense-Mediated Decay (NMD)</i>			
<i>Negative regulation of NOTCH4 signaling</i>			
<i>Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency</i>			
<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)</i>			
<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)</i>			
<i>Signaling by the B Cell Receptor (BCR)</i>			

Tabla 16. Vías de señalización moduladas por los fármacos antidiabéticos obtenidas con OmicsNet.

Saxagliptina		Metformina				Rosiglitazona				Empagliflozina					
AUMENTADAS															
KEGG		REACTOME		KEGG		REACTOME		KEGG		REACTOME		KEGG		REACTOME	
Vía	P-Value	Vía	P-Value	Vía	P-Value	Vía	P-Value	Vía	P-Value	Vía	P-Value	Vía	P-Value	Vía	P-Value
<i>Hedgehog signaling pathway</i>	3.09E-27	<i>mRNA Splicing</i>	6.63E-17	<i>Renin-angiotensin system</i>	1.94E-18	<i>Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC</i>	1.26E-33	<i>cAMP signaling pathway</i>	1.59E-25	<i>Gastrin-CREB signaling pathway via PKC and MAPK</i>	1.89E-37	<i>AMPK signaling pathway</i>	1.64E-22	<i>Endosomal Sorting Complex Required For Transport (ESCRT)</i>	2.74E-32

Maturity onset diabetes of the young	9.00 E-22	mRNA Splicing - Major Pathway	6.6 3E-17	Nucleotide excision repair	9.20 E-18	Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	5.2 9E-33	Gap junction	5.3 1E-23	G alpha (q) signalling events	1.8 3E-28	Wnt signalling pathway	8.6 6E-13	Membrane Trafficking	1.76 E-19
Cocaine addiction	5.76 E-19	Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	1.4 3E-16	Human papillomavirus infection	2.06 E-17	mRNA Splicing	1.9 8E-32	Ubiquitin mediated proteolysis	3.1 9E-22	Muscle contraction	3.5 4E-26	MAPK signalling pathway	3.0 7E-08	Interleukin-1 signaling	1.73 E-05
Human papillomavirus infection	6.75 E-19	Respiratory electron transport	2.3 4E-16	Yersinia infection	1.17 E-16	mRNA Splicing - Major Pathway	1.9 8E-32	Ribosome biogenesis in eukaryotes	1.3 4E-21	Signaling by EGFR in Cancer	2.9 5E-25	Autophagy - animal	1.1 1E-06	NOTCH1 Intracellular Domain Regulates Transcription	2.65 E-05
Amphetamine addiction	1.18 E-18	G2/M Transition	1.1 7E-15	Melasma	1.95 E-11	Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	7.9 7E-32	Vasopressin-regulated water reabsorption	2.5 6E-19	Signaling by EGFR	1.7 0E-24	Proteoglycans in cancer	0.0 0168	Constitutive Signaling by NOTCH1 HD+PEST Domain Mutants	3.10 E-05
Renin secretion	8.27 E-17	Mitotic G2-G2/M phases	2.1 3E-15	Renin secretion	2.97 E-11	mRNA Processing	5.1 2E-29	Hepatocellular carcinoma	1.7 6E-18	mRNA Splicing	2.2 1E-24	Neurotrophin signalling pathway	0.0 0725	Oxygen-dependent Proline Hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	4.47 E-05
Glutamate synaptic	1.17 E-15	mRNA Processing	5.1 9E-15	Estrogen signalling pathway	3.18 E-11	Chaperone mediated protein folding	3.4 5E-25	GABAergic synapse	2.7 7E-18	mRNA Splicing - Major Pathway	2.2 1E-24	Hippo signalling pathway	0.0 58	DNA Repair	4.94 E-05
Oxidative phosphorylation	1.21 E-14	Signaling by FGFR	1.1 4E-14	Renal cell carcinoma	5.54 E-11	Protein folding	5.0 5E-24	Apoptosis - multiple species	3.9 2E-18	Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	8.7 1E-24	SNARE interactions in vesicular transport	0.0 937	Constitutive Signaling by NOTCH1 PEST Domain Mutants	5.12 E-05
Nicotine addiction	1.84 E-13	Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.	1.4 5E-14	Apoptosis - multiple species	1.22 E-10	Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC	5.0 0E-22	Renin-angiotensin system	7.4 0E-18	NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	1.6 7E-23	Autophagy - other	0.0 988	Cellular responses to stress	0.00 0113
Renin-angiotensin system	4.78 E-12	Signaling by FGFR in disease	9.1 5E-14	Antigen processing and presentation	1.38 E-10	G2/M Transition	1.1 3E-19	Cytokine - cytokine receptor interaction	1.0 8E-17	Downstream signalling transduction	2.4 3E-23	Basal transcription factors	0.1 33	Cellular response to hypoxia	0.00 0113
Chronic myeloid leukemia	2.07 E-11	Signaling by ERBB2	1.5 4E-13	Chronic myeloid leukemia	1.46 E-10	Mitotic G2-G2/M phases	2.4 3E-19	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	1.3 9E-17	Striated Muscle Contraction	6.7 5E-23			EGFR downregulation	0.00 0113
Apoptosis - multiple species	2.81 E-11	Downstream signaling of activated FGFR	2.4 6E-13	cAMP signalling pathway	2.60 E-10	Translocation of GLUT4 to the Plasma	3.3 1E-17	Estrogen signalling pathway	2.1 5E-17	Signaling by FGFR in disease	1.1 3E-22			Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF) by Oxygen	0.00 0113

						Membrane									
Estrogen signaling pathway	3.32E-11	SOS-mediated signalling	3.63E-13	Necroptosis	2.60E-10	Centrosome maturation	1.29E-16	Chronic myeloid leukemia	1.18E-15	Signaling by SCF-KIT	8.37E-22			Loss of Function of FBXW7 in Cancer and NOTCH1 Signaling	0.000123
Melanoma	6.71E-11	Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome	4.33E-13	GABAergic synapse	2.99E-10	Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes	1.29E-16	Salmonella infection	1.76E-15	Signaling by FGFR	1.68E-21			Signaling by NOTCH1 (7:9)(NOTCH1:M1580_K2555) Translocation Mutant	0.000125
Salivary secretion	1.61E-10	Loss of Nlp from mitotic centrosomes	4.33E-13	Notch signaling pathway	4.35E-10	Signaling by FGFR	1.23E-13	Thyroid cancer	6.30E-15	mRNA Processing	4.86E-21			Signaling by NOTCH1 in Cancer	0.000125
Ribosome biogenesis in eukaryotes	2.18E-10	Signaling by SCF-KIT	8.64E-13	Ribosome biogenesis in eukaryotes	1.18E-09	Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane	1.98E-13	Sphingolipid signaling pathway	6.67E-15	Signaling by PDGF	1.18E-20			Signaling by NOTCH1 PEST Domain Mutants in Cancer	0.000125
Renal cell carcinoma	2.61E-10	Signaling by EGFR in Cancer	1.20E-12	Gastric cancer	1.92E-09	mRNA 3'-end processing	3.88E-13	Chemokine signaling pathway	1.26E-14	Signaling by NGF	3.72E-20			FBXW7 Mutants and NOTCH1 in Cancer	0.000125
Peroxisome	3.31E-10	Downstream signal transduction	1.31E-12	Peroxisome	2.50E-09	Post-Elongation Processing of Intron-Containing pre-mRNA	3.88E-13	Ribosome	1.58E-14	Signaling by ERBB2	2.06E-19			Signaling by NOTCH1 HD Domain Mutants in Cancer	0.000125
GABAergic synapse	4.14E-10	DAP12 signaling	1.48E-12	Prostate cancer	3.50E-09	Transport of connexons to the plasma membrane	4.72E-13	Herpes simplex virus 1 infection	3.65E-14	Downstream signaling of activated FGFR	5.71E-19			Signaling by NOTCH1 HD+PEST Domain Mutants in Cancer	0.000125
cAMP signaling pathway	5.63E-10	NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	2.37E-12	Hepatocellular carcinoma	8.65E-09	RNA Polymerase II Transcription Termination	5.00E-13	Progesterone-mediated oocyte maturation	4.00E-14	Signaling by ERBB4	9.16E-19			Signaling by NOTCH1	0.000125
Prostate cancer	6.55E-10	Centrosome maturation	2.44E-12	Cell cycle	1.07E-08	Post-Elongation Processing of the Transcript	5.00E-13	MicroRNAs in cancer	7.62E-14	DAP12 signaling	1.69E-18			Circadian Clock	0.000248
Cell cycle	1.63E-09	Recruitment of mitotic centrosome proteins and	2.44E-12	Adherens junction	1.39E-08	Cleavage of Growing Transcript in the Termination Region	5.00E-13	Inflammatory bowel disease (IBD)	8.09E-14	Signal Transduction	1.68E-17			Signaling by NOTCH	0.000329

		complexes													
Human T-cell leukemia virus 1 infection	4.03 E-09	Signaling by ERBB4	3.19E-12	Chagas disease (American trypanosomiasis)	1.58 E-08	Folding of actin by CCT/TriC	5.30E-13	Glucagon signaling pathway	1.10E-13	DAP12 interactions	6.76E-17			Downregulation of ERBB4 signaling	0.000342
Choline metabolism in cancer	4.97 E-09	Signaling by EGFR	8.33E-12	Choline metabolism in cancer	2.06 E-08	Signaling by FGFR in disease	1.03E-12	Insulin resistance	1.77E-13	Signaling by Interleukins	5.82E-16			STING mediated induction of type 1 IFN	0.000342
Gastric cancer	5.87 E-09	Signalling by NGF	1.08E-11	Leishmaniasis	2.43 E-08	Signaling by ERBB2	1.38E-12	Melanoma	3.95E-13	Signaling to ERKs	8.53E-15			Cyclin D associated events in G1	0.000398
Cellular senescence	1.18 E-08	DAP12 interactions	1.15E-11	Human T-cell leukemia virus 1 infection	2.88 E-08	Downstream signaling of activated FGFR	1.76E-12	Bladder cancer	4.66E-13	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	1.93E-14			G1 Phase	0.000398
Nucleotide excision repair	2.16 E-08	The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	1.26E-11	Cellular senescence	5.42 E-08	SOS-mediated signalling	2.36E-12	Circadian rhythm	7.23E-13	GAB1 signalosome	3.35E-14			IRAK2 mediated activation of TAK1 complex upon TLR7/8 or 9 stimulation	0.000548
Hepatocellular carcinoma	2.32 E-08	Signaling by PDGF	2.40E-11	Bladder cancer	8.19 E-08	Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome	8.89E-12	TGF-beta signaling pathway	8.86E-13	PI3K/AKT activation	3.35E-14			IRAK2 mediated activation of TAK1 complex	0.000548
Cardiac muscle contraction	3.57 E-08	Signalling to p38 via RIT and RIN	6.51E-11	Circadian entrainment	8.94 E-08	Loss of Nlp from mitotic centrosomes	8.89E-12	Cell cycle	1.93E-12	Constitutive PI3K/AKT Signaling in Cancer	3.44E-14			Assembly of HIV virion	0.000668
Ribosome	3.59 E-08	RAF/MAP kinase cascade	7.37E-11	Regulation of actin cytoskeleton	9.32 E-08	Downstream signal transduction	9.78E-12	Non-small cell lung cancer	2.24E-12	Interleukin-2 signaling	1.14E-13			Membrane binding and targeting of GAG proteins	0.000668
Vasopressin-regulated water reabsorption	3.79 E-08	ARMS-mediated activation	1.28E-10	Cardiac muscle contraction	1.29 E-07	DAP12 signaling	1.11E-11	Endometrial cancer	2.24E-12	SOS-mediated signalling	1.17E-13			Signaling by Interleukins	0.000703
Glioma	6.55 E-08	Activation of BAD and translocation to mitochondria	2.38E-10	Glioma	1.40 E-07	Signaling by EGFR in Cancer	1.13E-11	Nucleotide excision repair	3.91E-12	PI3K events in ERBB4 signaling	1.39E-13			Vpu mediated degradation of CD4	0.000716
Longevity regulating pathway - multiple species	1.07 E-07	Translocation of GLUT4 to the Plasma Membrane	3.87E-10	Ribosome	1.61 E-07	RNA Polymerase II Transcription	2.01E-11	Prolactin signaling pathway	4.08E-12	PIP3 activates AKT signaling	1.39E-13			Association of licensing factors with the pre-replicative complex	8.00E-04
Adherens junction	1.16 E-07	Frs2-mediated activation	4.23E-10	Vasopressin-regulated water reabsorption	1.89 E-07	Cell Cycle, Mitotic	2.07E-11	Choline metabolism in cancer	4.68E-12	PI-3K cascade	1.39E-13			Nucleotide Excision Repair	0.00085

Glucagon signaling pathway	1.18 E-07	Intrinsic Pathway for Apoptosis	7.7 2E-10	Cholinergic synapse	2.75 E-07	NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	2.8 2E-11	Sulfur relay system	5.8 3E-12	PI3K/AKT Signaling in Cancer	1.3 9E-13		SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1	0.00 085
Human immunodeficiency virus 1 infection	1.83 E-07	Cell Cycle, Mitotic	1.0 5E-09	Asthma	3.05 E-07	Signaling by SCF-KIT	4.2 1E-11	Gastric cancer	6.2 1E-12	PI3K events in ERBB2 signaling	1.3 9E-13		NF-kB is activated and signals survival	0.00 094 3
Notch signaling pathway	1.87 E-07	Prolonged ERK activation events	1.1 8E-09	Inflammatory bowel disease (IBD)	3.66 E-07	Signaling by EGFR	6.4 9E-11	Focal adhesion	7.0 2E-12	Signaling by the B Cell Receptor (BCR)	3.0 2E-13		p75NTR recruits signalling complexes	0.00 094 3
Necroptosis	1.87 E-07	GRB2 events in EGFR signaling	1.9 8E-09	Human immunodeficiency virus 1 infection	4.01 E-07	DAP12 interactions	9.0 4E-11	Renal cell carcinoma	8.3 6E-12	Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling	3.5 2E-13		Downregulation of ERBB2:ERBB3 signaling	0.00 094 3
Bladder cancer	2.31 E-07	SHC-mediated signalling	3.6 6E-09	Autoimmune thyroid disease	4.14 E-07	Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript	1.0 8E-10	Renin secretion	1.1 8E-11	SHC1 events in EGFR signaling	4.2 2E-13		Regulation of the Fanconi anemia pathway	0.00 094 3
Focal adhesion	2.93 E-07	SHC1 events in EGFR signaling	3.6 6E-09	Glucagon signaling pathway	4.20 E-07	Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes	1.0 8E-10	Human papillomavirus infection	1.5 1E-11	Prolonged ERK activation events	1.3 0E-12		Vif-mediated degradation of APOBEC3G	0.00 094 7
NF-kappa B signaling pathway	3.18 E-07	Activation of BH3-only proteins	6.4 7E-09	Autophagy - other	4.46 E-07	Gene Expression	1.3 3E-10	Cushing syndrome	2.9 8E-11	Signaling to RAS	6.3 9E-12		Receptor-ligand binding initiates the second proteolytic cleavage of Notch receptor	0.00 11
Systemic lupus erythematosus	3.39 E-07	Deadenylation of mRNA	6.4 7E-09	Herpes simplex virus 1 infection	5.28 E-07	Signaling by ERBB4	1.4 9E-10	Leukocyte transendothelial migration	3.9 9E-11	GRB2 events in EGFR signaling	8.0 0E-12		Constitutive Signaling by NOTCH1 HD Domain Mutants	0.00 11
Regulation of actin cytoskeleton	3.40 E-07	SHC-related events	1.7 3E-08	Breast cancer	5.34 E-07	Post-chaperonin tubulin folding pathway	1.7 6E-10	Prostate cancer	6.7 1E-11	SHC-related events	8.8 3E-12		SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21	0.00 111
Thyroid hormone signaling pathway	3.76 E-07	SHC-related events triggered by IGF1R	1.7 3E-08	Longevity regulating pathway - multiple species	5.74 E-07	mRNA Splicing - Minor Pathway	1.8 9E-10	Systemic lupus erythematosus	9.6 6E-11	Frs2-mediated activation	8.8 3E-12		NRIF signals cell death from the nucleus	0.00 126
Herpes simplex virus 1 infection	4.18 E-07	RAF phosphorylates MEK	4.1 6E-08	Focal adhesion	9.20 E-07	Signaling by PDGF	1.9 1E-10	cGMP-PKG signaling pathway	1.1 1E-10	SHC-related events triggered by IGF1R	8.8 3E-12		Spry regulation of FGF signaling	0.00 144
TGF-beta signaling pathway	5.44 E-07	MEK activation	4.1 6E-08	ECM-receptor interaction	9.79 E-07	Signaling by NGF	2.4 3E-10	Aldosterone-regulate sodium reabsorption	1.4 2E-10	Insulin receptor signaling cascade	1.1 9E-11		p75NTR signals via NF-kB	0.00 144
Autoimmune thyroid disease	5.44 E-07	IRS-mediated signalling	5.3 8E-08	Systemic lupus erythematosus	1.31 E-06	Gap junction trafficking and regulation	2.5 0E-10	Human T-cell leukemia virus 1 infection	2.4 4E-10	SHC-mediated signalling	2.3 1E-11		IRAK1 recruits IKK complex upon TLR7/8 or 9 stimulation	0.00 144

Autophagy - other	7.04 E-07	SHC1 events in ERBB4 signaling	6.02 E-08	Thyroid hormone signaling pathway	1.46 E-06	RAF/MAP kinase cascade	3.13 E-10	Adipocyte signaling pathway	2.73 E-10	mRNA 3'-end processing	3.46 E-11			Activation of IRF3/IRF7 mediated by TBK1/IKK epsilon	0.00144
Cholinergic synapse	8.95 E-07	IRS-related events	7.92 E-08	Ferroptosis	1.49 E-06	Signalling to p38 via RIT and RIN	3.37 E-10	AMPK signaling pathway	4.24 E-10	Post-Elongation Processing of Intron-Containing pre-mRNA	3.46 E-11			TRAF6 mediated induction of TAK1 complex	0.00144
Carbohydrate digestion and absorption	1.11 E-06	Signaling by Hippo	8.70 E-08	SNARE interactions in vesicular transport	2.12 E-06	Transport of Mature Transcript to Cytoplasm	5.65 E-10	Glioma	4.43 E-10	ARMS-mediated activation	5.96 E-11			IRAK1 recruits IKK complex	0.00144
DISMINUÍDAS															
KEGG		REACTOME		KEGG		REACTOME		KEGG		REACTOME		KEGG		REACTOME	
Via	P-Value	Via	P-Value	Via	P-Value	Via	P-Value	Via	P-Value	Via	P-Value	Via	P-Value	Via	P-Value
Basal transcription factors	7.70 E-124	Metabolism of RNA	2.33 E-111	Basal transcription factors	1.54 E-65	Metabolism of RNA	7.75 E-92	p53 signaling pathway	3.60 E-19	Rho GTPase cycle	7.48 E-48	Basal transcription factors	9.37 E-119	Eukaryotic Translation Initiation	1.55 E-80
Mismatch repair	1.16 E-52	Metabolism of mRNA	2.78 E-101	Mismatch repair	5.89 E-48	Metabolism of mRNA	1.64 E-86	Ferroptosis	6.64 E-18	Signaling by Rho GTPases	7.48 E-48	p53 signaling pathway	3.06 E-23	Cap-dependent Translation Initiation	1.55 E-80
DNA replication	6.85 E-18	Translation	2.07 E-97	Nucleotide excision repair	3.20 E-23	Gene Expression	2.19 E-64	Spliceosome	9.90 E-15	G alpha (12/13) signalling events	6.45 E-20	Human papillomavirus infection	3.00 E-18	Translation	1.63 E-79
mTOR signaling pathway	2.54 E-12	Eukaryotic Translation Initiation	3.81 E-87	Spliceosome	3.97 E-11	Disease	2.32 E-63	Apoptosis - multiple species	1.98 E-12	NRAGE signals death through JNK	1.04 E-19	Apoptosis - multiple species	1.43 E-17	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	9.22 E-75
AMPK signaling pathway	5.85 E-11	Cap-dependent Translation Initiation	3.81 E-87	AMPK signaling pathway	2.67 E-10	Degradation of beta-catenin by the destruction complex	2.63 E-56	Glucagon signaling pathway	4.92 E-12	p75 NTR receptor-mediated signalling	3.43 E-19	Ribosome biogenesis in eukaryotes	3.14 E-16	3'-UTR-mediated translational regulation	9.22 E-75
Autophagy - animal	5.86 E-07	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	7.67 E-81	Autophagy - other	2.07 E-09	Signaling by Wnt	2.63 E-56	Autophagy - other	6.36 E-12	Cell death signalling via NRAGE, NRIF and NADE	5.23 E-19	Melasma	7.10 E-16	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	9.22 E-75
Neuroactive ligand-receptor interaction	1.09 E-06	3'-UTR-mediated translational regulation	2.01 E-79	p53 signaling pathway	2.23 E-09	Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex	8.42 E-54	Intestinal immune network for IgA production	5.53 E-11	Signaling by NGF	2.81 E-17	Ferroptosis	9.61 E-16	Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex	2.58 E-74
Chemical carcinogenesis	4.58 E-06	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	2.01 E-79	DNA replication	2.58 E-08	Nonsense-Mediated Decay	8.42 E-54	Thyroid cancer	5.75 E-11	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	1.81 E-15	Chronic myeloid leukemia	4.26 E-14	Nonsense-Mediated Decay	2.58 E-74

Homologous recombination	7.72E-06	Gene Expression	1.41E-77	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	7.55E-08	Influenza Life Cycle	1.12E-51	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	8.93E-11	Mitotic Prometaphase	1.12E-14	Endometrial cancer	1.00E-13	Peptide chain elongation	1.53E-72
Salmonella infection	9.17E-06	Formation of a pool of free 40S subunits	3.44E-70	Chemical carcinogenesis	1.36E-07	Peptide chain elongation	6.37E-51	Human papillomavirus infection	1.96E-10	M Phase	7.34E-14	cAMP signaling pathway	2.37E-13	Eukaryotic Translation Elongation	3.71E-72
Leishmaniasis	8.10E-05	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	4.27E-65	TGF-beta signaling pathway	2.13E-07	Influenza Infection	1.44E-50	TGF-beta signaling pathway	7.77E-10	Signal Transduction	1.07E-13	GABAergic synapse	5.39E-13	Influenza Life Cycle	1.56E-70
Nucleotide excision repair	0.000289	Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex	4.90E-64	Inflammatory bowel disease (IBD)	8.79E-07	Nonsense Mediated Decay Independent of the Exon Junction Complex	1.33E-49	Melanoma	1.13E-09	Mitotic Anaphase	1.52E-12	Rheumatoid arthritis	6.31E-13	Influenza Viral RNA Transcription and Replication	5.76E-70
Pyruvate metabolism	0.000487	Nonsense Mediated Decay	4.90E-64	Neuroactive ligand-receptor interaction	1.17E-06	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	1.44E-49	Human immunodeficiency virus 1 infection	1.54E-09	Mitotic Metaphase and Anaphase	1.73E-12	Breast cancer	1.22E-12	Viral mRNA Translation	5.76E-70
SNARE interactions in vesicular transport	0.000992	Nonsense Mediated Decay Independent of the Exon Junction Complex	4.46E-62	Ferroptosis	1.28E-06	Eukaryotic Translation Elongation	3.53E-49	Circadian rhythm	7.75E-09	Separation of Sister Chromatids	2.10E-12	Leukocyte transendothelial migration	1.89E-12	Nonsense Mediated Decay Independent of the Exon Junction Complex	1.32E-69
Thyroid cancer	0.00176	Eukaryotic Translation Elongation	1.38E-61	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	1.77E-06	Influenza Viral RNA Transcription and Replication	5.62E-49	Staphylococcus aureus infection	1.25E-08	Mitotic M-M/G1 phases	3.04E-12	Choline metabolism in cancer	2.06E-12	Eukaryotic Translation Termination	1.72E-69
Inflammatory bowel disease (IBD)	0.00176	Peptide chain elongation	6.21E-61	Staphylococcus aureus infection	1.87E-06	Viral mRNA Translation	5.62E-49	Leukocyte transendothelial migration	1.61E-08	Beta-catenin phosphorylation cascade	5.04E-11	Basal cell carcinoma	2.72E-12	Influenza Infection	2.23E-69
Glycolysis / Gluconeogenesis	0.0055	Eukaryotic Translation Termination	1.28E-59	Human papillomavirus infection	6.04E-06	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	1.45E-48	Neuroactive ligand-receptor interaction	2.98E-08	Immune System	5.79E-11	Prostate cancer	3.06E-12	Formation of a pool of free 40S subunits	1.75E-68
Human papillomavirus infection	0.00858	Influenza Viral RNA Transcription and Replication	8.36E-59	Proteoglycans in cancer	1.34E-05	Eukaryotic Translation Termination	1.54E-48	Choline metabolism in cancer	6.22E-08	Cell Cycle, Mitotic	3.11E-10	Ribosome	4.72E-12	Metabolism of mRNA	7.60E-67
Autophagy - other	0.00948	Viral mRNA Translation	8.36E-59	Chronic myeloid leukemia	1.71E-05	3' -UTR-mediated translational regulation	1.99E-48	Basal cell carcinoma	2.79E-07	CTLA4 inhibitory signaling	4.45E-10	Human T-cell leukemia virus 1 infection	1.41E-11	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	8.98E-67

Pertussis	0.0102	Influenza Infection	5.97E-58	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.10E-05	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	1.99E-48	Circadian entrainment	2.88E-07	Platelet sensitization by LDL	8.42E-10	Autophagy - other	2.09E-11	Metabolism of RNA	7.29E-64
Various types of N-glycan biosynthesis	0.0108	Influenza Life Cycle	7.69E-58	Autophagy - animal	3.27E-05	Eukaryotic Translation Initiation	5.17E-48	Ribosome biogenesis in eukaryotes	4.18E-07	Adaptive Immune System	1.85E-09	Bladder cancer	2.20E-11	Disease	8.05E-49
Gastric acid secretion	0.0139	Destabilization of mRNA by AUF1 (hnRNP D0)	8.65E-53	Adherens junction	5.93E-05	Cap-dependent Translation Initiation	5.17E-48	Gap junction	4.25E-07	ERKs are inactivated	1.06E-08	Hepatocellular carcinoma	2.79E-11	Metabolism of proteins	1.11E-38
Circadian entrainment	0.0149	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	9.23E-53	Human immunodeficiency virus 1 infection	6.96E-05	Host Interactions of HIV factors	1.69E-47	Chronic myeloid leukemia	4.59E-07	Cell Cycle	3.24E-08	Gastric cancer	3.08E-11	Gene Expression	1.23E-38
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0155	Vif-mediated degradation of APOBEC 3G	5.06E-52	Transcriptional misregulation in cancer	0.000107	Formation of a pool of free 40S subunits	2.12E-47	Autophagy - animal	4.95E-07	Oxygen-dependent Proline Hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	3.95E-08	Human immunodeficiency virus 1 infection	3.88E-11	Ribosomal scanning and start codon recognition	1.77E-31
Kaposi sarcoma - associated herpesvirus infection	0.0171	Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation	1.86E-51	Gastric acid secretion	0.000212	Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation	2.53E-47	GABAergic synapse	6.50E-07	Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis	1.29E-07	Focal adhesion	3.96E-11	Translation initiation complex formation	2.88E-31
Platelet activation	0.0217	Disease	5.61E-51	Herpes simplex virus 1 infection	0.000264	Destabilization of mRNA by AUF1 (hnRNP D0)	1.01E-46	Antifolate resistance	9.03E-07	MASTL Facilitates Mitotic Progression	2.21E-07	Thyroid cancer	5.13E-11	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	4.65E-31
Thyroid hormone signaling pathway	0.0222	Metabolism of proteins	1.03E-50	Rheumatoid arthritis	0.000368	Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase	2.43E-46	DNA replication	9.59E-07	Degradation of beta-catenin by the destruction complex	2.54E-07	Inflammatory bowel disease (IBD)	5.13E-11	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	4.35E-29
Growth hormone synthesis, secretion and action	0.0234	Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase	2.27E-50	Pathways in cancer	0.000442	Vpu mediated degradation of CD4	1.00E-45	Inflammatory bowel disease (IBD)	9.79E-07	Signaling by Wnt	2.54E-07	Regulation of actin cytoskeleton	5.24E-11	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	9.17E-17

Propanoate metabolism	0.0234	Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	3.22E-50	Melanoma	0.000455	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	1.27E-45	Progesterone-mediated oocyte maturation	1.11E-06	PP2A-mediated dephosphorylation of key metabolic factors	3.84E-07	Glucagon signaling pathway	6.57E-11	GRB2 events in EGFR signaling	1.45E-16
Cysteine and methionine metabolism	0.0309	Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	5.01E-49	Pyruvate metabolism	0.000504	SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1	1.65E-45	Rheumatoid arthritis	1.42E-06	Costimulation by the CD28 family	4.26E-07	Spliceosome	8.25E-11	SHC1 events in EGFR signaling	7.05E-16
Basal cell carcinoma	0.0313	APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	5.01E-49	Focal adhesion	0.000524	Translation	2.13E-45	Citrate cycle (TCA cycle)	1.58E-06	Mitotic Prophase	5.60E-07	Prolactin signaling pathway	1.23E-10	Mitotic Prometaphase	7.20E-16
Toxoplasmosis	0.0322	Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D1	1.91E-48	Apoptosis - multiple species	0.000566	Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	1.17E-44	Salmonella infection	1.67E-06	Cellular responses to stress	5.84E-07	DNA replication	1.29E-10	Signaling by FGFR	1.27E-15
Spliceosome	0.033	Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D	1.91E-48	Regulation of actin cytoskeleton	0.000602	Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D1	1.68E-44	Cell cycle	1.96E-06	Cellular response to hypoxia	5.84E-07	cGMP-PKG signaling pathway	5.23E-10	RAF/MAP kinase cascade	1.62E-15
N-Glycan biosynthesis	0.0338	APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins	2.33E-48	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.000635	Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D	1.68E-44	B cell receptor signaling pathway	1.96E-06	Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF) by Oxygen	5.84E-07	Longevity regulating pathway - multiple species	8.66E-10	Signaling by FGFR in disease	2.78E-15
Yersinia infection	0.0366	Regulation of mitotic cell cycle	2.33E-48	TNF signaling pathway	0.000698	APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins	2.09E-44	Longevity regulating pathway - multiple species	2.08E-06	Signaling by FGFR in disease	7.36E-07	Non-small cell lung cancer	1.01E-09	SHC1 events in ERBB2 signaling	5.57E-15
		APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	4.75E-48	Prostate cancer	0.000935	Regulation of mitotic cell cycle	2.09E-44	Herpes simplex virus 1 infection	2.37E-06	Signaling by FGFR	8.09E-07	Cell cycle	1.46E-09	SOS-mediated signalling	1.75E-14
		Vpu mediated degradation of CD4	1.14E-47	Basal cell carcinoma	0.00111	Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	1.55E-43	Endometrial cancer	2.95E-06	TRAF6 Mediated Induction of proinflammatory cytokines	1.24E-06	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	1.46E-09	GRB2 events in ERBB2 signaling	4.61E-14
		SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1	1.70E-47	Renin-angiotensin system	0.00115	APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	1.55E-43	Growth hormone synthesis, secretion and action	3.01E-06	Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation	1.24E-06	Peroxisome	3.37E-09	SHC-mediated signalling	6.37E-14

		APC/C:Cdh1 mediated degradation of Cdc20 and other APC/C:Cdh1 targeted proteins in late mitosis/early G1	2.16E-47	Leukocyte transendothelial migration	0.00165	Activation of NF-kappaB in B Cells	2.59E-43	Estrogen signaling pathway	3.26E-06	ERK/MAPK targets	1.25E-06	Staphylococcus aureus infection	4.67E-09	Signalling to p38 via RIT and RIN	6.37E-14
		ER-Phagosome pathway	5.66E-47	Central carbon metabolism in cancer	0.0017	CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex	5.33E-43	Systemic lupus erythematosus	3.73E-06	GRB2 events in EGFR signaling	1.34E-06	Antigen processing and presentation	6.31E-09	CTLA4 inhibitory signaling	9.76E-14
		CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex	8.31E-47	Cortisol synthesis and secretion	0.00196	APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	1.37E-42	Toxoplasmosis	4.56E-06	Signaling by ERBB4	1.51E-06	Th1 and Th2 cell differentiation	6.44E-09	ARMS-mediated activation	1.98E-13
		Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	3.08E-46	Intestinal immune network for IgA production	0.00209	Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	1.93E-42	Proteoglycans in cancer	4.86E-06	SHC1 events in EGFR signaling	2.17E-06	Intestinal immune network for IgA production	7.61E-09	Signaling by EGFR in Cancer	2.12E-13
		p53-Independent DNA Damage Response	3.08E-46	Notch signaling pathway	0.00213	p53-Independent DNA Damage Response	1.93E-42	Leishmaniasis	6.64E-06	Late Phase of HIV Life Cycle	2.28E-06	Transcriptional misregulation in cancer	8.57E-09	M Phase	2.16E-13
		p53-Independent G1/S DNA damage checkpoint	3.08E-46	Necroptosis	0.00265	p53-Independent G1/S DNA damage checkpoint	1.93E-42	Gastric cancer	6.64E-06	GRB2 events in ERBB2 signaling	2.50E-06	Notch signaling pathway	1.13E-08	Signalling by NGF	2.37E-13
		Autodegradation of Cdh1 by Cdh1:APC/C	3.88E-46	Osteoclast differentiation	0.00275	APC/C:Cdh1 mediated degradation of Cdc20 and other APC/C:Cdh1 targeted proteins in late mitosis/early G1	5.23E-42	Th1 and Th2 cell differentiation	6.70E-06	Host Interactions of HIV factors	2.57E-06	TGF-beta signaling pathway	1.58E-08	Costimulation by the CD28 family	4.17E-13
		Ribosomal scanning and start codon recognition	4.14E-46	SNARE interactions in vesicular transport	0.00293	p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint	6.87E-42	cAMP signaling pathway	6.84E-06	MAP kinase activation in TLR cascade	3.04E-06	Acute myeloid leukemia	1.67E-08	Signaling by Interleukins	4.30E-13
		Translation initiation complex formation	9.36E-46	Thyroid hormone signaling pathway	0.00318	p53-Dependent G1 DNA Damage Response	6.87E-42	Bladder cancer	1.70E-05	GPVI-mediated activation cascade	3.15E-06	Herpes simplex virus 1 infection	2.09E-08	IRS-mediated signalling	5.49E-13
		Autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1	1.42E-45	Hepatitis B	0.00321	Regulation of Apoptosis	6.87E-42	Notch signaling pathway	1.79E-05	Spry regulation of FGF signaling	3.40E-06	Renin-angiotensin system	2.21E-08	Signaling by ERBB4	6.66E-13

		<i>Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S</i>	2.0 8E-45	<i>Cushing syndrome</i>	0.00 378	<i>Autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1</i>	8.1 1E-42	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	1.9 0E-05	<i>Nuclear Events (kinase and transcription factor activation)</i>	3.4 5E-06	<i>Proteoglycans in cancer</i>	2.6 3E-08	<i>Signalling to RAS</i>	7.17 E-13
		<i>Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)</i>	4.0 0E-45	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	0.00 38	<i>Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)</i>	2.3 3E-41	<i>Focal adhesion</i>	2.0 5E-05	<i>SHC1 events in ERBB2 signaling</i>	4.6 7E-06	<i>Circadian rhythm</i>	3.2 8E-08	<i>Signaling by EGFR</i>	1.01 E-12