



## **VALOR DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TERAPÉUTICO DEL RECEPTOR LRP1 EN ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

**Concepción Vicenta Llorente Cortés**

CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

## 1. Resumen

La acumulación arterial y miocárdica de lípidos provoca alteraciones cardiovasculares, pero a pesar de ello estos procesos no están siendo clínicamente tratados. La acumulación de lípidos se produce principalmente por la captación de lipoproteínas aterogénicas mediante el receptor LRP1. Nuestro grupo ha identificado un péptido en el receptor LRP1, el péptido P3 del dominio CR9, que solo interacciona con lipoproteínas aterogénicas. Nuestra hipótesis es que el bloqueo del dominio CR9 mediante los anticuerpos anti-P3 (Anti-P3 Abs) o el secuestro de las lipoproteínas aterogénicas mediante los péptidos basados en la secuencia P3, inhiben específicamente la acumulación arterial y miocárdica de lípidos. La acumulación de lípidos promueve la liberación de una forma soluble del receptor LRP1, el sLRP1. Los niveles circulantes de sLRP1 podrían reflejar la acumulación vascular y miocárdica de lípidos. Los objetivos de este proyecto son determinar los efectos de los anticuerpos anti-P3 y los péptidos derivados de P3 en las alteraciones cardiovasculares de un modelo animal, y evaluar el valor diagnóstico y pronóstico de los niveles circulantes de sLRP1 en poblaciones de pacientes en los que se ha caracterizado el contenido de lípido vascular y miocárdico. Grupos de conejos inmunizados con P3, tratados con el péptido P3 estabilizado y controles se alimentarán con una dieta alta en grasa. Se obtendrán muestras de sangre regularmente para determinar parámetros lipídicos y metabólicos. Las muestras de aorta, corazón, hígado y músculo esquelético se someterán a análisis molecular e inmunohistoquímico. La aterosclerosis y la función ventricular se evaluarán a través de análisis de imagen y ecocardiografía. Se utilizarán diferentes técnicas moleculares para caracterizar los lípidos, la actividad procoagulante vascular y el manejo cardíaco del calcio. Las concentraciones en plasma del receptor sLRP1 se determinarán mediante ELISA. El valor diagnóstico de los niveles de sLRP1 se evaluará en pacientes con placas ateroscleróticas caracterizadas por tomografía computarizada y en pacientes con lípido miocárdico caracterizado por resonancia magnética nuclear. El valor pronóstico del receptor sLRP1 se evaluará con un seguimiento clínico de tres años.

Esperamos desarrollar moléculas basadas en P3 con eficacia terapéutica probada en modelo *in vivo* y validar el receptor sLRP1 como nuevo biomarcador diagnóstico y pronóstico en enfermedad cardiovascular.

## 2. Resultados

### Herramientas terapéuticas innovadoras basadas en el receptor LRP1

#### Los anticuerpos frente al péptido P3 (del dominio CR9 del receptor LRP1) muestran una elevada eficacia para inhibir la aterosclerosis inducida por dieta en el modelo de conejo

**Resumen.** En el modelo de conejo hemos mostrado una reducción significativa de dos marcadores subrogados: la captación de [<sup>18</sup>F]-FDG por las células vasculares en aorta y el índice de resistencia arterial (IRA) de las carótidas de aterosclerosis, en los conejos inmunizados con el péptido P3. Los estudios inmunohistoquímicos, confocales y moleculares demostraron que la inmunización con P3 inhibe la formación de las primeras fases de la arteriosclerosis (estrías grasas) debido a la gran eficiencia de los anticuerpos anti-P3 para inhibir la formación de células espumosas y la señalización proinflamatoria asociada. La señalización alterada en estas células está involucrada en el reclutamiento de monocitos y la inducción de la migración de las células musculares lisas de la media a la íntima arterial.

#### Resultados específicos

La inmunización con el péptido P3 induce de forma eficiente la producción de anticuerpos anti-P3 en los conejos. Los análisis de ELISA mostraron que los anticuerpos anti-P3 están ausentes en el suero de los animales controles a lo largo de todo el período de inmunización, mientras que aumentaron de forma intensa y prolongada en el tiempo en el suero de los animales inmunizados con P3.

Los anticuerpos anti-P3 inhiben la aterosclerosis inducida por dieta grasa en conejos.

La dieta grasa provoca que una gran parte de la superficie de la aorta esté ocupada por lesiones ateroscleróticas. Sin embargo, esto no sucede en el grupo de animales inmunizados con el péptido P3 a pesar de haber sido alimentados con dieta grasa. La reducción en la extensión de aterosclerosis por los anticuerpos anti-P3 va acompañada de una disminución de la acumulación de lípidos, macrófagos y células musculares lisas en la íntima arterial de la pared vascular.

Los anticuerpos anti-P3 reducen la acumulación de colesterol y la inducción de señales proinflamatorias en la aorta de los conejos inmunizados con el péptido P3 sin disminuir los niveles de lípidos en sangre o mejorar el perfil de lipoproteínas. Los análisis bioquímicos del suero evidenciaron que la inmunización con P3 no altera los niveles plasmáticos de lípidos o el perfil de lipoproteínas y que, en el suero de este modelo animal, el colesterol se transporta mayoritariamente en las lipoproteínas VLDL y LDL, tal como sucede en los seres humanos. La dieta grasa produjo un gran incremento en los niveles de colesterol transportados por estas lipoproteínas, lo que causó un gran impacto a su vez en la acumulación de colesterol en la aorta. Sin embargo, en los conejos inmunizados con P3, aunque la dieta grasa causó el mismo incremento de colesterol en las lipoproteínas VLDL y LDL, los anticuerpos anti-P3 bloquearon casi por completo el impacto de dichas lipoproteínas sobre los niveles de colesterol de la aorta. Asimismo los estudios moleculares combinados con estudios de microscopía confocal evidenciaron que la inmunización con P3 frena el efecto proinflamatorio de la dieta sobre la pared vascular, tal y como indica el descenso en la activación de los marcadores de inflamación TNFR1 (del inglés *tumor necrosis factor receptor*) y NF- $\kappa$ B (del inglés *nuclear factor kappa beta*) (p65). Nuestros resultados demuestran que la ruptura de la interacción de las lipoproteínas aterogénicas (VLDL y LDL) con el receptor LRP1 celular por los anticuerpos anti-P3 frenan la aterosclerosis al interrumpir la acumulación intracelular de colesterol y la señalización proinflamatoria asociada.

El suero de los conejos inmunizados con P3, a pesar de contener la misma cantidad de lipoproteínas aterogénicas que el suero control, no produce acumulación intracelular de colesterol esterificado ni tampoco activación de señales proinflamatorias en células vasculares humanas (macrófagos o células musculares lisas de la pared vascular). La exposición de células vasculares a suero procedente de conejos alimentados con dieta grasa (1%, 2 horas) causa una elevada acumulación intracelular de colesterol esterificado, así como la activación de vías de señalización proinflamatoria en macrófagos humanos (hM $\Phi$ ) y células musculares lisas de coronaria humana (hcVSMC). Sin embargo, los sueros que contienen anticuerpos anti-P3, a pesar de tener el mismo perfil de lipoproteínas VLDL y LDL, no causan estos efectos proaterogénicos en las células vasculares humanas. Estos resultados indican que los anticuerpos anti-P3 son altamente efectivos en el bloqueo de la interacción de estas lipoproteínas con los receptores LRP1 celulares, bloqueando la formación de células

espumosas y la señalización intracelular proinflamatoria, tanto en células de conejo como humanas.

Los estudios de imagen PET/CT demuestran que los anticuerpos anti-P3 reducen la captación de [<sup>18</sup>F]-FDG por la aorta de conejos alimentados con dieta grasa. Las imágenes metabólicas de tomografía de emisión de positrones y tomografía computarizada (PET-CT) realizadas en la plataforma preclínica del Hospital Vall d'Hebron mostraron que la dieta grasa aumentó significativamente el índice de captación de glucosa estándar SUV (del inglés *standardized uptake value*) en las regiones superior y media de la aorta de los conejos controles. En cambio, en los conejos inmunizados con P3, la dieta grasa solo indujo levemente los valores SUV en estas regiones aórticas. El alto impacto de los anticuerpos anti-P3 en la captación de glucosa en los estudios de imagen confirman el resto de resultados moleculares, confocales e inmunohistoquímicos, validando la gran eficacia antiinflamatoria de los anticuerpos anti-P3 en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular expuestas a altas concentraciones de lipoproteínas proinflamatorias.

La ecografía Doppler revela que los anticuerpos anti-P3 bloquean el aumento del índice de resistencia arterial (IRA) inducido por la dieta grasa en las carótidas de los conejos. La dieta grasa aumentó el índice de resistencia arterial (IRA) en las arterias carótidas externas e internas de los conejos controles. Sin embargo, la dieta grasa indujo levemente el IRA, y solo en la arteria carótida interna, en los conejos inmunizados con P3. Al igual que en la aorta, la dieta grasa también indujo drásticamente la acumulación de colesterol en las carótidas de los conejos controles y los anticuerpos anti-P3 redujeron eficientemente dicha acumulación en la arteria carótida externa.

**Los péptidos estabilizados derivados de P3 (DP3) inhiben eficientemente el proceso de agregación de las LDL por las enzimas lipolíticas presentes en la íntima arterial**

**Resumen.** Utilizando una gran variedad de experimentos bioquímicos, biofísicos y moleculares, hemos demostrado que la versión original de los péptidos P3 (LP3) y su versión retroenantiomérica (DP3), pero no un péptido irrelevante (IP321), bloquean eficientemente la agregación de LDL inducida por las enzimas lipolíticas esfingomielinasa (SMase) y fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>), presentes en la íntima arterial.

Aunque los péptidos LP3 y DP3 inhiben eficientemente las alteraciones en el tamaño de las partículas de LDL, la carga y la pérdida de esfingomielina (SM) en las LDL inducidas por SMase, no pueden impedir las alteraciones inducidas en los mismos parámetros de la LDL por la enzima PLA<sub>2</sub>. Sin embargo, ambos péptidos son capaces de proteger la apolipoproteína B-100 (ApoB-100) frente a las alteraciones conformacionales inducidas por estas enzimas. Los estudios proteómicos, de modelado *ab initio* y los de dinámica molecular han mostrado que estos péptidos son capaces de establecer interacciones electrostáticas estables con secuencias básicas de la ApoB-100, estabilizando así la conformación de la ApoB-100, incluso en condiciones de fosfolipólisis extrema. La preservación conformacional de la ApoB-100 garantiza una alta protección de la LDL frente a la agregación inducida por fosfolipólisis.

### **Resultados específicos**

El péptido DP3, la versión retroenantiomérica de P3, muestra una mayor estabilidad que el péptido original P3 (LP3) en suero humano. La versión retroenantiomérica del péptido se sintetizó usando D-aminoácidos y por ello la secuencia no es reconocida por las proteasas séricas, haciendo que la vida media del péptido se alargue de forma considerable.

Los péptidos LP3 y DP3 bloquean el incremento de la turbidimetría de la LDL inducido por las enzimas SMase y PLA<sub>2</sub> de manera dosis y tiempo dependiente. La turbidimetría de LDL inducida por SMase y PLA<sub>2</sub> reflejó el grado de agregación de las LDL y se inhibió casi por completo (más de un 80%) en presencia de estos péptidos.

Los péptidos LP3 y DP3 disminuyen el porcentaje de partículas LDL agregadas inducidas por las enzimas SMase y PLA<sub>2</sub>. Los experimentos de microscopía electrónica revelaron una reducción en el porcentaje de partículas de LDL agregadas cuando LDL se modificó en presencia de los péptidos LP3 y DP3.

Los péptidos LP3 y DP3 bloquean las alteraciones en la composición de los fosfolípidos de la LDL inducidas por la enzima SMase pero no las inducidas por PLA<sub>2</sub>. La cromatografía HPTLC se utilizó para separar los fosfolípidos (PL) que componen las LDL. Este procedimiento reveló que los fosfolípidos (PL) principales en las LDL eran L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -PC) y esfingomielina (SM). La SM se degradó por completo de las LDL tratadas con SMase. Por el contrario, en presencia de LP3 y DP3, la SM no se

degradó por SMase. La PLA<sub>2</sub> eliminó por completo la fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -PC) de las LDL, conduciendo a un fuerte aumento en el contenido de L- $\alpha$ -LysoPC en las LDL. Los péptidos no fueron eficientes para inhibir los efectos de la PLA<sub>2</sub> sobre la LDL.

Los péptidos LP3 y DP3 bloquean las alteraciones en el perfil electroforético de LDL inducidas por SMase, pero no las inducidas por PLA<sub>2</sub>. Los análisis de electroforesis en gel de gradiente (GGE) mostraron que la SMase causó una fuerte pérdida de la banda correspondiente a la LDL. Esto se debe a que el tamaño de poro de los geles GGE impide la entrada de los agregados de LDL más grandes. La pérdida de banda inducida por SMase fue contrarrestada eficientemente por LP3 y DP3. En contraste, estos péptidos no tuvieron ningún efecto sobre el patrón GGE inducido por el tratamiento de LDL con PLA<sub>2</sub>.

El péptido DP3 bloquea los cambios conformacionales de la ApoB-100 inducidos por las enzimas SMase y PLA<sub>2</sub>. Los análisis de la apolipoproteína presente en la LDL, la ApoB-100, por Western blot permitieron determinar las modificaciones conformacionales de la ApoB-100 producidas por el tratamiento fosfolipolítico. Tanto la SMase como la PLA<sub>2</sub> aumentaron la exposición de los epítomos reactivos de ApoB-100 a los anticuerpos anti-ApoB-100 y los péptidos LP3 y DP3 protegieron a la ApoB-100 de los cambios conformacionales inducidos por estas enzimas.

Los péptidos LP3 y DP3 interactúan electrostáticamente con secuencias específicas de la ApoB-100 enriquecidas en lisinas. La proteólisis limitada de la apolipoproteína ApoB-100 combinada con la proteómica basada en espectrometría de masas (LC-MS/MS) evidenció que el péptido DP3 protege secuencias específicas de la ApoB-100, ya sea por interacción directa o por remodelado de la estructura proteica. La alta coincidencia entre las secuencias protegidas por DP3 y las protegidas por agregación indica que la mayoría de las secuencias protegidas por DP3 participan en la agregación de LDL, lo que explica la alta eficiencia de los péptidos derivados de LRP1 para prevenir la agregación de LDL. Se realizó un experimento de acoplamiento de cuerpo rígido basado en energía entre la proteína ApoB-100 y las estructuras de péptido DP3 previamente modeladas por métodos *ab initio*. Curiosamente, descubrimos que una de las posiciones de menor energía de las simulaciones de acoplamiento acomodaba DP3 en una orientación tal que los residuos Lys3228, Lys3231 y Lys3233 (pero no Lys3226 ni

Lys3236) de la ApoB-100 quedaron profundamente enterrados tras la unión del péptido.

### **La preservación de bajos niveles del receptor LRP1 en los cardiomiocitos favorece una mejora de la sensibilidad a la insulina y una menor tendencia a la obesidad**

**Resumen.** Nuestro grupo ha desarrollado un modelo de ratón con inducción condicional y específica de deficiencia del receptor LRP1 en los cardiomiocitos que ha sido esencial para demostrar que LRP1 es capaz de regular los niveles circulantes del péptido natriurético ANP y que, a través de este mecanismo, modula la señalización del receptor del ANP, NPRA, y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado. En este modelo también hemos demostrado que esta vía señalización de NPRA está acoplada a la activación de la enzima AMPK, clave para una adecuada integración del metabolismo lipídico y glucídico.

La deficiencia del receptor LRP1 en los cardiomiocitos favorece una mayor sensibilidad a la insulina y una menor tendencia a la obesidad al favorecer una mayor oxidación de ácidos grasos en el hígado y un mayor gasto energético. Nuestros estudios evidenciaron que el peso corporal de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> fue menor que el de los controles en todos los tiempos de crecimiento testados. Si bien el contenido de triglicéridos (TG) y ácidos grasos (FA) fue inferior en el hígado de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>, no se hallaron diferencias en el contenido de lípido del corazón o del músculo esquelético entre los grupos. También se observó que en comparación con los ratones controles, los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> tenían menor intolerancia a la glucosa y menor área bajo la curva (AUC) en el test de tolerancia a la glucosa. El índice de glucosa, insulina y resistencia a la insulina (IR) (HOMA-IR) también se redujo en *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones controles. Los experimentos realizados en el Sistema de Monitorización de Animales de Laboratorio (CLAMS) evidenciaron que los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> tenían un mayor consumo de O<sub>2</sub> y un mayor gasto energético que los ratones controles durante las fases de luz y oscuridad.

Los cardiomiocitos con deficiencia de LRP1 muestran una mayor actividad de la enzima corina, que favorece una mayor liberación cardíaca del péptido natriurético ANP (del inglés *atrial natriuretic peptide*) al torrente sanguíneo. Para identificar las proteínas

cardíacas potencialmente involucradas en el fenotipo metabólico favorable de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>, realizamos un análisis proteómico diferencial entre los corazones procedentes del grupo deficiente respecto al grupo control. La disminución en los niveles de ANP del corazón de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> se validó por Western blot, sugiriendo una mayor liberación de ANP al torrente sanguíneo. Los estudios de inmunoprecipitación evidenciaron que en el corazón, corina (enzima responsable del procesado y liberación de ANP) forma complejos con inhibidores de proteasas, tales como las serpinas. El número de complejos corina/serpina fue superior en el corazón de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>. La unión de serpina a corina crea impedimentos estéricos a la unión de inhibidores efectivos y ello permite prolongados tiempos de activación de corina. Este mecanismo conlleva que los niveles circulantes de ANP sean superiores en los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>.

La activación de la señalización de ANP-NPRA está vinculada a la activación de AMPK y al aumento de la oxidación de FA en el hígado de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>. Se analizaron los niveles de mediadores cruciales para la señalización del receptor de ANP, el NPRA (del inglés *natriuretic peptide receptor A*), tales como cGMP (del inglés *cyclic Guanosine MonoPhosphate*) y VASP (del inglés *VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein*) en tejidos periféricos, incluidos el hígado, el músculo esquelético y el corazón. Se observaron niveles aumentados de cGMP y pVASP en el hígado y el músculo esquelético de ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> respecto a controles. Este incremento en los mediadores de señalización del NPRA se anuló cuando los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> fueron tratados con un inhibidor de la señalización del NPRA, el A71915. La señalización incrementada de cGMP/pVASP se asoció a un aumento de la fosforilación de AMPK (del inglés *AMP-induced Kinase*) en el hígado, pero no en el músculo esquelético. La activación hepática de AMPK se confirmó por el aumento de la fosforilación de ACC (del inglés *Acetil-CoA Carboxilase*), la enzima *downstream* de la vía que es fosforilada por pAMPK. Para explorar el impacto potencial de la activación de pAMPK en la oxidación de ácidos grasos, se estudiaron los niveles de la enzima CPT1 (del inglés *Carnitine PalmitoylTransferase I*), una enzima mitocondrial clave para la oxidación de ácidos grasos, y de los componentes principales del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), responsable de la respiración mitocondrial, además de los niveles de UCP3 (del inglés *mitochondrial UnCoupling Protein*), un indicador de la respuesta mitocondrial a un mayor aporte de ácidos grasos; todos ellos fueron analizados mediante la técnica de Western blot. Se hallaron niveles aumentados de estos mediadores de la oxidación

de los ácidos grasos en el hígado de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>. El tratamiento de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> con el antagonista de NPRA inhibió el incremento estos mediadores, indicando que esta vía de oxidación es dependiente de la activación del receptor NPRA por el ANP.

La señalización activada del receptor NPRA está asociada a un incremento en la capacidad de captación de ácidos grasos en el hígado. Los experimentos de biodistribución de ácidos grasos (OFG, del inglés *oral fat gavage*) mostraron un aumento en la absorción de [<sup>3</sup>H]-TG y [<sup>3</sup>H]-FFA por el hígado de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> que se bloqueó en el grupo de ratones tratados con el antagonista de NPRA, el A71915. A diferencia del hígado, se produjo una menor captación de [<sup>3</sup>H]-TG y [<sup>3</sup>H]-FFA por el tejido adiposo blanco de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>. El tratamiento con el inhibidor del receptor NPRA igualó el peso y tamaño de los adipocitos de tejido adiposo blanco entre ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> y *cm-Lrp1*<sup>+/+</sup>. Los experimentos realizados en el Sistema de Monitorización de Animales de Laboratorio (CLAMS) mostraron que el tratamiento de ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> con el antagonista A71915 inhibe el incremento de la oxidación lipídica observado durante el día y el aumento de la oxidación de glucosa observado durante la noche. No hubo diferencias en el consumo de oxígeno y el gasto de energía entre los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> y los ratones controles tratados con los antagonistas de NPRA. Estos resultados evidenciaron claramente que la señalización del ANP subyace al aumento de la capacidad del hígado de los ratones *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> para captar y oxidar ácidos grasos y que, a través de este mecanismo, se puede controlar el metabolismo general del organismo.

## **NUEVAS HERRAMIENTAS ÓMICAS DE DIAGNÓSTICO EN ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

**El receptor LRP1 circulante (sLRP1) es un biomarcador de riesgo cardiovascular.** En colaboración con el Grupo de Epidemiología Cardiovascular y Genética del IMIM (Dr. Marrugat y Dr. Elosua), nuestro grupo demostró que los niveles circulantes del receptor LRP1 (sLRP1) predicen futuros eventos cardíacos en la población REGICOR (Registro de Girona de Corazón). El aumento de una unidad en los niveles circulantes del receptor sLRP1 se traduce en un aumento del 40% en el riesgo cardiovascular. Los niveles circulantes del receptor sLRP1 se asocian con riesgo de infarto agudo de miocardio de forma independiente de otros factores de riesgo

cardiovascular. Esto se debe a que este biomarcador refleja mecanismos locales dependientes de este receptor.

**El receptor LRP1 circulante (sLRP1) es un biomarcador de extensión de grasa epicárdica en población general y en población de diabéticos tipo 1.** Los estudios moleculares realizados con las muestras de plasma de los pacientes, combinados con estudios de tomografía computarizada multidetección en la Unidad de Imagen Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (población general), así como en pacientes tratados en la Unidad de Endocrinología del mismo hospital (diabéticos tipo 1), demostraron que el receptor sLRP1 refleja la extensión de la grasa epicárdica en distintas poblaciones de pacientes.

**Los microRNA (miRNA) son nuevos biomarcadores de aterosclerosis subclínica y extensión de grasa epicárdica.** Los estudios moleculares realizados con muestras del plasma de pacientes a los que se realizaron estudios de tomografía computarizada multidetección en la Unidad de Imagen Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, nos permitió identificar nuevos biomarcadores ómicos en plasma que reflejan la aterosclerosis subclínica y la extensión de grasa epicárdica.

**Los microRNA (miRNA) son nuevos biomarcadores de acumulación intramiocárdica de lípidos.** Los estudios moleculares realizados con muestras de plasma de los pacientes a los que se realizó la determinación de lípidos intramiocárdicos y remodelado cardíaco mediante resonancia magnética en el contexto del estudio internacional PIRAMID (Pioglitazone Influence on tRiglyceride Accumulation in the Myocardium In Diabetes), nos permitió identificar nuevos biomarcadores circulantes de acumulación lipídica intramiocárdica gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Hildo Lamb (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands).

### **3. Relevancia y posibles implicaciones futuras**

Gran parte de los resultados del presente proyecto han sido obtenidos a través de la colaboración entre nuestro grupo básico y grupos clínicos atraídos por el potencial impacto clínico y traslacional de nuestra investigación. Cabe señalar nuestra activa colaboración con el Dr. Bayes Genis, director del Instituto de Cardiología y del

Departamento de Cardiología del Hospital Germans Trias i Pujol. También ha sido altamente productiva nuestra estrecha colaboración con la Unidad de Imagen Cardíaca (Dr. Carreras, Dr. Leta y Dr. Vilades) y con la Unidad de Endocrinología (Dr. Pérez y Dr. Gil) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Por último, debemos destacar la relevancia de los resultados obtenidos gracias a la colaboración con el grupo de Epidemiología Cardiovascular del IMIM (Dr. Elosua y Dr. Marrugat) y con clínicos especialistas en medicina nuclear (Dr. Castell) del Hospital Universitari Vall d'Hebron. La activa participación de los clínicos en este proyecto ha contribuido a la alta traslacionalidad de los resultados obtenidos.

Los principales avances fruto de este proyecto son: 1) nuevas herramientas terapéuticas (anticuerpos y péptidos) para modular específicamente la función patológica de LRP1 sin alterar sus funciones esenciales, útiles en arteriosclerosis y probablemente en otras enfermedades en las que la acumulación tisular de colesterol es determinante en la progresión de la enfermedad; 2) nuevos modelos *in vivo*, tales como un modelo murino de deficiencia específica y condicional de LRP1 en cardiomiocitos y un nuevo modelo de conejo con inmunización protectora frente a arteriosclerosis; 3) evidencias *in vivo* de un nuevo eje corazón-hígado controlado por los niveles del receptor LRP1 en los cardiomiocitos que determina la señalización del ANP en hígado, favoreciendo una mayor captación y oxidación de los ácidos grasos por el hígado; 4) nuevos biomarcadores de remodelado cardíaco, y 5) nuevos biomarcadores ómicos y proteicos con valor predictivo de riesgo coronario en población general, y estrechamente asociados con aterosclerosis subclínica y extensión de grasa epicárdica.

La alta productividad, calidad y traslacionalidad de las publicaciones obtenidas por la investigación desarrollada otorgan a este proyecto un papel clave en la evolución de nuestras líneas de investigación hacia la clínica, ya que proporcionan nuevas herramientas para intervenir en nuevos mecanismos cruciales subyacentes a la aterosclerosis, las cardiopatías isquémicas, diabéticas y dilatadas, patologías de prevalencia creciente en las sociedades occidentales. Cabe reseñar también que este proyecto ha situado a nuestro grupo en una posición favorable para generar nuevos recursos económicos, tanto de agencias públicas como privadas.

Para seguir avanzando a partir de los resultados del proyecto 201521-10 de la Fundació La Marató de TV3, nos proponemos llevar a cabo los siguientes desarrollos experimentales a corto-medio plazo: 1) purificar los anticuerpos anti-P3 y validar su eficacia antiaterosclerótica en modelos preclínicos (PCSK9 *mini-pigs*) de arteriosclerosis; 2) utilizar los anticuerpos purificados como nueva herramienta para la detección de los péptidos terapéuticos en nuevos estudios de biodistribución y eficacia de los péptidos, previstos en modelos preclínicos; 3) comparar la eficacia de los anticuerpos y péptidos desarrollados en el actual proyecto con los fármacos hipolipemiantes normalmente utilizados en la práctica clínica, así como determinar si nuestras nuevas herramientas terapéuticas funcionan de forma complementaria a las habituales. Per progresar en el estudio de los biomarcadores de matriz extracelular realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Samouillan (Toulouse University), se ha previsto validar los nuevos biomarcadores identificados en modelo porcino en ventrículos humanos obtenidos de autopsias y corazones explantados. Nuestra colaboración con los servicios de Anatomía Patológica y de Cardiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau permite que estas muestras estén ya disponibles para analizar el potencial de estos nuevos biomarcadores en muestras humanas. En colaboración con el Dr. Laurent Duca analizaremos el papel de la degradación de la elastina y, en particular, de los péptidos derivados de la elastina, en la generación de células espumosas en modelos *in vitro* e *in vivo*. Para validar los nuevos biomarcadores ómicos y proteómicos identificados, hemos establecido nuevas colaboraciones con clínicos con disponibilidad de muestras de pacientes muy bien caracterizados desde el punto de vista cardiovascular y metabólico. Ya hemos iniciado colaboraciones con el Dr. González Juanatey (Servicio de Cardiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago), con el Dr. Masana (Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus) y con el Dr. Guerra (Departamento de Cardiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).

#### **4. Bibliografía científica generada**

Olga Bornachea, Aleyda Benitez-Amaro, Angela Veá, Laura Nasarre, David de Gonzalo-Calvo, Juan Carlos Escola-Gil, Lidia Cedo, Antoni Iborra, Laura Martínez-Martínez, Candido Juarez, Juan Antonio Camara, Carina Espinet, Maria Borrell-Pages, Lina Badimon, Joan Castell, Vicenta Llorente-Cortés.

*Immunization with the Gly<sup>1127</sup>-Cys<sup>1140</sup> amino acid sequence of the LRP1 receptor reduces atherosclerosis in rabbits. Molecular, immunohistochemical and nuclear imaging studies.*

Theranostics 2020; 10: 3263-3280. IF:8.712

Aleyda Benitez-Amaro, Elena Revuelta-López, Olga Bornachea, Lidia Cedo, Àngela Veà, Laura Herrero, Nuria Roglans, Carolina Soler-Botija, David de Gonzalo-Calvo, Laura Nasarre, Sandra Camino-López, Eugenia Mato, Francisco Blanco-Vaca, Antoni Bayes-Genis, David Sebastian, Joan Carles Laguna, Dolors Serra, Antonio Zorzano, Joan Carles Escola-Gil, Vicenta Llorente-Cortes.

*Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 deficiency in cardiomyocytes reduces susceptibility to insulin resistance and obesity.*

Metabolism. 2020 Feb 26:154191. IF: 5.963

Aleyda Benitez-Amaro, Chiara Pallara, Laura Nasarre, Andrea Rivas-Urbina, Sonia Benitez, Angela Veà, Olga Bornachea, David de Gonzalo-Calvo, Gabriel Serra-Mir, Sandra Villegas, Roger Prades, Jose Luis Sanchez-Quesada, Cristina Chiva, Eduard Sabido, Teresa Tarrago, Vicenta Llorente-Cortes.

*Molecular basis for the protective effects of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1)-derived peptides against LDL aggregation.*

BBA - Biomembranes 2019; 1861: 1302–1316. IF: 3.790

Virginia Actis Dato; Aleyda Benitez-Amaro; David de Gonzalo-Calvo; Maximiliano Vazquez; Gustavo Bonacci; Vicenta Llorente Cortés; Gustavo A. Chiabrando.

*LRP1-mediated aggLDL endocytosis promotes cholesteryl ester accumulation and impairs insulin response in cardiomyocytes.*

Cells 2020 10;9(1). pii: E182. IF: 5.656

Benitez-Amaro A, Samouillan V, Jorge E, Dandurand J, Nasarre L, de Gonzalo-Calvo D, Bornachea O, Amoros-Figueras G, Lacabanne C, Vilades D, Leta R, Carreras F, Gallardo A, Lerma E, Cinca J, Guerra JM, Llorente-Cortés V.

*Identification of new biophysical markers for pathological ventricular remodelling in tachycardia-induced dilated cardiomyopathy.*

J Cell Mol Med. 2018; 22: 4197-4208. IF: 4.658

Bornachea O, Vea A, Llorente-Cortes V.

*Interplay between epicardial adipose tissue, metabolic and cardiovascular diseases.*

Clin Investig Arterioscler. 2018;30(5):230-239. doi: 10.1016/j.arteri.2018.03.003.

Roura S, Gálvez-Montón C, de Gonzalo-Calvo D, Valero AG, Gastelurrutia P, Revuelta-López E, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llucìa-Valldeperas A, Perea-Gil I, Iborra-Egea O, Borràs FE, Lupón J, Llorente-Cortés V, Bayes-Genis A.

*Extracellular vesicles do not contribute to higher circulating levels of soluble LRP1 in idiopathic dilated cardiomyopathy.*

J Cell Mol Med. 2017; 21: 3000-3009. IF: 4.658

Revuelta-López E, Soler-Botija C, Nasarre L, Benitez-Amaro A, de Gonzalo-Calvo D, Bayes-Genis A, Llorente-Cortés V.

*Relationship among LRP1 expression, Pyk2 phosphorylation and MMP-9 activation in left ventricular remodelling after myocardial infarction.*

J Cell Mol Med. 2017 ;21:1915-1928. IF: 4.658

Samouillan V Revuelta-Lopez E, Soler-Botija C, Dandurand J, Benitez-Amaro A, Nasarre L, de Gonzalo-Calvo D, Bayes-Genis A, Lacabanne C., Llorente-Cortés V.

*Conformational and thermal characterization of left ventricle remodeling post-myocardial infarction.*

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2017; 1863: 1500-1509. IF: 4.441

De Gonzalo-Calvo D, Elosua R, Vea A, Subirana I, Sayols-Baixeras S, Marrugat J, Llorente-Cortés V.

*Soluble low-density lipoprotein receptor-related protein 1 as a biomarker of coronary risk: Predictive capacity and association with clinical events.*

Atherosclerosis. 2019;287:93-99. IF: 4.239

De Gonzalo-Calvo D, Colom C, Vilades D, Rivas-Urbina A, Moustafa AH, Pérez-Cuellar M, Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Llorente-Cortes V.

*Soluble LRP1 is an independent biomarker of epicardial fat volume in patients with type 1 diabetes mellitus.*

Sci Rep. 2018; 8: 1054. IF: 4.122

De Gonzalo-Calvo D, Vilades D, Nasarre L, Carreras F, Leta R, Garcia-Moll X, Llorente-Cortes V.

*Circulating levels of soluble low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (sLRP1) as novel biomarker of epicardial adipose tissue.*

Int J Cardiol. 2016; 223: 71-373. IF: 4.034

De Gonzalo-Calvo D, Vilades D, Martínez-Cambor P, Veà À, Ferrero-Gregori A, Nasarre L, Bornachea O, Sanchez Vega J, Leta R, Puig N, Benítez S, Sanchez-Quesada JL, Carreras F, Llorente-Cortés V.

*Plasma microRNA Profiling Reveals Novel Biomarkers of Epicardial Adipose Tissue: A Multidetector Computed Tomography Study.*

J Clin Med. 2019; 8. pii: E780. IF: 5.583

De Gonzalo-Calvo D, Vilades D, Martínez-Cambor P, Veà À, Nasarre L, Sanchez Vega J, Leta R, Carreras F, Llorente-Cortés V.

*Circulating microRNAs in suspected stable coronary artery disease: A coronary computed tomography angiography study.*

J Intern Med. 2019 May 29. doi: 10.1111/joim.12921. IF: 6.051

De Gonzalo-Calvo D, Cenarro A, Garlaschelli K, Pellegatta F, Vilades D, Nasarre L, Camino-Lopez S, Crespo J, Carreras F, Leta R, Catapano AL, Norata GD, Civeira F, Llorente-Cortes V.

*Translating the microRNA signature of microvesicles derived from human coronary artery smooth muscle cells in patients with familial hypercholesterolemia and coronary artery disease.*

J Mol Cell Cardiol. 2017; 106: 55-67. IF: 5.055

De Gonzalo-Calvo D, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Smit JW, Revuelta-Lopez E, Nasarre L, Escola-Gil JC, Lamb HJ, Llorente-Cortes V.

*Serum microRNA-1 and microRNA-133a levels reflect myocardial steatosis in uncomplicated type 2 diabetes.*

Sci Rep. 2017;7:47. IF: 4.122

De Gonzalo-Calvo D, Kenneweg F, Bang C, Toro R, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Smit JW, Lamb HJ, Llorente-Cortes V, Thum T.

*Circulating Long Noncoding RNAs in Personalized Medicine: Response to Pioglitazone Therapy in Type 2 Diabetes.*

J Am Coll Cardiol. 2016;68:2914-2916. IF: 18.639

De Gonzalo-Calvo D, Kenneweg F, Bang C, Toro R, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Smit JW, Lamb HJ, Llorente-Cortes V, Thum T.

*Circulating long-non coding RNAs as biomarkers of left ventricular diastolic function and remodelling in patients with well-controlled type 2 diabetes.*

Sci Rep. 2016 ;6:37354. IF: 4.122