



**Fundació**  
La Marató de TV3

21º SIMPOSIUM  
Enfermedades del corazón



# **PAPEL DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN AVANZADA (AGES) EN EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN DEL CORAZÓN ENVEJECIDO Y DIABÉTICO: DEL RATÓN AL HUMANO**

**Marisol Ruiz Meana**

Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

**Vicente Andrés García**

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - Madrid

## 1. Resumen

La glicación avanzada no enzimática es una reacción química altamente tóxica y ubicua que induce cambios terminales en las proteínas extracelulares e intracelulares. La acumulación de proteínas (y otras macromoléculas) glicadas, denominadas genéricamente *productos de glicación avanzada* o AGEs, se ha descrito en varias enfermedades relacionadas con la edad, incluida la insuficiencia renal, enfermedades neurodegenerativas, cataratas e inflamaciones crónicas. Sin embargo, se desconoce cuál es su papel fisiopatológico en el envejecimiento del corazón. El objetivo de este proyecto ha sido investigar la contribución de los AGEs al deterioro funcional de los cardiomiocitos durante el envejecimiento y el aumento de su vulnerabilidad al daño por isquemia-reperfusión y la insuficiencia cardíaca, dos de las enfermedades más prevalentes en los pacientes ancianos. La consecución de este objetivo permitiría identificar nuevas dianas terapéuticas.

Mediante el uso de un amplio espectro de aproximaciones técnicas, incluyendo el análisis por *Western blot*, la inmunofluorescencia, ELISA y la proteómica cuantitativa de alto rendimiento, hemos establecido por primera vez el grado de acumulación de AGEs en el corazón de ratones jóvenes (4-6 meses) y viejos (>20 meses), y hemos identificado las proteínas cardíacas específicamente afectadas por el daño glicativo. Debido a que la acumulación de AGEs puede modularse por sistemas endógenos de detoxificación, principalmente la vía de la glioxalasa (el sistema enzimático que elimina algunos de los precursores químicos implicados en la generación de AGEs), hemos investigado el impacto del envejecimiento sobre la actividad/expresión de glioxalasa en el corazón de ratones y humanos de diferentes edades. Para dilucidar las consecuencias funcionales de los AGEs en el corazón, hemos estudiado el manejo de calcio celular, el daño oxidativo, la respiración mitocondrial y la capacidad antioxidante en cardiomiocitos y mitocondrias aislados de ratones con envejecimiento fisiológico y sus homólogos jóvenes y en muestras miocárdicas de pacientes. Finalmente, para establecer la relación causa-efecto entre la presencia de AGEs y la (dis)función de los cardiomiocitos durante el envejecimiento, hemos desarrollado un modelo de cultivo de cardiomiocitos HL-1 con acumulación intracelular de AGEs, en el que se han repetido los ensayos funcionales previamente utilizados en el tejido miocárdico.

En paralelo, como un subestudio independiente, hemos puesto a prueba el papel potencial de los AGEs como predictores de cardiopatía isquémica y de moduladores del daño por isquemia-reperfusión en pacientes, así como su contribución a la disfunción cardíaca. Para alcanzar este objetivo, hemos cuantificado los niveles de AGEs circulantes y tisulares (mediante la detección no invasiva de autofluorescencia en el antebrazo y el cristalino del ojo) en una cohorte de pacientes diabéticos de tipo 2 de diferentes edades. Como grupo control, se ha utilizado una población no diabética equivalente en edad y sexo. La correlación entre los niveles de AGEs, el fenotipo clínico del paciente y la incidencia de infarto de miocardio silente (detectado por TC/PET coronario) e infarto agudo de miocardio (determinado por la extensión de la necrosis cuantificada por RMN) se encuentra en fase de análisis en el momento de escribir esta memoria.

## **2. Resultados**

Utilizando cardiomiocitos aislados, mitocondrias, vesículas de retículo sarcoplásmico (RS) y extractos de miocardio de ratones jóvenes (5-6 meses) y viejos ( $\geq 20$  meses) C57BL/6 y de pacientes jóvenes ( $< 75$  años) y ancianos ( $\geq 75$  años) sometidos a cirugía cardíaca en el Hospital Vall d'Hebron, hemos demostrado, por primera vez, que el envejecimiento se asocia a un aumento significativo de los niveles de proteínas modificadas por AGEs en el corazón de ratones y humanos. Al contrario de lo esperado, el inmunomarcaje por fluorescencia y el análisis proteómico han establecido que una parte significativa de los AGEs acumulados durante el envejecimiento se encuentra en el espacio *intracelular* de los cardiomiocitos. El ensayo enzimático por espectrofotometría detectó una reducción de la eficiencia de la vía de la glioxalasa-1 (Glo-1, el sistema enzimático responsable de la detoxificación de los compuestos dicarbonílicos, como el metilglioxal, que evolucionan a la formación de AGEs), a pesar de que los niveles de expresión del enzima estaban preservados. Esta deficiencia en la actividad de Glo-1 da lugar a una menor producción de D-lactato, el metabolito final de la vía de detoxificación, en el miocardio de ratones viejos y pacientes ancianos. Por otra parte, los niveles de glutatión, un enzima antioxidante que actúa como cofactor de la Glo-1, también se encontró reducido en el miocardio murino y humano de los individuos viejos. Estos resultados indican que, más allá de la acumulación pasiva

de AGEs en la matriz extracelular que se había descrito previamente, el corazón desarrolla durante el envejecimiento una deficiencia de uno de los sistemas de detoxificación endógenos más universales, lo que favorece la aparición de daño glicoxidativo intracelular.

Entre las proteínas afectadas por la glicación durante el envejecimiento se identificó el receptor de la rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico (RS), tanto en ratones como en humanos, según los resultados obtenidos por técnicas independientes, incluida ELISA, inmunofluorescencia y proteómica diferencial. Se comprobó que la glicación de RyR tiene consecuencias funcionales sobre el manejo de calcio por parte del RS, consistente en un aumento de la fuga espontánea de calcio desde el RyR. Debido a que el RS forma unidades anatómicas y funcionales con las mitocondrias circundantes, con quienes intercambia calcio y ATP de forma bidireccional, hemos investigado el impacto de la fuga de calcio del RS sobre la función e integridad de las mitocondrias. Nuestros resultados indican que durante el envejecimiento las mitocondrias cardíacas presentan precipitados de calcio en su matriz, una observación que se corroboró tanto en ratones como en humanos. Este exceso de calcio precipitado tiene efectos perjudiciales sobre la función mitocondrial, que se ha detectado como una reducción de su capacidad aeróbica máxima y una disminución en el número de mitocondrias que respiran en el corazón de ratones y humanos de edad avanzada.

Para establecer la relación causa-efecto entre la glicación intracelular dependiente de la edad, las alteraciones en el manejo de calcio y la disfunción mitocondrial, expusimos crónicamente a cardiomiocitos HL-1 en cultivo a condiciones que simulan el envejecimiento, es decir, inhibición de la Glo-1 y exceso de metilglioxal. Los cardiomiocitos HL-1 expuestos a estas condiciones desarrollaron un aumento de AGEs intracelulares en 3 días. Tal como habíamos observado en cardiomiocitos intactos de ratones viejos, el RyR fue diana de daño glicativo en las células HL-1. La glicación del RyR recapituló las alteraciones en el intercambio de calcio entre el RS y las mitocondrias que están presentes en el corazón viejo.

### 3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

#### ¿Cuál es la relevancia del estudio?

- Nuestros datos demuestran por primera vez una deficiencia en el sistema de detoxificación de los compuestos dicarbonílicos en el corazón como un distintivo común de envejecimiento, ya que está presente tanto en ratones viejos como en pacientes ancianos. La reducción de la actividad de Glo-1 se había asociado previamente a la gravedad de la aterosclerosis, la cardiomiopatía diabética y la enfermedad coronaria, y ahora aportamos evidencias sobre su contribución a la fisiopatología del envejecimiento cardíaco.
- Hemos identificado el RyR como una diana importante de daño glicativo en los cardiomiocitos envejecidos; la glicación del RyR altera el manejo de calcio por parte del RS. La adecuada función del RyR es esencial para mantener la actividad contráctil y la homeostasis del calcio en el corazón; las alteraciones en la cinética de liberación de calcio por parte del RS han sido previamente asociadas a la disfunción contráctil de los cardiomiocitos en la insuficiencia cardíaca y a la muerte celular en la isquemia-reperfusión miocárdica. Nuestros resultados indican que el daño glicativo del RyR puede participar en el aumento de la extensión de la necrosis durante el infarto de miocardio y en la mayor susceptibilidad a desarrollar insuficiencia cardíaca, que han sido observados de forma consistente en los pacientes de edad avanzada.
- Debido a que el calcio mitocondrial es fundamental para ajustar de forma dinámica la demanda con el aporte energético y depende directamente del calcio transferido desde el RS, nuestros resultados indican que la glicación del RyR puede ser una causa del desacoplamiento en la comunicación entre RS-mitocondrios durante el envejecimiento y del daño mitocondrial que se produce como consecuencia de ello. El corazón es el órgano con mayor dependencia de la capacidad aeróbica mitocondrial. Por lo tanto, el daño mitocondrial secundario a la sobrecarga de calcio no solo puede participar en una peor respuesta a la isquemia-reperfusión, sino que puede explicar la menor tolerancia al ejercicio y al estrés del corazón envejecido.

### **¿Cuáles son las posibles implicaciones clínicas?**

- Nuestros resultados han identificado un mecanismo fisiopatológico previamente desconocido implicado en el envejecimiento cardíaco que puede favorecer la transición de un cardiomiocito sano hacia un cardiomiocito insuficiente y aumentar su vulnerabilidad al daño por isquemia-reperfusión.
- Proponemos la prevención de la generación de compuestos dicarbonílicos, la estimulación de su detoxificación o la reducción de las consecuencias funcionales de la glicación del RyR como posibles estrategias dirigidas a mejorar la función mitocondrial en los cardiomiocitos envejecidos.

En conjunto, estos resultados abren un nuevo campo de investigación dirigido a identificar las mejores aproximaciones terapéuticas capaces de prevenir la glicación intracelular en los cardiomiocitos (y potencialmente otros tipos de células) durante el envejecimiento o reducir sus consecuencias funcionales en algunos contextos patológicos, como la isquemia-reperfusión.

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

Sambola A, Ruiz-Meana M, Barba I, Garcia-Del Blanco B, Barrabes J, Rello P, Vilarrosa U, Garcia-Dorado D.

*Glycative and oxidative stress are associated with altered thrombus composition in diabetic patients with ST-elevation myocardial infarction.*

Int J Cardiol 2017;243:9-14. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.04.089.

Andreadou I, Adamovski P, Bartekova M, Beauloye C, Bertrand L, Biedermann D, Borutaite V, Bøtker HE, Chlopicki S, Dambrova M, Davidson S, Devaux Y, Di Lisa F, Djuric D, Erlinge D, Falcao-Pires I, Galatou E, García-Dorado D, Garcia-Sosa AT, Girão H, Giricz Z, Gyongyosi M, Healy D, Heusch G, Jakovljevic V, Jovanic J, Kolar F, Kwak BR, Leszek P, Liepins E, Longnus S, Marinovic J, Muntean DM, Nezcic L, Ovize M, Pagliaro P, da Costa Gomes CP, Pernow J, Persidis A, Pischke SE, Podesser BK, Prunier F, Ravingerova T, Ruiz-Meana M, et al.

*Realizing the therapeutic potential of novel cardioprotective therapies: The EU-CARDIOPROTECTION COST Action - CA16225.*

Conditioning Medicine 2018;1(3):116-123.

Bøtker HE, Hausenloy DJ, Andreadou I, Antonucci S, Boengler K, Davidson SM, Deshwal S, Devaux Y, Di Lisa F, Di Sante M, Eftenakis P, Femminò S, García-Dorado D, Giricz Z, Ibanez B, Iliodromitis E, Kaludercic N, Kleinbongard P, Neuhäuser M, Ovize M, Pagliaro P, Rahbek-Schmidt M, Ruiz-Meana M, Schlüter KD, Schulz R, Skyschally A, Wilder C, Yellon DM, Ferdinandy P, Heusch G.

*Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardio protection.*

Bas Res Cardiol 2018;113(5):39.

Ruiz-Meana M, Minguet M, Miro-Casas E, Castañs C, Bou-Teen D, Castellano J, Bonzon-Kulichenko E, Igual A, Rodriguez-Lecoq R, Vazquez J, Garcia-Dorado D. *Ryanodine receptor glycation favors mitochondrial damage in the senescent heart.* Circulation 2019;139(7):949-964.

Ruiz-Meana M, Boengler K, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Kaambre T, Kararigas G, Perrino C, Schulz R, Ytrehus K.

*Aging, sex and cardioprotection.*

Br J Pharmacol 2019 Dec 20. doi: 10.1111/bph.14951.

Bøtker HE, Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Heusch G, Ovize M.

*Translational issues for mitoprotection as an adjunct to reperfusion therapy in patients with ST-segment elevation infarction.*

J Cell Mol Med 2020 January 22. doi: 10.1111/jcmm.14953.

Zuurbier CJ, Bertrand L, Beauloye CR, Andreadou I, Ruiz-Meana M, Jespersen NR, Kula-Alwar D, Prag HA, Botker HE, Dambrova M, Montessuit C, Kaambre T, Liepinsh E, Brookes PS, Krieg T.

*Cardiac metabolism as driver and therapeutic target of myocardial infarction.*

J Cell Mol Med 2020 (en prensa).

Ruiz-Meana M, Bou-Teen D, Ferdinandy P, Gyongyosi M, Pesce M, Perrino C, Schulz R, Sluijter J, Tocchetti G, Thum T, Madonna R.

*Cardiac ageing and cardioprotection: An update from the joint 2019 meeting of the ESC Working Groups of Cellular Biology of the heart and Myocardial Function.*  
Cardiovasc Res 2020 (en prensa).