



Fundació
La Marató de TV3
21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



CARDIOMIOPATÍA DIABÉTICA: A LA BÚSQUEDA DE UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA

Manuel Vázquez Carrera

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació - Universitat de Barcelona

Juan Francisco Nistal Herrera

Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla - IDIVAL

1. Resumen

La presencia de diabetes *mellitus* favorece el desarrollo de un tipo de cardiomiopatía específica que incrementa la incidencia de la mortalidad de origen cardíaco en aquellos pacientes que la padecen. Esta cardiomiopatía, conocida como *cardiomiopatía diabética* (CD), se caracteriza por la presencia de disfunción ventricular en ausencia de enfermedad coronaria arterial e hipertensión. A pesar de la incidencia negativa que la diabetes tiene sobre el corazón, actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico específico para la CD. Por lo tanto, es absolutamente necesario investigar los mecanismos moleculares subyacentes de esta patología para poder desarrollar nuevos fármacos que permitan su tratamiento. Más allá de sus efectos metabólicos, numerosos estudios han sugerido que el receptor nuclear PPAR β/δ (*peroxisome proliferator-activated receptor β/δ*) actuaría como un inhibidor integral de los diferentes mecanismos implicados en el desarrollo de la CD. De acuerdo con ello, el objetivo principal de este proyecto de investigación consistió en estudiar los mecanismos mediante los cuales PPAR β/δ podría prevenir el desarrollo de la CD. Para lograr este objetivo, se utilizaron ratones con expresión suprimida de PPAR β/δ tratados con estreptozotocina para inducir la diabetes. También se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para examinar si los agonistas activadores de PPAR β/δ inhibían las vías de señalización implicadas en el desarrollo de la enfermedad. Finalmente, se utilizaron muestras de corazón de pacientes diabéticos para verificar el potencial de PPAR β/δ en la prevención de la CD.

2. Resultados

En primer lugar, se investigó si los ratones *knockout* (KO) PPAR β/δ tratados con estreptozotocina (STZ) presentaban una aceleración en el desarrollo de la CD. Para alcanzar este objetivo, se indujo la diabetes mediante la administración de STZ (50 mg por kg⁻¹ por día⁻¹ por vía IP, durante 5 días consecutivos) a ratones macho control (*wild-type*; WT) y KO PPAR β/δ de 12 semanas de edad. Los animales se sacrificaron 6 meses después del diagnóstico de la diabetes.

La inducción de diabetes causaba una reducción del peso del corazón, aunque esta solo alcanzaba significación estadística en los ratones KO PPAR β/δ . De la misma manera, el peso corporal de los ratones diabéticos, y especialmente de los KO PPAR β/δ diabéticos, era inferior al de los animales control (WT). Esto justificaría la falta de cambios en la relación HW/BW (peso del corazón/peso corporal), a pesar de presentar una reducción del peso cardíaco. Por el contrario, la relación HW/TL (peso del corazón/longitud de la tibia) sí disminuía en los animales diabéticos, particularmente en aquellos con expresión suprimida de PPAR β/δ (KO +STZ), hecho que indicaba la presencia de cierta atrofia cardíaca. Sin embargo, los análisis histológicos realizados mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos con respecto al tamaño de los cardiomiocitos, a pesar de que sí existía una tendencia a disminuir su tamaño en los ratones KO PPAR β/δ (\pm STZ) y WT diabéticos.

Los resultados de la ecocardiografía indicaban que las funciones diastólica y sistólica no se modificaban entre los diferentes grupos de tratamiento, pero sí sugerían la presencia de cardiomiopatía dilatada incipiente en los ratones WT diabéticos y los ratones KO PPAR β/δ , tanto diabéticos como no diabéticos, ya que se observaba un aumento de LV-EDD y LV-ESD (diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole y la sístole, respectivamente). También se observó un engrosamiento de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole (PWTd) y la sístole (PWTs), y del grosor del septo interventricular al final de la diástole (IVSd) y la sístole (IVSS) en ratones KO PPAR β/δ no diabéticos, y en comparación con el resto de grupos. En conjunto, estos datos sugerían un cierto engrosamiento de la pared cardíaca en ratones KO PPAR β/δ , mientras que la inducción de diabetes con STZ provocaba un adelgazamiento de la pared, acompañado de una dilatación de la cámara, especialmente en los animales KO PPAR β/δ . Por otro lado, y de acuerdo con los datos obtenidos con respecto al área de la válvula aórtica (Ao VTI, *aortic velocity time integral*) y Ao PV (*aortic peak velocity*), los ratones KO PPAR β/δ desarrollaban estenosis aórtica, hecho que era mucho más evidente en los ratones KO diabéticos. En un estudio morfométrico realizado en el Hospital Universitario Valdecilla por investigadores participantes en este proyecto también se demostró que los animales KO PPAR β/δ diabéticos presentaban una remodelación cardíaca más agresiva que los animales WT diabéticos, con un mayor engrosamiento parietal y el deterioro de la

función sistólica longitudinal, tras provocar sobrecarga de presión mediante constricción del arco aórtico (TAC; figura 1).

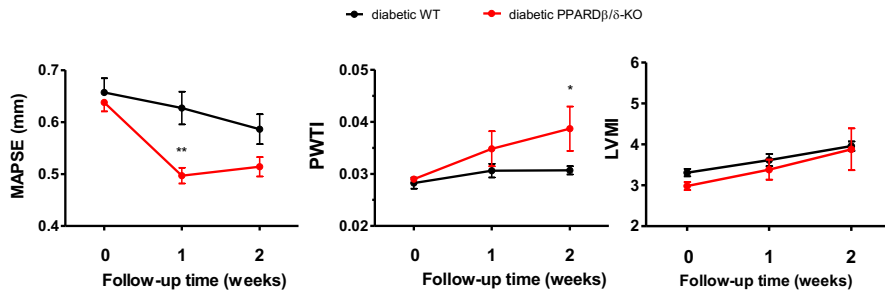


Figura 1. Evolución de los parámetros ecocardiográficos 2 semanas después de realizar la TAC en animales diabéticos WT y KO PPARβ/δ. MAPSE: *mitral annular plane systolic excursion*; PWTI: grosor de la pared posterior normalizada por la masa corporal; LVMI: masa ventricular izquierda normalizada por la masa corporal.

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente a WT STZ.

Posteriormente se investigó si estos cambios funcionales cardíacos se correspondían con una remodelación estructural del corazón. Mediante la tinción tricrómica de Masson se demostró que los ratones WT y KO diabéticos, igual que los KO PPARβ/δ, desarrollaban, en comparación con el grupo control (WT), fibrosis cardíaca intensa y una desorganización fibrilar en las zonas intersticial y perivascular (figura 2). Estos datos sugerían también que el aumento de fibrosis en el miocardio no justificaba *per se* los cambios funcionales cardíacos observados en los ratones KO PPARβ/δ, descritos anteriormente.

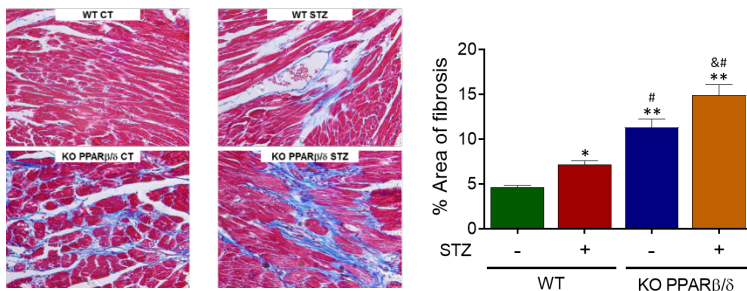


Figura 2. Tinción tricrómica de Masson (izquierda) y cuantificación del área de colágeno (derecha) en el corazón de ratones macho WT o KO PPARβ/δ, 6 meses después del diagnóstico de la diabetes.

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente a WT control; &# $P < 0,05$ frente a KO control; # $P < 0,05$ frente a WT STZ.

A continuación, y para confirmar el papel de PPAR β/δ , se investigó si la activación de este receptor nuclear prevenía el desarrollo de la CD en el mismo modelo de diabetes. Así, se indujo la diabetes por administración de STZ en ratones macho C57BL/6 de 12 semanas de edad y, una vez diagnosticada la diabetes, se comenzó el tratamiento con una dieta suplementada con el agonista de PPAR β/δ GW0742 (+GW) o sin este (control), de forma que cada animal recibiera una dosis aproximada de 1 mg por kg⁻¹ por día⁻¹ durante 16 semanas.

El tratamiento con GW0742 previno total o parcialmente la reducción del peso corporal, el peso del corazón y las relaciones HW/BW y HW/TL en los animales diabéticos (STZ +GW), con respecto a los animales diabéticos no tratados (STZ). Sin embargo, ninguno de estos parámetros se modificó tras tratar con GW0742 los animales no diabéticos (Ct +GW), y en comparación con el grupo control (Ct o WT). El tratamiento con GW0742 tampoco provocó cambios significativos en los parámetros ecocardiográficos en ninguno de los grupos analizados, fueran diabéticos o no. Mediante la tinción H&E se observó que GW0742 prevenía parcialmente la disminución del tamaño de los cardiomiocitos inducida por STZ y, más destacable aún, la tinción tricrómica de Masson demostró que este agonista revertía de manera importante la fibrosis que desarrollaban los ratones diabéticos (STZ +GW; figura 3).

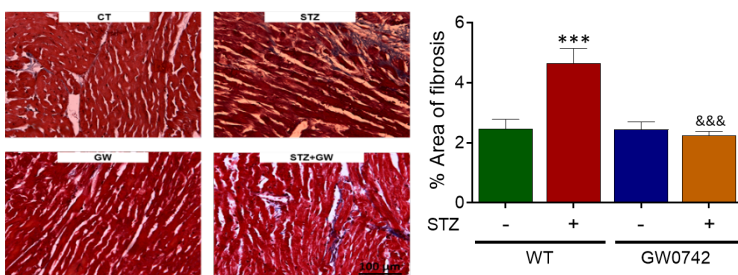


Figura 3. Tinción tricrómica de Masson (izquierda) y cuantificación del área de colágeno (derecha) en el corazón de ratones machos control (Ct o WT) o diabéticos (STZ) tratados con GW0742 (+GW) o sin este durante 16 semanas a partir del diagnóstico de la diabetes.

*** $P < 0,001$ frente a CT; &&& $P < 0,001$ frente a STZ.

Posteriormente se inició el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales PPAR β/δ regulaba el desarrollo de esta patología. Mediante análisis de RT-PCR en tiempo real se determinó la expresión génica de distintos marcadores moleculares (figura 4). La inducción de diabetes con STZ incrementaba la expresión de marcadores de inflamación (MCP-1, IL-10, galectina 3/LGALS3) en el corazón, hecho

que se potenciaba en los animales KO PPAR β/δ (KO y KO +STZ). Este aumento de la inflamación no era debido a la infiltración de macrófagos, pues la expresión de marcadores de infiltración (F4/80, CD68) no se modificaba. La STZ (grupos STZ y KO +STZ), y en menor medida la supresión PPAR β/δ (grupo KO), también inducía la expresión de TREM-1, un receptor implicado en la amplificación de la respuesta inmunológica innata y el reclutamiento de células inflamatorias tras un infarto de miocardio. También se observó un incremento en la expresión de la expresión de CHOP, un marcador de apoptosis, en animales diabéticos inducidos con STZ, especialmente en el grupo con expresión suprimida de PPAR β/δ (KO +STZ). De acuerdo con lo que se había observado en los análisis histológicos, la inducción de diabetes provocaba el incremento de la expresión génica de marcadores de fibrosis cardíaca (MMP9, colágeno de tipo I1a y CTGF). Este incremento se veía claramente potenciado en el ratones KO PPAR β/δ diabéticos (KO +STZ), aunque los animales KO PPAR β/δ no diabéticos también presentaban un aumento de la fibrosis cardíaca.

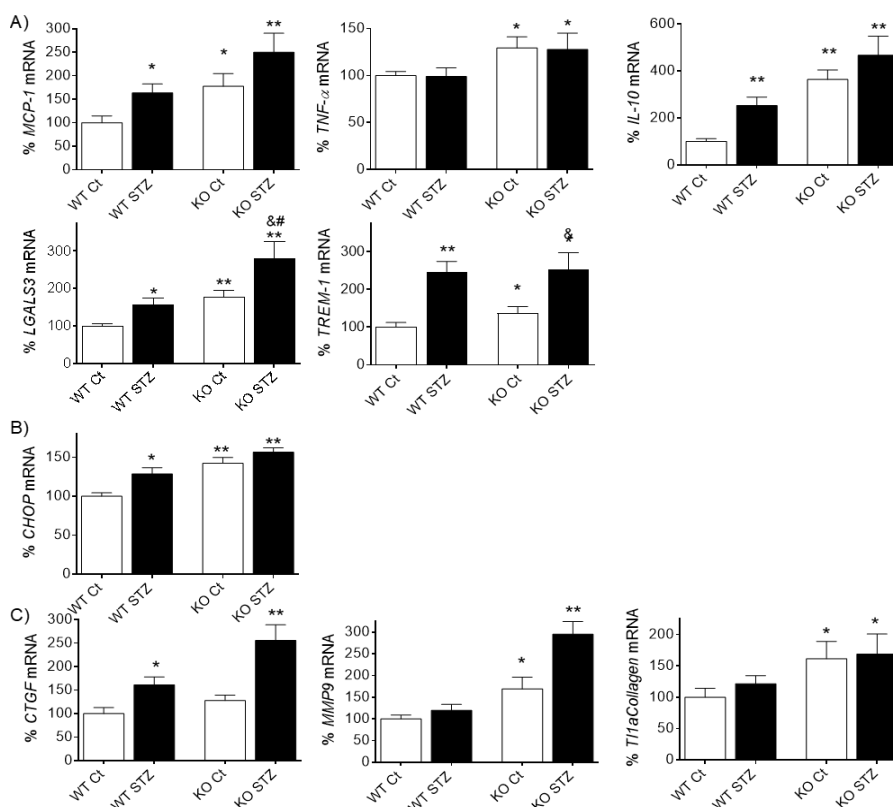


Figura 4. Análisis de expresión génica en muestras de corazón de ratones macho WT o KO PPAR β/δ , 6 meses después del diagnóstico de la diabetes. Se muestra la expresión génica de marcadores de inflamación (A), estrés del retículo endoplasmático, apoptosis (B) y fibrosis (C).

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ frente a WT control; & $P < 0,05$ frente a KO control; ### $P < 0,001$ frente a WT STZ.

En consonancia con los resultados anteriores, se observó también que la respuesta proinflamatoria y profibrótica observada después de inducir la diabetes con STZ era prevenida, total o parcialmente, mediante el tratamiento con el agonista de PPAR β/δ GW0742 (figura 5).

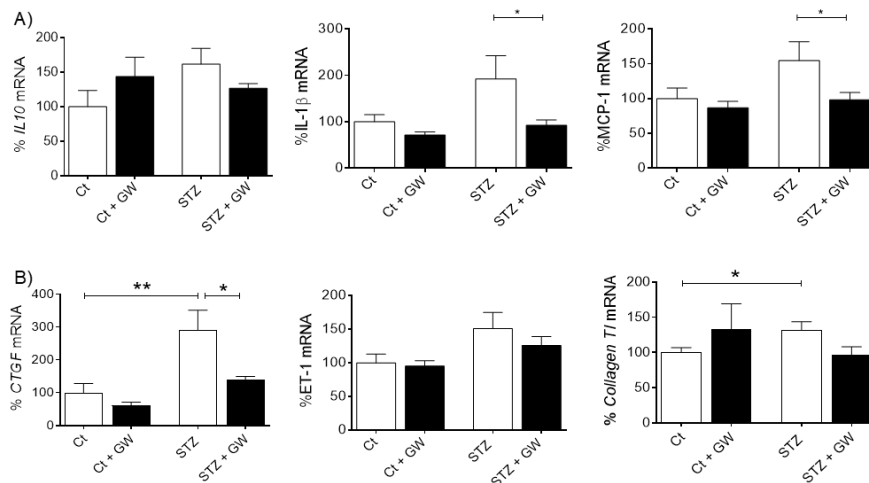


Figura 5. Análisis de expresión génica en muestras de corazón de ratones macho control (Ct) o diabéticos (STZ) tratados en presencia (+GW) o ausencia del agonista de PPAR β/δ GW0742 durante 16 semanas a partir del diagnóstico de la diabetes.

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente a CT.

A continuación, se investigó si la activación de PPAR β/δ también prevenía el desarrollo de la cardiomiopatía diabética en cultivos celulares *in vitro*. Para investigar el efecto de la hiperglucemia y de PPAR β/δ sobre las células cardíacas *in vitro* se utilizó la línea de células musculares cardíacas de ratón HL-1, que se expusieron a concentraciones bajas (control; 5,5 mmol/L) o altas (hiperglucemia, G30; 30 mmol/L) de glucosa, durante 72 horas. También se trataron con GW0742 (1 μ mol/L) para corroborar los resultados obtenidos *in vivo*. Como se puede observar en la figura 6, la hiperglucemia (G30) inducía la expresión de marcadores proinflamatorios (IL-6, MCP-1), profibróticos (MMP9, TGF- β , colágeno de tipo I1a) y proapoptóticos (CHOP). De acuerdo con ello, la hiperglucemia también reducía en estas células los niveles de I κ B α , una proteína inhibidora del importante factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B (figura 7). La adición de GW0742 al medio 24 horas antes de la exposición a la hiperglucemia prevenía la mayoría de estos cambios.

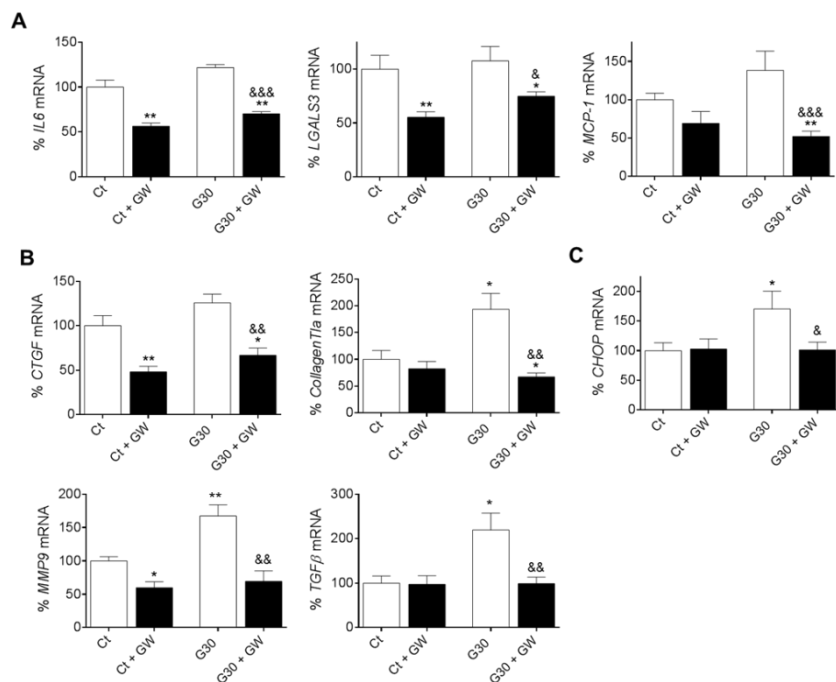


Figura 6. Análisis de la expresión génica en muestras de células HL-1 tratadas con glucosa basal (5,5 mmol/L) o hiperglucemia (G30; 30 mmol/L), y en presencia o ausencia de GW0742 (GW).

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente a CT; & $P < 0,05$, && $P < 0,01$ y &&& $P < 0,001$ frente a G30.

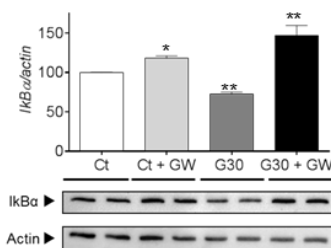


Figura 7. Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de $I\kappa B\alpha$ en muestras procedentes de células HL-1 tratadas con glucosa basal (5,5 mmol/L) o hiperglucemia (G30; 30 mmol/L), y en presencia o ausencia de GW0742 (GW).

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente a CT.

Para confirmar los resultados *in vitro* también se inició una serie de experimentos con cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs), los cuales confirmaron que la adición de GW0742 al medio 24 horas antes de exponer las células a elevadas concentraciones de glucosa evitaba el incremento de la inflamación inducida por hiperglucemia.

Los estudios del Hospital Universitario Valdecilla se realizaron con biopsias del ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica diabéticos (n = 23) y no diabéticos (n = 48), obtenidas antes de su trasplante y después de realizarles una ecocardiografía. No se apreciaron diferencias significativas en la expresión génica de

PPAR β/δ entre los pacientes diabéticos y los normoglucémicos, ni tampoco en diferentes marcadores de fibrosis (colágeno de tipos I y III, fibronectina 1, TGF- β) o hipertrofia cardíaca (β -MHC). Sin embargo, los análisis de correlación y regresión demostraron que, en los pacientes con estenosis aórtica normoglucémicos, PPAR β/δ se correlacionaba negativamente con la masa ventricular izquierda normalizada (LVMI; figura 8).

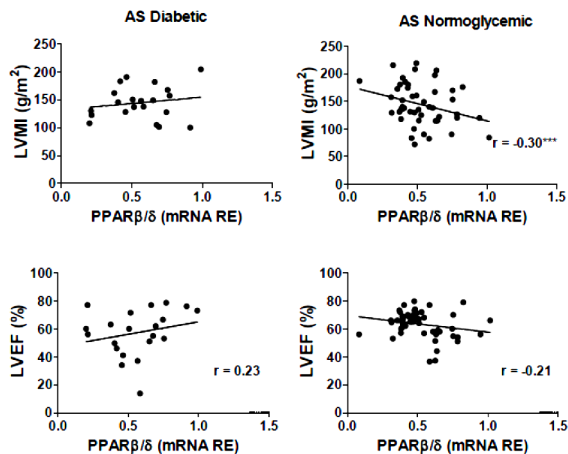


Figura 8. Relación entre la expresión de PPAR β/δ y algunos parámetros ecocardiográficos. LVMI: masa ventricular izquierda normalizada por la superficie corporal. LVEF: fracción de eyección ventricular izquierda.

Durante este proyecto, y relacionado con los estudios anteriores, también se ha investigado el papel de la deacetilasa Sirt3 (sirtuína 3) en la fibrosis y la inflamación que se producen durante algunas patologías cardíacas, como por ejemplo la CD. En este estudio observamos cómo los ratones con expresión suprimida (KO) de SIRT3 presentaban fibrosis cardíaca e inflamación, acompañadas de un aumento de la actividad del factor de transcripción proinflamatorio y profibrótico FOS/AP-1. Esto se confirmó *in vitro* mediante estudios de sobreexpresión de SIRT3 en cardiomiocitos neonatales de rata y en cardiomiocitos humanos AC16 (figura 9), en los que se demostró que SIRT3 prevenía parcialmente la respuesta proinflamatoria y profibrótica inducida por la citocina TNF- α , en un proceso dependiente de la vía FOS/AP-1.

Nuestros resultados también indicaban que este efecto era debido a que SIRT3 inhibía la transcripción de FOS mediante la deacetilación específica de la histona H3 en residuos lisina K27 de su promotor (figura 10). En conjunto, estos datos subrayan el papel importante que tiene SIRT3 en la regulación de las respuestas profibróticas y

proinflamatorias en células cardíacas mediante la modulación de la vía FOS/AP-1 y, dado que la fibrosis y la inflamación son cruciales en la progresión de la CD, sugieren que la activación de SIRT3 podría ser una nueva diana terapéutica muy interesante.

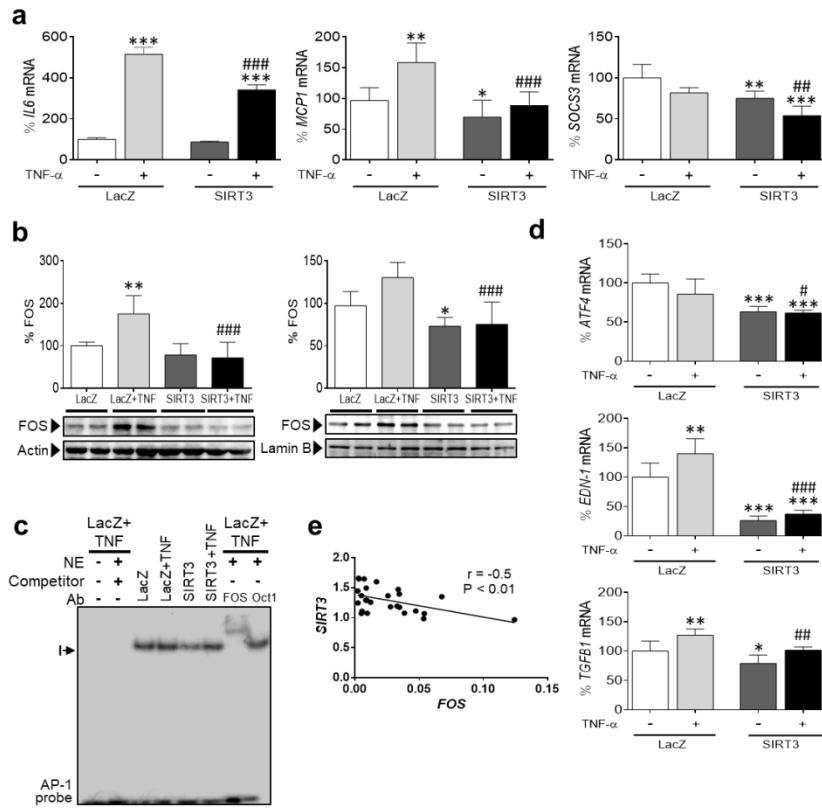


Figura 9. Análisis de la expresión génica de diferentes marcadores de inflamación (A) y fibrosis (D) en muestras procedentes de células cardíacas humanas AC16 transfectadas con plásmidos para sobreexpresar Sirt3 (SIRT3) o un gen control (LacZ), y en presencia o ausencia del estímulo proinflamatorio TNF- α (TNF). **B.** Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de FOS en fracciones de proteína citoplasmática y nuclear. **C.** Ensayo de actividad de unión al ADN (EMSA) de AP-1, en las mismas muestras. **E.** Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre la expresión génica de SIRT3 y FOS en muestras de tejido de miocardio ventricular izquierdo obtenido de pacientes humanos.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ frente a LacZ; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$ frente a LacZ + TNF- α .

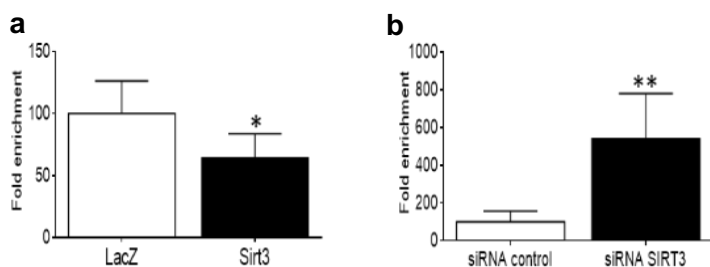


Figura 10. SIRT3 atenúa la señalización de la vía FOS/AP-1 mediante la deacetilación de residuos de lisina K27 en histona 3 (H3). Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar los niveles de histona H3 acetilada en residuos lisina K27 del promotor de FOS en células cardíacas humanas AC16 transfectadas con plásmidos para sobreexpresar Sirt3 (SIRT3) o el gen control (LacZ) (A), o siRNA control o Sirt3 (B) para silenciar la expresión de este gen *in vitro*.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ frente a LacZ (A) o siRNA control (B).

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

La activación del receptor nuclear PPAR β/δ ha sido propuesta como una diana terapéutica para el tratamiento de las enfermedades cardíacas. A pesar de ello, se tiene un conocimiento limitado de los mecanismos mediante los cuales los activadores de este receptor podrían ser útiles para el tratamiento de estas patologías. Los resultados de este proyecto financiado por La Marató de TV3 demuestran que la activación de PPAR β/δ mejora la cardiomiopatía diabética en un modelo animal, fundamentalmente gracias a la reducción del proceso inflamatorio y la fibrosis. Asimismo, los resultados obtenidos por el grupo de Santander nos han permitido profundizar en la posible relación entre PPAR β/δ y los mecanismos responsables del desarrollo de la cardiomiopatía diabética en los pacientes que sufren esta enfermedad. En conjunto, nuestros resultados confirman que PPAR β/δ es una potencial diana para tratar la cardiomiopatía diabética, una enfermedad para la que todavía no existen tratamientos farmacológicos específicos. Aunque actualmente no hay fármacos agonistas de PPAR β/δ comercializados, se prevé que próximamente salga al mercado elafibranor, un agonista de PPAR α y PPAR β/δ , para el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Una vez se comercialice este fármaco, será más fácil estudiar sus efectos para otras indicaciones terapéuticas, como es el caso, por ejemplo, de la cardiomiopatía diabética. Cabe mencionar que la NASH también se caracteriza por la presencia de inflamación y fibrosis, igual que sucede durante la cardiomiopatía diabética. Este hecho hace pensar que, si elafibranor reduce estos procesos y mejora esta enfermedad hepática, no se puede descartar que la activación de PPAR β/δ en el corazón pudiera mejorar la cardiomiopatía diabética en humanos reduciendo estos procesos, tal como hemos demostrado previamente en ratones.

Evidentemente, deberán realizarse ensayos clínicos para confirmar esta posibilidad, pero, en cualquier caso, pensamos que este proyecto ha establecido los mecanismos moleculares de los posibles efectos beneficiosos de los activadores de PPAR β/δ en el tratamiento de la cardiomiopatía diabética.

4. Bibliografía científica generada

Grupo de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universitat de Barcelona, Barcelona

Publicaciones

Rodríguez-Calvo *et al.*

Small heterodimer partner (SHP) contributes to insulin resistance in cardiomyocytes.
Biochim. Biophys. Acta. 2017, 1862: 541-551.

Palomer *et al.*

Emerging Actors in Diabetic Cardiomyopathy: Heartbreaker Biomarkers or Therapeutic Targets?

Trends Pharmacol Sci. 2018, 39(5): 452-467.

Palomer *et al.*

PPAR β/δ : A key therapeutic target in metabolic disorders.

Int J. Mol. Sci. 2018, 19: 913-926.

Palomer *et al.*

SIRT3-mediated inhibition of FOS through histone H3 deacetylation prevents cardiac fibrosis and inflammation.

Signal Transduct. Target. Ther. En prensa, DOI: 10.1038/s41392-020-0114-1.

Comunicaciones en congresos

Xavier Palomer *et al.*

Targeting PPARbeta/delta to prevent diabetic cardiomyopathy progression in mice.

CIBERDEM Meeting. Hotel Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 23-25 de mayo de 2018.

Grupo del Hospital Universitario Valdecilla, Santander

Selección de publicaciones

Merino *et al.*

Experimental modelling of cardiac pressure overload hypertrophy: Modified technique for precise, reproducible, safe and easy aortic arch banding/debanding in mice.

Sci Rep. 2018, 16; 8(1): 3167. doi: 10.1038/s41598-018-21548-x.

Cañes *et al.*

Neuron-derived orphan receptor-1 modulates cardiac gene expression and exacerbates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.

Clinical Science. 2020, 134: 359-377.

Selección de comunicaciones en congresos

Expósito *et al.*

Role of cytokines of the TGF beta family in the atrial structural remodelling underlying atrial fibrillation in aortic stenosis patients.

Frontiers in Cardiovascular Biology, Fifth Congress of the European Society of Cardiology Council on Basic Cardiovascular Science, Viena, Austria.

Póster.

Cardiovascular Research. Supplements 2018;114: S34.

Expósito *et al.*

Desregulación de la expresión de las citocinas de la superfamilia TGF- β y remodelado patológico pro-fibrótico auricular en pacientes con estenosis aórtica que desarrollan fibrilación auricular.

SEC 2018 - Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Sevilla, 25-27 de octubre de 2018.

Póster.

Rev Esp Cardiol. 2018, 71 Supl 1: 572.

Expósito *et al.*

Relación entre el remodelado estructural auricular y el desarrollo de fibrilación auricular postoperatoria. SEC 2018 - Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Sevilla, 25-27 de octubre de 2018.

Póster.

Rev Esp Cardiol. 2018;71 Supl 1: 738.