



**Fundació**  
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM  
Malalties del cor



## **VALOR DIAGNÒSTIC, PRONÒSTIC I TERAPÈUTIC DEL RECEPTOR LRP1 A LA MALALTIA CARDIOVASCULAR**

**Concepción Vicenta Llorente Cortés**

CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

## 1. Resum

L'acumulació arterial i miocardiaca de lípids provoca alteracions cardiovasculars, però tot i això, clínicament no es tracta. L'acumulació de lípids es produeix principalment per la captació de lipoproteïnes aterogèniques mitjançant el receptor LRP1. A l'LRP1 hem identificat un pèptid, P3, al domini CR9, que interacciona només amb lipoproteïnes aterogèniques. La nostra hipòtesi és que el bloqueig de CR9 pels anticossos anti-P3 (Anti-P3 Abs) o el segrest de les lipoproteïnes pels pèptids mimètics basats en P3 (mP3), inhibeixen específicament l'acumulació arterial i miocardiaca de lípids.

L'acumulació de lípids promou l'alliberament d'una forma soluble d'LRP1, sLRP1. Els nivells circulants d'sLRP1 poden reflectir, doncs, l'acumulació lipídica arterial i miocardiaca. Els objectius d'aquest projecte són determinar els efectes dels Anti-P3 Abs i mP3 en les alteracions cardiovasculars en un model animal, i avaluar el valor diagnòstic i pronòstic dels nivells circulants d'sLRP1 en pacients amb el lípid vascular i miocardiàc caracteritzat.

Conills immunitzats amb P3, conills tractats amb mP3 i conills controls s'alimentaran amb una dieta alta en greixos. Les mostres de sang es prendran regularment per determinar paràmetres lipídics i metabòlics. Les mostres d'aorta, cor, fetge i múscul esquelètic es sotmetran a anàlisi molecular i immunohistoquímica. L'aterosclerosi i la funció ventricular s'avaluaran mitjançant l'anàlisi d'imatge i ecocardiografia. Utilitzarem tècniques moleculars per caracteritzar els lípids, l'activitat procoagulant vascular i el maneig cardíac del calci. Les concentracions plasmàtiques d'sLRP1 es determinaran mitjançant ELISA. El valor diagnòstic d'sLRP1 s'avaluarà en pacients amb plaques ateroscleròtiques caracteritzades per tomografia computada i en pacients amb lípid miocardiàc caracteritzat per ressonància magnètica nuclear. El valor pronòstic de l'sLRP1 s'avaluarà amb un seguiment clínic de tres anys.

Esperem desenvolupar molècules basades en P3 amb eficàcia terapèutica provada en un model *in vivo* i validar sLRP1 com a biomarcador diagnòstic i pronòstic a la malaltia cardiovascular.

## 2. Resultats

### Eines terapèutiques innovadores basades en el receptor LRP1

**Els anticossos contra el pèptid P3 (del domini CR9 del receptor LRP1) mostren una elevada eficàcia per inhibir l'aterosclerosi induïda per dieta en el model de conill.**

**Resum.** En el model de conill hem demostrat una reducció significativa de dos marcadors d'aterosclerosi: la captació de [<sup>18</sup>F]-FDG per les cèl·lules vasculares en aorta i l'índex de resistència arterial (IRA) de les caròtides, mitjançant la immunització amb el pèptid P3. Els estudis immunohistoquímics, confocals i moleculars van demostrar que la immunització amb P3 inhibeix la formació de les primeres fases de l'arteriosclerosi (estries grasses) a causa de la gran eficiència dels anticossos anti-P3 per inhibir la formació de cèl·lules escumoses, així com la senyalització proinflamatòria associada. La senyalització alterada en aquestes cèl·lules està involucrada en el reclutament de monòcits i la inducció de la migració de les cèl·lules musculars llises de la mitjana a l'íntima arterial.

#### **Resultats específics**

La immunització amb el pèptid P3 indueix de forma eficient la producció d'anticossos anti-P3 als conills. L'anàlisi d'ELISA va mostrar que els anticossos anti-P3 estan absents del sèrum dels animals controls al llarg de tot el període d'immunització, mentre que van augmentar de forma molt important al sèrum dels animals immunitzats amb P3.

Els anticossos anti-P3 inhibeixen l'aterosclerosi induïda per dieta en conills. La dieta grassa fa que un alt percentatge de l'extensió de l'aorta estigui ocupada per lesions ateroscleròtiques. No obstant això, els conills immunitzats amb el pèptid P3 no tenen aterosclerosi malgrat haver estat alimentats amb dieta grassa. La reducció en l'extensió d'aterosclerosi en els animals immunitzats amb P3 va acompanyada d'una disminució de l'acumulació de lípids, macròfags i cèl·lules musculars llises en l'íntima arterial de la paret vascular.

Els anticossos anti-P3 redueixen l'acumulació d'èsters de colesterol i la inducció de senyals proinflamatoris a l'aorta dels conills immunitzats amb el pèptid P3 sense disminuir els nivells de lípids en sang o millorar el perfil de lipoproteïnes. Les anàlisis bioquímiques del sèrum van palesar que la immunització amb P3 no altera els nivells plasmàtics de lípids o el perfil de lipoproteïnes i que, al sèrum d'aquest model animal, el colesterol es transporta majoritàriament en les lipoproteïnes VLDL i LDL, tal com s'esdevé en humans. La dieta grassa va produir un gran increment als nivells de colesterol transportats per aquestes lipoproteïnes, fet que va causar un gran impacte a l'acumulació de colesterol a l'aorta. No obstant això, en els conills immunitzats amb P3, tot i que la dieta grassa va causar el mateix increment de colesterol a les lipoproteïnes VLDL i LDL, els anticossos anti-P3 van bloquejar gairebé del tot l'impacte d'aquestes lipoproteïnes sobre els nivells de colesterol de l'aorta. No solament això, els estudis moleculars combinats amb estudis de microscòpia confocal van mostrar que la immunització amb P3 frena l'efecte proinflamatori de la dieta sobre la paret vascular de l'aorta, tal com indica la baixada a l'activació dels biomarcadors TNFR1 (de l'anglès *tumor necrosis factor receptor*) i NF- $\kappa$ B (de l'anglès *nuclear factor kappa beta*) (p65). Els nostres resultats demostren que la ruptura de la interacció de les lipoproteïnes aterogèniques (VLDL i LDL) amb el receptor LRP1 pels anticossos anti-P3 frenen l'aterosclerosi en interrompre l'acumulació vascular de colesterol i la senyalització proinflamatòria associada.

El sèrum dels animals immunitzats amb P3, tot i contenir la mateixa quantitat de lipoproteïnes aterogèniques que el sèrum control, no produeix acumulació intracel·lular de colesterol esterificat ni tampoc activació de senyals proinflamatoris en cèl·lules vasculares humanes (macròfags o cèl·lules musculars llises de la paret vascular). L'exposició de cèl·lules vasculares a sèrum procedent de conills alimentats amb dieta grassa (1%, 2 hores) causa una elevada acumulació intracel·lular de colesterol esterificat, així com l'activació de vies de senyalització proinflamatòria en macròfags humans (hM $\Phi$ ) i cèl·lules musculars llises de coronària humana (hcVSMC). No obstant això, els sèrums que contenen anticossos anti-P3, tot i tenir el mateix perfil de lipoproteïnes VLDL i LDL, no causen aquests efectes proaterogènics a les cèl·lules vasculares humanes. Els resultats indiquen que els anticossos anti-P3 anul·len l'efecte de sèrums altament proaterogènics sobre la formació de cèl·lules escumoses i la senyalització intracel·lular proinflamatòria, tant en cèl·lules vasculares de conill com humanes.

Els estudis d'imatge PET/CT demostren que els anticossos anti-P3 redueixen la captació de [<sup>18</sup>F]-FDG per l'aorta de conills alimentats amb dieta grassa. Les imatges metabòliques de tomografia d'emissió de positrons i tomografia computada (PET-CT) realitzades a la plataforma preclínica de l'Hospital Vall d'Hebron van mostrar que la dieta grassa va augmentar significativament l'índex de captació de glucosa estàndard SUV (de l'anglès *standardized uptake value*) a les regions superior i mitjana de l'aorta dels conills controls. En canvi, als conills immunitzats amb P3, la dieta grassa només va induir lleument SUV en aquestes regions aòrtiques. L'alt impacte dels anticossos anti-P3 a la captació de glucosa en els estudis d'imatge confirmen la resta de resultats moleculars, confocals i immunohistoquímics obtinguts en aquest estudi, tot validant la gran eficàcia antiinflamatòria dels anticossos anti-P3 en macròfags i cèl·lules musculars llises de la paret vascular exposades a altes concentracions de lipoproteïnes proinflamatòries.

L'ecografia Doppler revela que els anticossos anti-P3 bloquegen l'augment de l'índex de resistència arterial (IRA) induït per la dieta grassa en les caròtides dels conills. La dieta grassa va augmentar l'índex de resistència arterial a les artèries caròtides externes i internes dels conills controls. No obstant això, la dieta grassa va induir lleument l'IRA, i només en l'artèria caròtida interna, als conills immunitzats amb P3. Igual que a l'aorta, la dieta grassa també va induir dràsticament l'acumulació d'èsters de colesterol a les caròtides dels conills controls i els anticossos anti-P3 van reduir eficientment l'acumulació de colesterol esterificat a l'artèria caròtida externa.

### **Els pèptids estabilitzats derivats de P3 (DP3) inhibeixen eficientment el procés d'agregació de les LDL induït pels enzims lipolítics presents a l'íntima arterial**

**Resum.** Utilitzant una gran varietat d'experiments bioquímics, biofísics i moleculars, hem demostrat que la versió original del pèptid P3 (LP3) i la seva versió retroenantiomèrica (DP3), però no un pèptid irrellevant (IP321), bloquegen eficientment l'agregació d'LDL induïda pels enzims lipolítics esfingomielinasa (SMase) i fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>), presents a l'íntima arterial. Tot i que els pèptids LP3 i DP3 inhibeixen eficientment les alteracions en la mida de les partícules d'LDL, així com també les de la càrrega i les de pèrdua d'esfingomielina (SM) induïdes per SMase, no poden impedir les alteracions induïdes en els mateixos paràmetres per l'enzim PLA<sub>2</sub>. No

obstant això, tots dos pèptids són capaços de protegir l'apolipoproteïna B-100 (ApoB-100) respecte de les alteracions conformacionals induïdes per aquests enzims. Els estudis proteòmics, de modelatge *ab initio* i els de dinàmica molecular han mostrat que aquests pèptids són capaços d'establir interaccions electrostàtiques estables amb seqüències bàsiques de l'ApoB-100, tot estabilitzant-ne la conformació, fins i tot en condicions de fosfolipòlisi extrema de les LDL. La preservació conformacional de l'ApoB-100 garanteix una protecció extrema de l'LDL respecte de l'agregació induïda per la fosfolipòlisi.

### ***Resultats específics***

El pèptid DP3, la versió retroenantiomèrica de P3, mostra una major estabilitat que el pèptid original P3 (LP3) en sèrum humà. La versió retroenantiomèrica del pèptid es va sintetitzar utilitzant D-aminoàcids i per això la seqüència no és reconeguda per les proteases sèriques; això fa que la vida mitjana del pèptid s'allargui considerablement.

Els pèptids LP3 i DP3 bloquegen l'increment de la turbidimetria de l'LDL induït pels enzims SMase i PLA<sub>2</sub> de manera dependent de la dosi i el temps. La turbidimetria d'LDL induïda pels enzims SMase i PLA<sub>2</sub> va reflectir el grau d'agregació de les LDL i es va inhibir gairebé del tot (més d'un 80%) en presència d'aquests pèptids.

Els pèptids LP3 i DP3 disminueixen el percentatge de partícules agregades induïdes pels enzims SMase i PLA<sub>2</sub>. Els experiments de microscòpia electrònica van revelar una reducció molt significativa del percentatge de partícules d'LDL agregades quan l'LDL es va modificar en presència dels pèptids LP3 i DP3.

Els pèptids LP3 i DP3 bloquegen les alteracions en la composició de fosfolípids de l'LDL induïdes per l'enzim SMase, però no les induïdes per l'enzim PLA<sub>2</sub>. La cromatografia HPTLC es va utilitzar per separar els fosfolípids (PL) que componen les LDL. Aquest procediment va revelar que els fosfolípids (PL) principals a les LDL eren: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -PC) i esfingomielina (SM). L'SM es va degradar totalment de les LDL en tractar-les amb SMase. Per contra, en presència d'LP3 i DP3, l'SM de les LDL no es va degradar per SMase. La PLA<sub>2</sub> va eliminar completament la fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -PC) de les LDL, tot produint un fort augment en el contingut d'L- $\alpha$ -LysoPC i, en aquest cas, els pèptids no van ser eficients per inhibir aquests efectes de la PLA<sub>2</sub> sobre l'LDL.

Els pèptids LP3 i DP3 bloquegen les alteracions en el perfil electroforètic d'LDL induïdes per SMase, però no les induïdes per PLA<sub>2</sub>. L'electroforesi en gel de gradient (GGE) va mostrar que la SMase produïa una forta pèrdua de la banda corresponent a l'LDL. Això era perquè la mida dels agregats d'LDL eren superiors als porus dels gels GGE, fet que impossibilitava l'entrada dels agregats d'LDL més grans. La pèrdua de banda induïda per SMase va ser inhibida eficientment per LP3 i DP3. En contrast, aquests pèptids no van tenir cap efecte sobre el patró GGE induït pel tractament de les LDL amb PLA<sub>2</sub>.

El pèptid DP3 bloqueja els canvis conformacionals de l'ApoB-100 induïts pels enzims SMase i PLA<sub>2</sub>. L'anàlisi de l'ApoB-100 per Western blot va permetre determinar les modificacions conformacionals de l'ApoB-100 produïdes pel tractament fosfolipolític. Tant l'SMase com la PLA<sub>2</sub> van augmentar l'exposició dels epítops reactius de la proteïna ApoB-100 als anticossos anti-ApoB-100 i els pèptids LP3 i DP3 van protegir l'ApoB-100 dels canvis conformacionals induïts per aquests enzims.

Els pèptids LP3 i DP3 interaccionen electrostàticament amb seqüències específiques de l'ApoB-100 enriquides en lisines. La proteòlisi limitada de l'apolipoproteïna ApoB-100 combinada amb la proteòmica basada en espectrometria de masses (LC-MS/MS) va evidenciar que el pèptid DP3 protegeix seqüències específiques de l'ApoB-100, ja sigui per interacció directa o per remodelació de l'estructura proteica. L'alta coincidència entre les seqüències protegides per DP3 i les protegides per agregació indica que la majoria de les seqüències protegides per DP3 participen en l'agregació d'LDL, fet que explica l'alta eficiència d'aquests pèptids per prevenir l'agregació de les LDL. Es va fer un experiment d'acoblament de cos rígid basat en energia entre la proteïna ApoB-100 i les estructures del pèptid DP3 prèviament modelades per mètodes *ab initio*. Curiosament, vam descobrir que una de les posicions de menor energia de les simulacions d'acoblament acomodava DP3 en una orientació tal que els residus Lys3228, Lys3231 i Lys3233 (però no Lys3226 ni Lys3236) de l'ApoB-100 quedaven profundament soterrats després de la seva unió del pèptid.

**La preservació de baixos nivells del receptor LRP1 als cardiomiòcits afavoreix una millora de la sensibilitat a la insulina i una menor tendència a l'obesitat**

**Resum.** Al nostre grup hem desenvolupat un model de ratolí amb inducció condicional i específica de deficiència del receptor LRP1 als cardiomiòcits. Aquest model ha estat

essencial per demostrar que LRP1 és capaç de regular els nivells circulants del pèptid natriurètic ANP i que, mitjançant aquest mecanisme, modula la senyalització del receptor de l'ANP, l'NPRA, i l'oxidació dels àcids grassos al fetge. També hem demostrat que al fetge, aquesta via de senyalització de l'NPRA està acoblada a l'activació de l'enzim AMPK, clau per a una integració adequada del metabolisme lipídic i glucídic.

La deficiència del receptor LRP1 als cardiomiòcits afavoreix una major sensibilitat a la insulina i una menor tendència a l'obesitat en afavorir una major oxidació d'àcids grassos al fetge, la qual cosa comporta una major despesa energètica. Els nostres estudis van evidenciar que el pes corporal dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> era menor que el dels controls en tots els temps de creixement testats. Si bé el contingut de triglicèrids (TG) i àcids grassos (FA) va ser inferior al fetge dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>, no es van trobar diferències en el contingut de lípids al cor o al múscul esquelètic entre els grups. També es va observar que en comparació amb els ratolins controls, els ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> tenien menor intolerància a la glucosa i menor àrea sota la corba (AUC) en el test de tolerància a la glucosa. L'índex de glucosa, insulina i resistència a la insulina (IR) (HOMA-IR) també es va reduir en els ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> en comparació amb els ratolins controls. Els experiments realitzats al Sistema de Monitorització d'Animals de Laboratori (CLAMS) van palesar que els ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> tenien un major consum d'O<sub>2</sub> i despesa energètica que els ratolins controls durant les fases de llum i fosc.

Els cardiomiòcits amb deficiència d'LRP1 mostren una major activitat de l'enzim corina, que afavoreix una major alliberament cardíac del pèptid natriurètic ANP (de l'anglès *atrial natriuretic peptide*) al torrent sanguini. Per identificar les proteïnes cardíques potencialment involucrades en el fenotip metabòlic favorable dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>, vam fer una anàlisi proteòmica diferencial entre els cors procedents del grup deficient i del grup control. La disminució als nivells d'ANP al cor dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> es va validar per Western blot, tot suggerint un major alliberament de l'ANP dels cors deficients en LRP1. Els estudis d'immunoprecipitació van evidenciar que al cor, corina (enzim responsable del processament i alliberament de l'ANP) forma complexos amb inhibidors de proteases, com ara les serpine. El nombre de complexos corina/serpina va ser superior al cor dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>. La unió de serpina a corina crea impediments estèrics a la unió d'inhibidors efectius i això permet la prolongació del



temps d'activació de corina. Aquest mecanisme fa que els nivells circulants d'ANP siguin superiors als ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>.

L'activació de la senyalització d'ANP-NPRA està vinculada a l'activació d'AMPK i a l'augment de l'oxidació de FA al fetge dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup>. Es van analitzar els nivells de mediadors crucials per a la senyalització del receptor de l'ANP, el NPRA (de l'anglès *natriuretic peptide receptor A*), com ara cGMP (de l'anglès *cyclic Guanosine MonoPhosphate*) i VASP (de l'anglès *VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein*) als teixits perifèrics, incloent-hi el fetge, el múscul esquelètic i el cor. Es van observar nivells augmentats de cGMP i pVASP al fetge i al múscul esquelètic dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> respecte dels controls. Aquest increment als mediadors de la senyalització del receptor NPRA es va anul·lar quan els ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> van ser tractats amb un antagonista del receptor NPRA, l'A71915. La senyalització incrementada de cGMP/pVASP es va associar a un augment de la fosforilació d'AMPK (de l'anglès *AMP-induced Kinase*) al fetge però no al múscul esquelètic. L'activació hepàtica d'AMPK va ser confirmada per l'augment de la fosforilació d'ACC (de l'anglès *Acetil-CoA Carboxilase*), l'enzim *downstream* de la via que és fosforilat per l'enzim pAMPK. Per explorar l'impacte potencial de l'activació de pAMPK en l'oxidació d'àcids grassos, es van estudiar els nivells de l'enzim CPT1 (de l'anglès *Carnitine PalmitoylTransferase I*), un enzim mitocondrial clau per a l'oxidació d'àcids grassos, i dels components principals del sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS), responsable de la respiració mitocondrial, a més dels nivells d'UCP3 (de l'anglès *mitochondrial Uncoupling Protein*), un indicador de la resposta mitocondrial a la major aportació d'àcids grassos; tots els nivells van ser analitzats mitjançant la tècnica Western blot. Els nivells augmentats d'aquests mediadors de l'oxidació dels àcids grassos al fetge dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> no es van observar als ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> tractats amb l'antagonista d'NPRA, l'A71915, tot indicant que aquesta via d'oxidació d'àcids grassos era dependent de l'activació del receptor NPRA pel ANP.

La senyalització activada del receptor NPRA està associada a un increment en la capacitat de captació d'àcids grassos al fetge. Els experiments de biodistribució d'àcids grassos (OFG, de l'anglès *oral fat gavage*) van mostrar un augment a la captació de [<sup>3</sup>H]-TG i [<sup>3</sup>H]-FFA pel fetge dels ratolins *cm-Lrp1*<sup>-/-</sup> que es va bloquejar al grup de ratolins tractats amb l'antagonista d'NPRA, l'A71915. A diferència del fetge, es va produir una menor captació de [<sup>3</sup>H]-TG i [<sup>3</sup>H]-FFA pel teixit adipós blanc dels ratolins

*cm-Lrp1-/-*. El tractament amb l'inhibidor d'NPRA va igualar el pes i la grandària dels adipòcits de teixit adipós blanc entre ratolins *cm-Lrp1-/-* i *cm-Lrp1+/+*. Els experiments realitzats al Sistema de Monitorització d'Animals de Laboratori (CLAMS) van mostrar que el tractament de ratolins *cm-Lrp1-/-* amb l'antagonista del receptor NPRA inhibeix l'increment de l'oxidació lipídica observat durant el dia i l'augment de l'oxidació de glucosa observat durant la nit. No hi va haver diferències en el consum d'oxigen i la despesa energètica entre els ratolins *cm-Lrp1-/-* i els ratolins controls tractats amb els antagonistes NPRA. Aquests resultats van evidenciar que la senyalització de l'ANP modula la capacitat del fetge dels ratolins *cm-Lrp1-/-* per captar i oxidar àcids grassos i, a través d'aquest mecanisme, controla el metabolisme general de l'organisme.

## **NOVES EINES ÒMIQUES DE DIAGNÒSTIC EN MALALTIA CARDIOVASCULAR**

### **El receptor LRP1 circulant (sLRP1) és un biomarcador de risc cardiovascular**

En col·laboració amb el Grup d'Epidemiologia Cardiovascular i Genètica de l'IMIM (Dr. Marrugat i Dr. Elosua), el nostre grup va demostrar que els nivells circulants del receptor LRP1 (sLRP1) tenien capacitat predictiva de futurs esdeveniments cardíacs a la població REGICOR (Registre Gironí del Cor). L'augment d'una unitat en els nivells circulants del receptor sLRP1 es traduïa en un augment del 40% del risc cardiovascular. Els nivells d'sLRP1 circulants s'associen amb risc d'infart agut de miocardi independentment d'altres factors de risc cardiovascular. Això és perquè aquest biomarcador reflecteix mecanismes patològics locals de la paret vascular dependents d'aquest receptor.

### **El receptor LRP1 circulant (sLRP1) és un biomarcador d'extensió de greix epicardíac en població general i en població de diabètics tipus 1.**

Els estudis moleculars realitzats amb les mostres de plasma dels pacients, conjuntament amb els estudis de tomografia computada multidetecció realitzats a la Unitat d'Imatge Cardíaca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (població general), així com en pacients tractats a la Unitat d'Endocrinologia del mateix hospital, van demostrar que el receptor sLRP1 reflecteix l'extensió del greix epicardíac a diferents poblacions de pacients.

### **Els microRNA (miRNA) són nous biomarcadors d'aterosclerosi subclínica i extensió de greix epicardíac.**

Els estudis moleculars efectuats amb mostres de

plasma dels pacients als quals es van fer estudis de tomografia computada multidetecció a la Unitat d'Imatge Cardíaca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, ens va permetre identificar nous biomarcadors òmics al plasma que reflecteixen l'aterosclerosi subclínica i l'extensió de greix epicardíac.

**Els microRNA (miRNA) com a biomarcadors de l'acumulació de lípids a nivell intramiocardíac.** Els estudis moleculars realitzats amb mostres de plasma dels pacients de l'estudi internacional PIRAMID (Pioglitazone Influence on tRiglyceride Accumulation in the Myocardium In Diabetes) als quals es va fer la determinació de lípids intramiocardíacs i remodelatge cardíac mitjançant ressonància magnètica, ens va permetre identificar nous biomarcadors d'acumulació lipídica intramiocardíaca gràcies a la col·laboració amb el Dr. Hildo Lamb (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands).

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

Gran part dels resultats d'aquest projecte han estat obtinguts per la col·laboració entre el nostre grup bàsic i grups clínics atrets pel potencial impacte clínic i translacional de la nostra recerca. Cal destacar la nostra activa col·laboració amb el Dr. Bayés Genís, director de l'Institut de Cardiologia i del Departament de Cardiologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol. També és i ha estat altament productiva la nostra col·laboració amb la Unitat d'Imatge Cardíaca (Dr. Carreras, Dr. Leta i Dr. Vilades) i amb la Unitat d'Endocrinologia (Dr. Pérez i Dr. Gil) de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Per últim, cal destacar la rellevància dels resultats obtinguts per la col·laboració amb el grup d'Epidemiologia Cardiovascular de l'IMIM (Dr. Elosua i Dr. Marrugat) i també la que tenim establerta amb clínics especialistes en medicina nuclear (Dr. Castell) de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. L'alta i activa participació dels clínics en aquest projecte ha contribuït a l'alta translacionalitat dels resultats obtinguts.

Els principals avenços fruit d'aquest projecte són: 1) noves eines terapèutiques (anticossos i pèptids) per modular específicament la funció patològica d'LRP1 sense alterar les seves funcions essencials, útils en arteriosclerosi i probablement en altres malalties en què l'acumulació tissular de colesterol contribueix de forma determinant a la progressió de la malaltia; 2) nous models *in vivo*, com ara un model murí de

deficiència específica i condicional d'LRP1 en cardiomiòcits i un nou model de conill amb immunització protectora davant d'arteriosclerosi; 3) evidències *in vivo* d'un nou eix cor-fetge controlat pels nivells del receptor LRP1 als cardiomiòcits que modula la senyalització de l'ANP al fetge i afavoreix una major captació i oxidació d'àcids grassos pel fetge; eix que és determinant en el consum energètic i el pes corporal; 4) nous biomarcadors de remodelatge cardíac, i 5) nous biomarcadors òmics i proteics amb valor predictiu de risc coronari en població general, i estretament associats amb aterosclerosi subclínica i extensió de greix epicardíac.

L'alta productivitat, qualitat i translacionalitat de les publicacions obtingudes per la investigació desenvolupada atorguen a aquest projecte un paper clau en l'evolució de les nostres línies d'investigació cap a la clínica, ja que proporcionen noves eines per intervenir en nous mecanismes crucials en la malaltia de l'arteriosclerosi, i també en altres malalties, com les cardiopaties isquèmiques, diabètiques i dilatades, patologies de prevalença creixent a les societats occidentals. Cal remarcar que aquest projecte ha situat el nostre equip en una posició favorable per generar nous recursos econòmics, tant d'agències públiques com privades.

Per continuar avançant a partir dels resultats del projecte 201521-10 de la Fundació La Marató de TV3, pretenem dur a terme els desenvolupaments experimentals següents a curt termini i mitjà: 1) purificar els anticossos anti-P3 i validar-ne l'eficàcia antiateroscleròtica en models preclínics (PCSK9 *mini-pigs*) d'arteriosclerosi; 2) utilitzar els anticossos purificats com una nova eina de detecció dels pèptids terapèutics en nous estudis de biodistribució i eficàcia dels pèptids que també tenim previst de dur a terme en models preclínics; 3) comparar l'eficàcia dels nous anticossos i pèptids desenvolupats en aquest projecte amb la dels fàrmacs hipolipemians habitualment utilitzats a la pràctica clínica i determinar si les nostres noves eines terapèutiques funcionen de forma complementària a les habituals. Per progressar amb els nous biomarcadors identificats de matriu extracel·lular (ECM), en col·laboració amb el grup de la Dra. Samouillan (Toulouse University) tenim previst validar aquests biomarcadors en ventricles humans obtinguts d'autòpsies i cors explantats. La nostra col·laboració amb els serveis d'Anatomia Patològica i de Cardiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau fa que aquestes mostres estiguin actualment disponibles per analitzar el potencial d'aquests nous biomarcadors en mostres humanes. En col·laboració amb el Dr. Laurent Duca analitzarem l'impacte de la degradació de la matriu extracel·lular i,

particularment, dels pèptids derivats d'elastina en la generació de cèl·lules escumoses en models *in vitro* i *in vivo*. Per validar els nous biomarcadors òmics i proteòmics identificats, hem establert noves col·laboracions amb clínics que tenen disponibilitat de mostres de pacients. Ja hem iniciat la col·laboració amb el Dr. González Juanatey (Servei de Cardiologia del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago), amb el Dr. Masana (Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus) i amb el Dr. Guerra (Departament de Cardiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).

#### **4. Bibliografia científica generada**

Olga Bornachea, Aleyda Benitez-Amaro, Angela Veà, Laura Nasarre, David de Gonzalo-Calvo, Juan Carlos Escola-Gil, Lidia Cedo, Antoni Iborra, Laura Martínez-Martínez, Candido Juárez, 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-Cortés.

*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-Cortés.

*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. Chiabrandó.

*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, Veá A, Llorente-Cortés 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, Llucià-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-Cortés 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-Cortés 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, Vea 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, Vea 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