



**Fundació**  
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM  
Malalties del cor



# **PAPER DELS PRODUCTES DE LA GLICACIÓ AVANÇADA (AGES) EN EL DANY PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ DEL COR ENVELLIT I DIABÈTIC: DEL RATOLÍ A L'HUMÀ**

**Marisol Ruiz Meana**

Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

**Vicente Andrés García**

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - Madrid

## 1. Resum

La glicació avançada no enzimàtica és una reacció química altament tòxica i ubiqua que indueix canvis terminals en les proteïnes extracel·lulars i intracel·lulars. L'acumulació de proteïnes (i altres macromolècules) glicades, anomenades genèricament *productes de glicació avançada* o *AGEs*, s'ha descrit en diverses malalties relacionades amb l'edat, incloent-hi la insuficiència renal, les malalties neurodegeneratives, les cataractes i les inflamacions cròniques. Tanmateix, es desconeix quin és el seu paper fisiopatològic en l'envelliment del cor. L'objectiu d'aquest projecte ha estat investigar la contribució dels AGEs al deteriorament funcional dels cardiomiòcits durant l'envelliment i l'augment de la seva vulnerabilitat al dany per isquèmia-reperfusió i la insuficiència cardíaca, dues de les malalties més prevalents en els pacients grans. L'assoliment d'aquest objectiu permetria identificar noves dianes terapèutiques.

Mitjançant l'ús d'un ampli espectre d'aproximacions tècniques, incloent-hi l'anàlisi per *Western blot*, la immunofluorescència, ELISA i la proteòmica quantitativa d'alt rendiment, hem establert per primer cop el grau d'acumulació d'AGEs al cor de ratolins joves (4-6 mesos) i vells (>20 mesos) i hem identificat les proteïnes cardíques específicament afectades pel dany glicatiu. Atès que l'acumulació d'AGEs es pot modular per sistemes de detoxificació endògens, principalment la via de la glioxalasa (el sistema enzimàtic encarregat d'eliminar alguns dels precursors químics implicats en la generació d'AGEs), hem investigat l'impacte de l'envelliment en l'activitat/expressió de la glioxalasa al cor de ratolins i humans de diferents edats. Per dilucidar les conseqüències funcionals dels AGEs al cor, hem estudiat el maneig de calci cel·lular, el dany oxidatiu, la respiració mitocondrial i la capacitat antioxidant en cardiomiòcits i mitocondris aïllats de ratolins amb envelliment fisiològic i els seus homòlegs joves i en mostres de pacients. Finalment, per establir la relació causa-efecte entre els AGEs i la (dis)funció dels cardiomiòcits durant l'envelliment, hem desenvolupat un model de cultiu de cardiomiòcits HL-1 amb acumulació intracel·lular d'AGEs, en el qual es van repetir tots els assajos funcionals prèviament utilitzats en les mostres de teixit miocàrdic.

En paral·lel, com un subestudi independent, hem posat a prova el paper dels AGEs com a predictors de cardiopatia isquèmica i moduladors del dany per isquèmia-

reperfusió en pacients, així como la seva contribució a la disfunció cardíaca. Per assolir aquest objectiu, hem quantificat els nivells d'AGEs circulants i tissulars (mitjançant la detecció no invasiva d'autofluorescència a l'avantbraç i al cristal·lí de l'ull) en una cohort de pacients diabètics de tipus 2 de diferents edats. Com a grup control s'ha utilitzat una població no diabètica equivalent en edat i sexe. La correlació entre els nivells d'AGEs, el fenotip clínic del pacient i la incidència d'infart de miocardi silent (detectat per TC/PET coronari) i infart agut de miocardi (determinat per l'extensió de la necrosi quantificada per RMN) es troba en fase d'anàlisi en el moment de redactar aquesta memòria.

## 2. Resultats

Utilitzant cardiomiòcits aïllats, mitocondris, vesícules de reticle sarcoplasmàtic (RS) i extractes de miocardi de ratolins c57bl/6 joves (5-6 mesos) i vells ( $\geq 20$  mesos) i de pacients joves ( $< 75$  anys) i grans ( $\geq 75$  anys) sotmesos a cirurgia cardíaca a l'Hospital Vall d'Hebron, hem demostrat per primera vegada que l'envelliment està associat a un augment significatiu dels nivells de proteïnes modificades per AGEs en el cor de ratolins i humans. Al contrari del que s'esperava, el immunomarcatge per fluorescència i l'anàlisi proteòmica van establir que una part significativa dels AGEs acumulats durant l'envelliment es troba en l'espai *intracel·lular* dels cardiomiòcits. L'assaig enzimàtic per espectrofotometria va detectar una reducció de l'eficiència de la via de la glioxalasa-1 (Glo-1, el sistema enzimàtic responsable de la detoxificació dels compostos dicarbonílics, com el metilglioxal, que evolucionen a la formació d'AGEs), malgrat uns nivells preservats de l'expressió de l'enzim. Aquesta deficiència en l'activitat de Glo-1 dona lloc a una menor producció de D-lactat, el metabòlit final de la via de detoxificació, en el miocardi de ratolins vells i pacients grans. D'altra banda, els nivells de glutatió, un enzim antioxidant que actua com a cofactor de la Glo-1, també es va trobar reduït en el miocardi murí i humà dels individus vells. Aquests resultats indiquen que, més enllà de l'acumulació passiva d'AGEs en la matriu extracel·lular que s'havia descrit prèviament, el cor desenvolupa durant l'envelliment una deficiència d'un dels sistemes de detoxificació endògena més universals, fet que afavoreix l'aparició de dany glicoxidatiu intracel·lular.

Entre les proteïnes afectades per la glicació durant l'envelliment es va identificar el receptor de rianodina (RyR) del reticle sarcoplasmàtic (RS), tant en ratolins com en humans, segons els resultats obtinguts per tècniques independents com ELISA, immunofluorescència i proteòmica diferencial. Es va comprovar que la glicació del RyR té conseqüències funcionals sobre el maneig de calci per part de l'RS, que consisteixen en un augment de la fuga espontània de calci des del RyR. Com que l'RS forma unitats anatòmiques i funcionals amb els mitocondris circumdants, amb els quals intercanvia calci i ATP de manera bidireccional, hem investigat l'impacte d'aquesta fuga de calci des de l'RS sobre la funció i la integritat dels mitocondris. Els nostres resultats indiquen que durant l'envelliment els mitocondris cardíacs presenten precipitats de calci en la matriu, una observació que es va corroborar tant en ratolins com en humans. Aquest excés de calci precipitat té efectes perjudicials sobre la funció mitocondrial, que s'ha detectat com una reducció de la seva capacitat aeròbica màxima i una disminució en el nombre de mitocondris funcionals en el cor dels ratolins i humans d'edat avançada.

Finalment, per establir la relació causa-efecte entre la glicació intracel·lular dependent de l'edat, el maneig alterat de calci i la disfunció mitocondrial, vam exposar crònicament els cardiomiòcits HL-1 en cultiu a condicions que simulaven l'envelliment, és a dir, inhibició de la Glo-1 i excés de metilglioxal. Els cardiomiòcits HL-1 exposats a aquestes condicions van desenvolupar un augment d'AGEs intracel·lulars en 3 dies. Tal com havíem observat en cardiomiòcits intactes de ratolins vells, el RyR va ser diana de dany glicatiu en les cèl·lules HL-1. La glicació del RyR va recapitular les alteracions de l'intercanvi de calci entre l'RS i els mitocondris presents en el cor vell.

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

#### **Quina és la rellevància de l'estudi?**

- Les nostres dades demostren per primera vegada una deficiència en el sistema de detoxificació dels compostos dicarbonílics al cor com un distintiu comú d'envelliment, ja que està present tant en ratolins vells com en pacients grans. La reducció de l'activitat de Glo-1 s'havia associat prèviament a la gravetat de

l'ateroesclerosi, la cardiomiopatia diabètica i la malaltia coronària, i ara aportem evidències sobre la seva contribució a la fisiopatologia de l'envelliment cardíac.

- Hem identificat el RyR com una diana important de dany glicatiu en els cardiomiòcits envellits; la glicació del RyR altera el maneig de calci per part de l'RS. L'adequada funció del RyR és essencial per mantenir l'activitat contràctil i l'homeòstasi del calci en el cor; les alteracions en la cinètica d'alliberament de calci per part de l'RS han estat prèviament associades a la disfunció contràctil de la insuficiència cardíaca i a la mort cel·lular durant la isquèmia-reperfusió miocardiàca. Els nostres resultats indiquen que el dany glicatiu endogen del RyR pot participar en l'augment de l'extensió de la necrosi durant l'infart de miocardi i en una susceptibilitat més gran a desenvolupar insuficiència cardíaca consistentment observats en els pacients d'edat avançada.

- Com que el calci mitocondrial és fonamental per ajustar de manera dinàmica la demanda amb l'aportació energètica i com que depèn directament de la transferència de calci des de l'RS, els nostres resultats indiquen que la glicació del RyR pot ser una causa del desacoblament en la comunicació RS-mitocondris durant l'envelliment i del dany mitocondrial que es produeix com a conseqüència d'això. El cor és l'òrgan amb més dependència de la capacitat aeròbica mitocondrial. Per tant, el dany mitocondrial secundari a la sobrecàrrega de calci no només pot participar en una pitjor resposta a la isquèmia-reperfusió, sinó que pot trobar-se a la base d'una tolerància més baixa a l'exercici i l'estrès del cor envellit.

### **Quines són les possibles implicacions clíniques?**

- Els nostres resultats han identificat un mecanisme fisiopatològic prèviament desconegut implicat en l'envelliment cardíac que pot afavorir la transició d'un cardiomiòcit sa cap a un cardiomiòcit insuficient i augmentar-ne la vulnerabilitat a la isquèmia-reperfusió miocardiàca.
- Proposem la prevenció de la generació de compostos dicarbonílics, l'estimulació de la seva detoxificació o la reducció de les conseqüències funcionals de la glicació del RyR com a possibles estratègies dirigides a millorar la funció mitocondrial en els cardiomiòcits envellits.

En conjunt, aquests resultats obren un nou camp de recerca per identificar les millors aproximacions terapèutiques capaces de prevenir la glicació intracel·lular en els cardiomiòcits (i possiblement altres tipus cel·lulars) durant l'envelliment o reduir les seves conseqüències funcionals en alguns contextos patològics, com el dany per isquèmia-reperfusió.

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

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

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

Intl 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 premsa).

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 premsa).