



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



CARDIOMIOPATIA DIABÈTICA: A LA RECERCA D'UNA NOVA DIANA TERAPÈUTICA

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. Resum

La presència de diabetis *mellitus* provoca el desenvolupament d'una cardiomiopatia específica que incrementa la incidència de la mortalitat d'origen cardíac en els pacients que la pateixen. Aquesta cardiomiopatia, coneguda com a *cardiomiopatia diabètica* (CD), es caracteritza per la presència de disfunció ventricular en absència de malaltia coronària arterial i hipertensió. Malgrat la incidència negativa que la diabetis té sobre el cor, actualment encara no existeix cap tractament farmacològic específic contra la CD. Per tant, és absolutament necessari investigar els mecanismes moleculars subjacents d'aquesta malaltia per tal de poder desenvolupar nous fàrmacs que en permetin el tractament.

Més enllà dels seus efectes metabòlics, nombrosos estudis han suggerit que el receptor nuclear PPAR β/δ (*peroxisome proliferator-activated receptor β/δ*) actua com un inhibidor integral dels diferents mecanismes implicats en el desenvolupament de la CD. D'acord amb això, l'objectiu principal d'aquest projecte de recerca va consistir a estudiar els mecanismes mitjançant els quals PPAR β/δ podria prevenir el desenvolupament de la CD. Per assolir aquest objectiu es van utilitzar ratolins amb expressió suprimida de PPAR β/δ tractats amb estreptozotocina a fi d'induir la diabetis. També s'han fet estudis *in vivo* i *in vitro* per examinar si els agonistes activadors de PPAR β/δ inhibien les vies de senyalització implicades en el desenvolupament de la malaltia. Finalment, es van utilitzar mostres de cor de pacients diabètics per verificar el potencial de PPAR β/δ en la prevenció de la CD.

2. Resultats

En primer lloc, es va investigar si els ratolins *knock-out* (KO) PPAR β/δ tractats amb estreptozotocina (STZ) presentaven una acceleració en el desenvolupament de la CD. Per assolir aquest objectiu, es va induir la diabetis mitjançant l'administració d'STZ (50 mg per kg⁻¹ per dia⁻¹ per via IP, durant 5 dies consecutius) a ratolins mascles control (*wild-type*; WT) i KO PPAR β/δ de 12 setmanes d'edat. Els animals es van sacrificar 6 mesos després del diagnòstic de la diabetis.

La inducció de diabetis causava una reducció del pes del cor, tot i que aquesta només assolia significació estadística en els ratolins KO PPAR β / δ . De la mateixa manera, el pes corporal dels ratolins diabètics, especialment dels ratolins KO PPAR β / δ diabètics, era inferior al dels animals control (WT). Això pot justificar l'absència de canvis en la relació HW/BW (pes del cor/pes corporal), malgrat que hi ha una reducció del pes cardíac. En canvi, la relació HW/TL (pes del cor/longitud de la tibia) sí que es reduïa en els animals diabètics, particularment en aquells amb l'expressió suprimida de PPAR β / δ (KO +STZ), fet que indicava l'existència de certa atrofia cardíaca. No obstant això, les anàlisis histològiques realitzades mitjançant la tinció amb hematoxilina i eosina (H&E) no mostraven diferències estadísticament significatives entre grups pel que fa a la mida dels cardiomiòcits, tot i que sí que hi havia una tendència a obtenir una mida més petita en els ratolins KO PPAR β / δ (diabètics i no diabètics) i els WT diabètics.

Les anàlisis realitzades mitjançant ecocardiografia indicaven que les funcions diastòlica i sistòlica no variaven entre els diferents grups de tractament, però sí que suggerien la presència de cardiomiopatia dilatada incipient en els ratolins WT diabètics i els ratolins KO PPAR β / δ , tant diabètics com no diabètics, ja que s'observava un augment d'LV-EDD i LV-ESD (diàmetre del ventricle esquerre al final de la diàstole i la sístole, respectivament). També es va observar un engruiximent de la paret posterior del ventricle esquerre al final de la diàstole (PWTd) i la sístole (PWTs), i del gruix del septe interventricular al final de la diàstole (IVSd) i la sístole (IVSs) en ratolins KO PPAR β / δ no diabètics en comparació amb la resta de grups. En conjunt, aquestes dades suggerien un engruiximent de la paret cardíaca en ratolins KO PPAR β / δ , mentre que la inducció de diabetis amb STZ provocava un aprimament de la paret, acompanyat d'una dilatació de la cambra, especialment en els animals KO PPAR β / δ . D'altra banda, i d'acord amb les dades obtingudes de l'àrea de la vàlvula aòrtica (Ao VTI, *aortic velocity time integral*) i Ao PV (*aortic peak velocity*), els ratolins KO PPAR β / δ desenvolupaven estenosi aòrtica, cosa que era molt més evident en els animals KO diabètics.

En un estudi morfomètric de l'Hospital Universitario Valdecilla dut a terme per investigadors que participaven en aquest projecte també es va demostrar que els animals KO PPAR β / δ diabètics tenien una remodelació cardíaca més agressiva que els animals WT diabètics, amb un engruiximent parietal més gran i un deteriorament de la funció sistòlica longitudinal, després de provocar sobrecàrrega de pressió mitjançant constricció de l'arc aòrtic (TAC; figura 1).

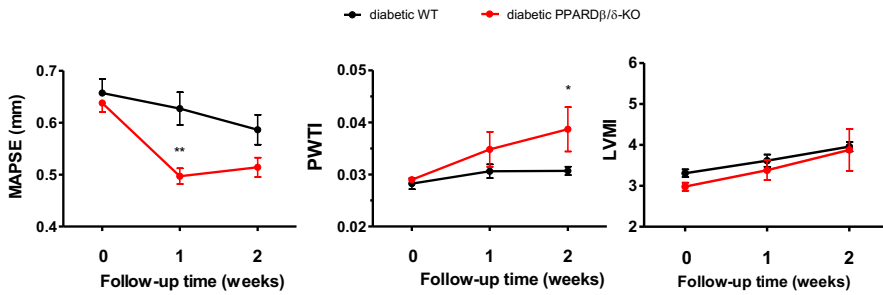


Figura 1. Evolució dels paràmetres ecocardiogràfics dues setmanes després de fer la TAC en animals diabètics WT i KO PPARβ/δ. MAPSE: *mitral annular plane systolic excursion*; PWTI: gruix de la paret posterior indexada per la massa corporal; LVMI: massa ventricular esquerra indexada per la massa corporal.

* $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ enfront de WT STZ.

Posteriorment es va investigar si aquests canvis funcionals cardíacs es corresponien amb una remodelació estructural del cor. Mitjançant la tinció tricròmica de Masson es va demostrar que els ratolins WT i KO PPARβ/δ diabètics, així com els KO PPARβ/δ no diabètics, desenvolupaven, en comparació amb els ratolins control (WT), fibrosi cardíaca intensa i una desorganització fibril·lar en les zones intersticial i perivascular (figura 2). Aquestes dades suggerien també que l'augment de fibrosi en el miocardi no justificava els canvis funcionals cardíacs observats en els ratolins KO PPARβ/δ, descrits anteriorment.

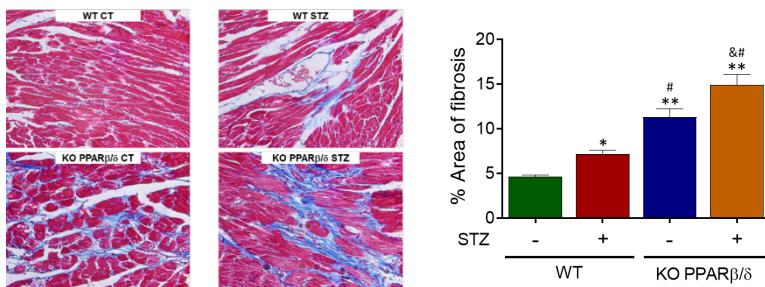


Figura 2. Tinció tricròmica de Masson (esquerra) i corresponent quantificació de l'àrea de col·lagen (dreta) en el cor de ratolins mascles WT o KO PPARβ/δ, 6 mesos després del diagnòstic de la diabetis.

* $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ enfront de WT control; & $P < 0,05$ enfront de KO Control; # $P < 0,05$ enfront de WT STZ.

A continuació, per confirmar el paper de PPARβ/δ, es va investigar si l'activació d'aquest receptor nuclear prevenia el desenvolupament de la CD en el mateix model de diabetis. Així, es va induir la diabetis per administració d'STZ a ratolins mascles C57BL/6 de 12 setmanes d'edat i, un cop diagnosticada la diabetis, es va començar el tractament amb una dieta suplementada amb l'agonista de PPARβ/δ GW0742 (+GW) o

sense aquesta (control), de manera que cada animal rebés una dosi aproximada d'1 mg per kg⁻¹ per dia⁻¹ durant 16 setmanes.

El tractament amb GW0742 prevenia totalment o parcialment la reducció observada del pes corporal, pes del cor i les relacions HW/BW i HW/TL en els animals diabètics (STZ +GW) respecte als animals diabètics no tractats (STZ). No obstant això, cap d'aquests paràmetres no es modificava després de tractar amb GW0742 els animals no diabètics (Ct +GW) respecte eal grup control (Ct o WT). El tractament amb GW0742 tampoc provocava canvis significatius en els paràmetres ecocardiogràfics en cap dels grups analitzats, fossin diabètics o no.

Mitjançant la tinció H&E es va observar que l'agonista de PPAR β/δ prevenia parcialment la disminució de la mida dels cardiomiòcits induïda per STZ i, més destacable encara, la tinció tricròmica de Masson demostrava que GW0742 revertia la fibrosi que desenvolupaven els ratolins diabètics (STZ +GW; figura 3).

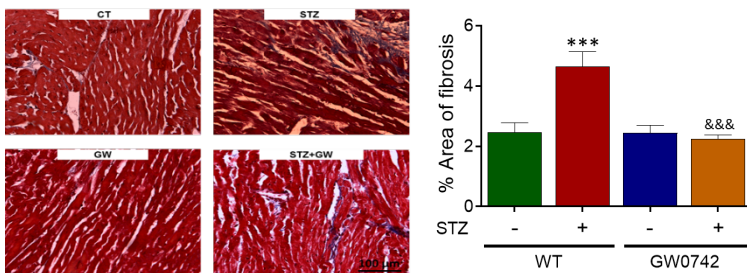


Figura 3. Tinció tricròmica de Masson (esquerra) i la corresponent quantificació de l'àrea de col·lagen (dreta) en cor de ratolins mascles control (Ct o WT) o diabètics (STZ) tractats amb (+GW) o sense GW0742 durant 16 setmanes a partir del diagnòstic de la diabetis.

*** $P < 0,001$ enfront de CT; &&& $P < 0,001$ enfront d'STZ.

Posteriorment es va iniciar l'estudi dels mecanismes moleculars mitjançant els quals PPAR β/δ regulava el desenvolupament de la patologia. Per mitjà d'anàlisis d'RT-PCR en temps real, es va determinar l'expressió gènica de diferents marcadors (figura 4). La inducció de diabetis amb STZ incrementava l'expressió de marcadors d'inflamació en el cor (MCP-1, IL-10, galectina 3/LGALS3), fet que es potenciava en els animals KO PPAR β/δ (KO i KO +STZ). Aquest augment de la inflamació no era causat per la infiltració de macròfags, ja que l'expressió de marcadors d'infiltració àmpliament reconeguts (F4/80, CD68) no es modificava. L'STZ (en els grups STZ i KO +STZ), i en

menor grau la supressió PPAR β/δ (grup KO), també induïa l'expressió de TREM-1, un receptor implicat en l'amplificació de la resposta immunològica innata i el reclutament de cèl·lules inflamatòries després d'un infart de miocardi. També es va observar un increment en l'expressió de l'expressió de CHOP, un marcador d'apoptosi, en animals diabètics induïts amb STZ, especialment en el grup amb expressió suprimida de PPAR β/δ (KO +STZ). D'acord amb el que s'havia observat en les anàlisis histològiques, la inducció de diabetis provocava l'increment de l'expressió gènica de marcadors de fibrosi cardíaca (MMP9, col·lagen de tipus I1a i CTGF). Aquest increment es veia clarament potenciat en el ratolins KO PPAR β/δ diabètics (KO +STZ), tot i que els animals KO PPAR β/δ no diabètics també presenten un augment significatiu de la fibrosi cardíaca.

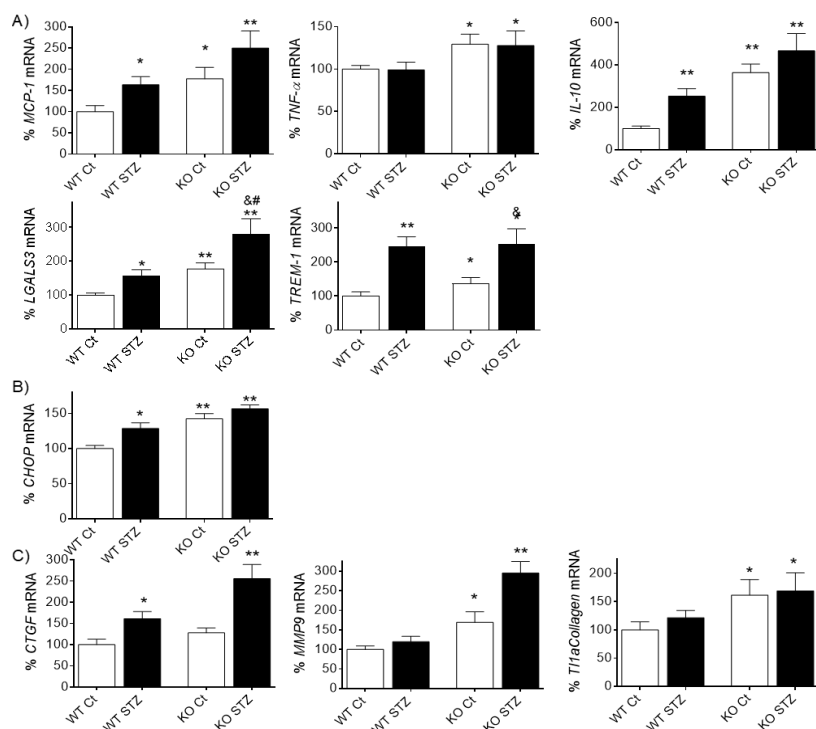


Figura 4. Anàlisi d'expressió gènica en mostres de cor de ratolins mascles WT o KO PPAR β/δ 6 mesos després del diagnòstic de la diabetis. Es mostra l'expressió gènica de marcadors d'inflamació (A), estrès del reticle endoplasmàtic i apoptosi (B) i fibrosi (C).

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$ enfront de WT control; &# $P < 0,05$ enfront de KO control; ### $P < 0,001$ enfront de WT STZ.

En consonància amb els resultats anteriors, es va demostrar també que les respostes proinflamatòria i profibròtica observades després d'induir la diabetis amb STZ eres previngudes, totalment o parcialment, mitjançant el tractament amb l'agonista de PPAR β/δ GW0742 (figura 5).

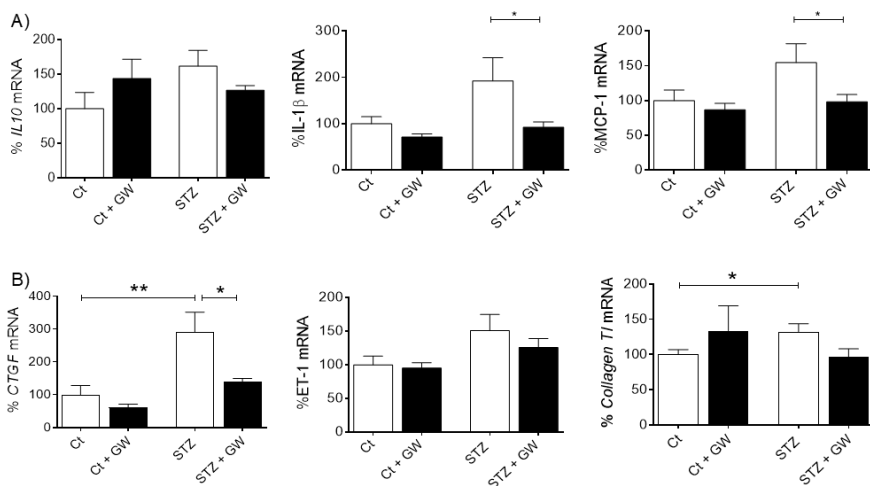


Figura 5. Anàlisi d'expressió gènica en mostres de cor de ratolins mascles control (Ct) o diabètics (STZ) tractats en presència (+GW) o absència de l'agonista de PPAR β/δ GW0742 durant 16 setmanes a partir del diagnòstic de la diabetis.

* $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ enfront de Ct.

A continuació es va investigar si l'activació de PPAR β/δ prevenia el desenvolupament de la cardiomiopatia diabètica en models *in vitro*. Per investigar l'efecte de la hiperglucèmia i PPAR β/δ sobre cèl·lules cardíaques *in vitro*, es va utilitzar la línia de cèl·lules musculars cardíaques de ratolí HL-1, que es van exposar a concentracions baixes (control; 5,5 mmol/L) o elevades (hiperglucèmia, G30; 30 mmol/L) de glucosa, durant 72 hores. També es van tractar amb GW0742 (1 μ mol/L) per corroborar els resultats obtinguts *in vivo*. Com es pot observar en la figura 6, la hiperglucèmia (G30) induïa l'expressió de marcadors proinflamatoris (IL-6, MCP-1), profibròtics (MMP9, TGF- β , col·lagen de tipus I1a) i proapoptòtics (CHOP). D'acord amb això, la hiperglucèmia també reduïa en aquestes cèl·lules els nivells proteics d'I κ B α , una proteïna inhibidora de l'important factor de transcripció proinflamatori NF- κ B (figura 7). L'addició de GW0742 al medi 24 hores abans de l'exposició a la hiperglucèmia prevenia la majoria d'aquests canvis.

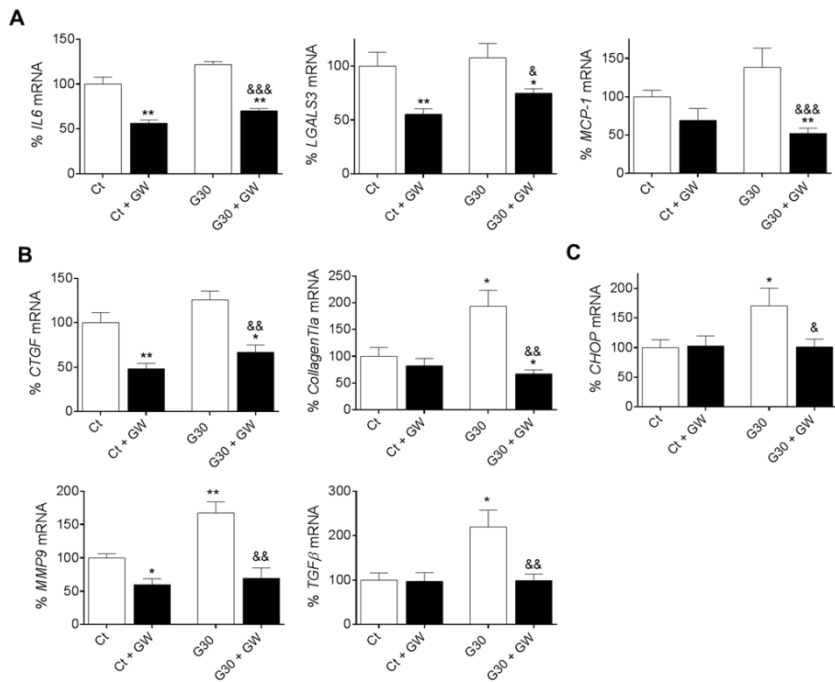


Figura 6. Anàlisi de l'expressió gènica en mostres de cèl·lules HL-1 tractades amb glucosa basal (5,5 mmol/L) o hiperglucèmia (G30; 30 mmol/L) en presència o absència de GW0742 (GW).

* $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ enfront de CT; & $P < 0,05$, && $P < 0,01$ i &&& $P < 0,001$ enfront de G30.

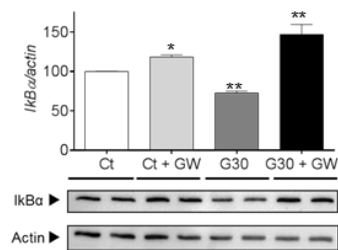


Figura 7. Anàlisi per *Western blot* dels nivells proteics d'IκBα en mostres procedents de cèl·lules HL-1 tractades amb glucosa basal (5,5 mmol/L) o hiperglucèmia (G30; 30 mmol/L) en presència o absència de GW0742 (GW).

* $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ enfront de CT.

Per confirmar els resultats *in vitro* també es va iniciar una sèrie d'experiments amb cardiomiòcits humans derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs), que van confirmar que l'addició de GW0742 al medi 24 hores abans d'exposar les cèl·lules a una alta concentració de glucosa evitava l'increment de la inflamació.

Els estudis duts a terme a l'Hospital Universitario Valdecilla s'han fet en biòpsies del ventricle esquerre de pacients amb estenosi aòrtica diabètics ($n = 23$) o no diabètics ($n = 48$), obtingudes abans del trasplantament, i després de realitzar-los un estudi per ecocardiografia. No es van apreciar diferències significatives en l'expressió gènica de PPARβ/δ entre els pacients diabètics i normoglucèmics, ni tampoc en diferents marcadors de fibrosi (col·lagen de tipus I i III, fibronectina 1, TGF-β) o hipertròfia

cardíaca (β -MHC). No obstant això, les anàlisis de correlació i regressió demostraven que, en els pacients amb estenosi aòrtica normoglicèmics, PPAR β/δ es correlacionava negativament amb la massa ventricular esquerra indexada (LVMI; figura 8).

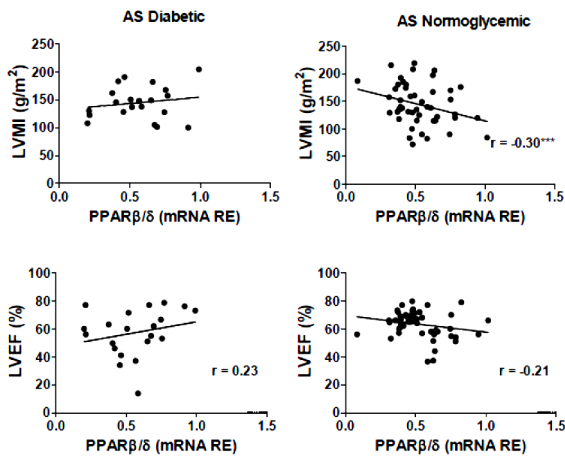


Figura 8. Relació entre l'expressió de PPAR β/δ i alguns paràmetres ecocardiogràfics. LVMI: massa ventricular esquerra indexada per la superfície corporal. LVEF: fracció d'ejecció ventricular esquerra.

En paral·lel, i en relació amb els estudis anteriors, també s'ha investigat el paper de la desacetil·lase Sirt3 (sirtuïna 3) en la fibrosi i la inflamació que es produeixen durant algunes patologies cardíaques com la CD. En aquest estudi vam observar que els ratolins amb expressió suprimida (KO) de SIRT3 presentaven fibrosi cardíaca i inflamació, acompanyades d'un augment de l'activitat del factor de transcripció proinflamatori i profibròtic FOS/AP-1. Això es va confirmar *in vitro* mitjançant estudis de sobreexpressió de SIRT3 en cardiomiòcits neonatals de rata i en cardiomiòcits humans AC16 (figura 9), en els quals es va demostrar que SIRT3 prevenia parcialment la resposta proinflamatòria i proprofibròtica induïda per la citocina TNF- α , en un procés dependent de la via FOS/AP-1. Els nostres resultats també indicaven que aquest efecte es produïa perquè SIRT3 inhibia la transcripció de FOS mitjançant la desacetil·lació específica de la histona H3 en residus lisina K27 en el seu promotor (figura 10). En conjunt, aquestes dades subratllen el paper important que té SIRT3 en la regulació de les respostes profibròtiques i proinflamatòries en cèl·lules cardíaques mitjançant la modulació de la via FOS/AP-1 i, atès que la fibrosi i la inflamació són crucials en la progressió de la CD, suggereixen que l'activació de SIRT3 podria ser una nova diana terapèutica molt interessant.

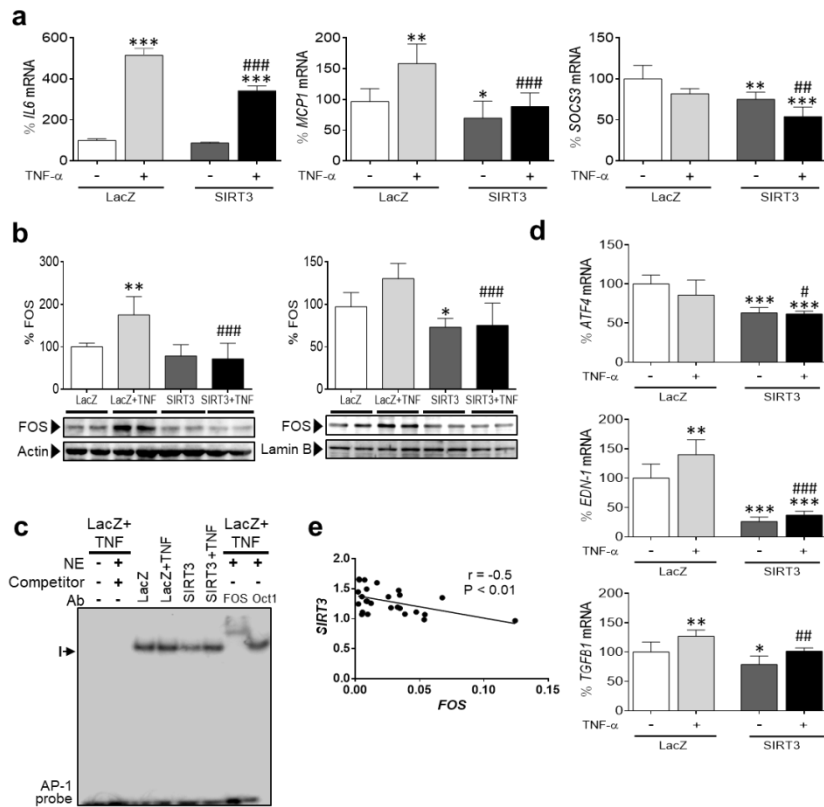


Figura 9. Anàlisi d'expressió gènica de diferents marcadors d'inflamació (A) i fibrosi (D) en mostres procedents de cèl·lules cardíques humanes AC16 transfectades amb plasmidis per sobreexpressar Sirt3 (SIRT3) o un gen control (LacZ), i en presència o absència de l'estímul proinflamatori TNF- α (TNF). **B.** Anàlisi per *Western blot* dels nivells proteics de FOS en fraccions de proteïna citosòlica i nuclear de les mateixes mostres. **C.** Assaig d'activitat d'unió a l'ADN (EMSA) d'AP-1. **E.** Coeficient de correlació lineal de Pearson entre l'expressió gènica de SIRT3 i FOS en mostres de teixit de miocardi ventricular esquerre obtingut de pacients humans.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$ enfront de LacZ # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ i ### $P < 0,001$ enfront de LacZ+TNF- α .

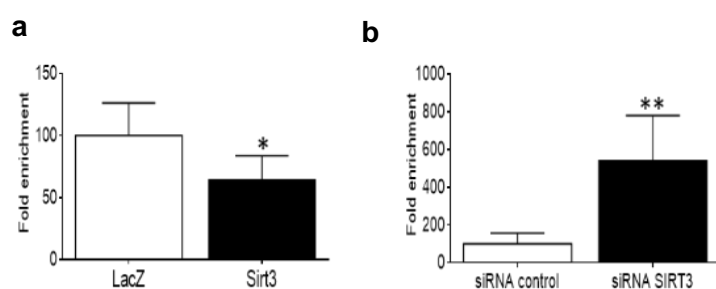


Figura 10. SIRT3 atenua la senyalització de la via FOS/AP-1 per mitjà de la desacetil·lació de residus de lisina K27 en histona 3 (H3). Assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) per determinar els nivells d'histona H3 acetilada en residus lisina K27 del promotor de FOS en cèl·lules cardíques humanes AC16 transfectades amb plasmidis per sobreexpressar Sirt3 (SIRT3) o el gen control (LacZ) (A), o siRNA control o Sirt3 per silenciar l'expressió d'aquest gen *in vitro* (B).

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$ enfront de LacZ (A) o siRNA control (B).

3. Rellevància i possibles implicacions futures

L'activació del receptor nuclear PPAR β/δ ha estat proposada com una diana terapèutica per al tractament de les malalties cardíaques. Malgrat això, es té poc coneixement dels mecanismes mitjançant els quals els activadors d'aquest receptor podrien ser útils per al tractament d'aquestes patologies. Els resultats d'aquest projecte finançat per La Marató de TV3 demostren que l'activació de PPAR β/δ millora la cardiomiopatia diabètica en un model animal, fonamentalment gràcies a la reducció del procés inflamatori i la fibrosi. Tanmateix, els resultats obtinguts pel grup de Santander ens han permès aprofundir en les possibles relacions entre PPAR β/δ i els mecanismes responsables del desenvolupament de la cardiomiopatia diabètica en els pacients que pateixen aquesta malaltia. En conjunt, els nostres resultats confirmen que PPAR β/δ és una diana potencial per tractar la cardiomiopatia diabètica, una malaltia per a la qual encara no hi ha tractaments farmacològics específics. Tot i que actualment no hi ha fàrmacs agonistes de PPAR β/δ comercialitzats, es preveu que properament surti al mercat elafibranor, un agonista de PPAR α i PPAR β/δ , per al tractament de l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH). Un cop es comercialitzi aquest fàrmac, serà més fàcil estudiar-ne els efectes sobre altres indicacions terapèutiques, com és el cas, per exemple, de la cardiomiopatia diabètica. Cal mencionar que la NASH també es caracteritza per la presència d'inflamació i fibrosi, de la mateixa manera que passa durant la cardiomiopatia diabètica. Aquest fet fa pensar que, si l'elafibranor redueix aquests processos i millora aquesta malaltia hepàtica, no és pot descartar que l'activació de PPAR β/δ en el cor pugui millorar la cardiomiopatia diabètica en humans mitjançant la reducció d'aquests processos, tal com hem demostrat prèviament en ratolins. Evidentment caldrà fer assajos clínics per confirmar aquesta possibilitat, però, en qualsevol cas, pensem que aquest projecte ha establert els mecanismes moleculars dels possibles efectes beneficiosos dels activadors de PPAR β/δ en el tractament de la cardiomiopatia diabètica.

4. Bibliografia científica generada

1 Grup de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona

Publicacions

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 premsa, DOI: 10.1038/s41392-020-0114-1.

Comunicacions en congressos

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 maig de 2018.

2. Grup de l'Hospital Universitario Valdecilla, Santander

Selecció de publicacions

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.

Selecció de comunicacions en congressos

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, Àustria.

Pòster.

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 d'octubre de 2018.

Pòster.

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 d'octubre de 2018.

Pòster.

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