



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



PAPER DELS microRNAs ALLIBERATS I EXOSOMIALS, INFLAMATORIS I ASSOCIATS A LA DIABETIS (REx- MIDAS), EN LA MEMÒRIA METABÒLICA ENDOTELIAL

Antonio Ceriello

IDIBAPS Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

1. Resum

Els resultats nocius cardiovasculars (CV) de la diabetis *mellitus* tipus 2 (DM2) encara representen un problema sanitari i socioeconòmic important. Un control puntual i intensiu de glucèmia, lípids i pressió arterial atenua, però no suprimeix, la incidència de complicacions CV tardanes (1, 2). Un control glucèmic primerenc necessita > 10 anys per observar una incidència diversa de criteris de valoració CV, un fenomen conegut com a *memòria metabòlica* o *efecte heretat* (3), mentre que la millora de la glucèmia i la promoció de la pèrdua de pes a través de mesures d'estil de vida saludable tenen múltiples beneficis metabòlics, però no es tradueixen en una incidència més baixa de malalties CV (4). A més, els diferents fàrmacs hipoglucemians s'acompanyen d'una incidència diversa d'esdeveniments CV, malgrat un efecte comparable sobre el control glucèmic (5). De manera similar, les cohorts diabètiques d'assajos dirigits als lípids encara presenten una incidència sorprenentment alta d'esdeveniments CV, tot i l'eficàcia de les estatines i altres intervencions que tenen com a objectiu les LDL (6). En conjunt, aquestes dades suggereixen l'existència d'un risc CV residual en pacients amb DM2 i que la glucosa, els lípids i la pressió arterial no són els únics mediadors de les malalties CV en la DM2 (7, 8).

Les dades recents de la bibliografia científica suggereixen que els pacients amb DM2 experimenten un munt de desequilibris addicionals que podrien contribuir al risc CV residual observat. Entre els diversos mecanismes proposats, la disfunció endotelial, l'acumulació de cèl·lules senescentes i un estat generalitzat d'inflamació crònica de baix grau estan emergint com a actors clau en el desenvolupament de complicacions de la DM2 (8). Tots aquests fenòmens estan modulats per canvis epigenètics duradors, incloses les alteracions dels microRNA (miRNA) (9).

Els miRNA són petits (22 nucleòtids) RNA no codificants, altament conservats, processats a partir de transcripcions més llargues mitjançant l'acció coordinada d'endonucleases d'RNA específiques. Els miRNA generalment s'aparellen amb llocs dins de la regió no traduïda 3' dels RNA missatgers (mRNA), cosa que provoca la descomposició de l'mRNA i el bloqueig de la traducció de proteïnes (10). Evidències creixents suggereixen que els miRNA es secreten activament fora de la cèl·lula i circulen en la sang humana associats amb vesícules o complexos de proteïnes que els protegeixen de la degradació (11). En particular, les vesícules extracel·lulars (EV)

transportades per miRNA estan emergint com a mediadors endocrins/paracrins clau de l'homeòstasi metabòlica i CV (12). De fet, tres articles fonamentals suggereixen que:

- el teixit adipós és una font important d'EV-miRNA circulants que poden regular l'expressió gènica en altres teixits (13);
- els macròfags proinflamatoris del teixit adipós de ratolins obesos secreten EV amb un repertori de miRNA alterat capaç de difondre senyals inflamatoris i induir resistència a la insulina (14), i
- la transferència d'EV circulants de ratolins amb alt contingut de greix a ratolins sense tractament previ és suficient per promoure la disglucèmia, un efecte mediat per miRNA específics (15).

També s'ha suggerit que un contingut de miRNA alterat en les EV podria donar suport al desenvolupament de complicacions CV de la DM2. Per exemple, un manuscrit revolucionari va mostrar que l'intercanvi de miR-126 mitjançant EV dona suport al creixement endotelial, un mecanisme que es veu atenuat per la DM2 (16). De manera similar, les EV derivades de cardiomiòcits de rates diabètiques tenen un contingut més alt de miR-320 que inhibeix els gens diana en les cèl·lules endotelials (EC) receptores, cosa que atenua la migració endotelial i la formació de tubs (17). Un altre estudi va mostrar que alts nivells de glucosa promouen l'eliminació de les EV endotelials que porten miR-503, fet que indueix la seva transferència de les EC als perícits vasculars, cosa que en fomenta la migració i proliferació deteriorades (18).

Prenent com a referència aquests antecedents, plantegem la hipòtesi que part del risc CV residual observat en pacients amb DM2 pot atribuir-se a alteracions en la càrrega útil dels miRNA de les EV circulants (9). Així, els principals objectius del projecte van ser:

1. Dosificar l'expressió de miRNA associats a inflamació i rendiment vascular dins de les EV de pacients amb DM2, amb o sense complicacions CV.
2. Obtenir coneixements preliminars sobre la capacitat d'aquestes EV per induir un fenotip proinflamatori en les cèl·lules endotelials quan s'administren *in vitro*.

Bibliografia per al resum

1. Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, *et al.*
Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes.
N Engl J Med. 2017 Apr 13;376(15):1407-1418.
2. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O.
Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes.
N Engl J Med. 2008 Feb 7;358(6):580-91.
3. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA.
10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes.
N Engl J Med. 2008 Oct 9;359(15):1577-89.
4. Look ARG, Wing RR, Bolin P, *et al.*
Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes.
N Engl J Med. 2013;369(2):145-154.
5. Cefalu WT, Kaul S, Gerstein HC, *et al.*
Cardiovascular Outcomes Trials in Type 2 Diabetes: Where Do We Go From Here? Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum.
Diabetes Care. 2018 Jan;41(1):14-31.
6. Dash S, Leiter LA.
Residual cardiovascular risk among people with diabetes.
Diabetes Obes Metab. 2019 Apr;21 Suppl 1:28-38.
7. Gæde P, Oellgaard J, Carstensen B, *et al.*
Years of life gained by multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: 21 years follow-up on the Steno-2 randomised trial.
Diabetologia. 2016;59(11):2298-2307.
8. Prattichizzo F, De Nigris V, Spiga R, Mancuso E, La Sala L, Antonicelli R, Testa R, Procopio AD, Olivieri F, Ceriello A.
Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes.
Ageing Res Rev. 2017Oct31;41:1-17.

9. Prattichizzo F, Giuliani A, De Nigris V, *et al.*
Extracellular microRNAs and endothelial hyperglycaemic memory: a therapeutic opportunity?
Diabetes Obes Metab. 2016 Sep;18(9):855-67.
10. Bartel DP.
Metazoan MicroRNAs.
Cell. 2018;173(1):20-51. [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(18\)30286-1](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(18)30286-1).
11. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B.
Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms.
Trends Biochem Sci. 2016 Oct;41(10):883-892.
12. Xiao Y, Zheng L, Zou X, Wang J, Zhong J, Zhong T.
Extracellular vesicles in type 2 diabetes mellitus: key roles in pathogenesis, complications, and therapy.
J Extracell Vesicles. 2019 Jun 14;8(1):1625677.
13. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, *et al.*
Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues.
Nature. 2017 Feb 23;542(7642):450-455.
14. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, *et al.*
Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. Cell. 2017 Oct 5;171(2):372-384.e12.
15. Castaño C, Kalko S, Novials A, Párrizas M.
Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Nov 27;115(48):12158-12163.
16. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, *et al.*
Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles.
Circulation. 2013 Oct 29;128(18):2026-38.

17. Wang X, Huang W, Liu G, Cai W, Millard RW, Wang Y, Chang J, Peng T, Fan GC. *Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells.*

J Mol Cell Cardiol. 2014 Sep;74:139-50.

18. Caporali A, Meloni M, Nailor A, *et al.*

p75(NTR)-dependent activation of NF- κ B regulates microRNA-503 transcription and pericyte-endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia.

Nat Commun. 2015 Aug 13;6:8024.

2. Resultats

En la publicació principal produïda durant el desenvolupament del projecte (Prattichizzo *et al.*, «CD31 Positive-extracel·lular Vesicles from Patients with Type 2 Diabetes Shuttle a miRNA Signature Associated with Cardiovascular Complications», *Diabetes*, 2021), adaptem un mètode immunomagnètic basat en perles per aïllar EV positives (+) per CD31 en plasma a fi de recol·lectar vesícules derivades de teixits rellevants per a les complicacions de la DM2. Ens centrem en aquest enfocament a causa de l'expressió marcada i específica de CD31, és a dir, la molècula d'adhesió de cèl·lules endotelials plaquetàries (PECAM-1), en plaquetes, cèl·lules immunes i cèl·lules endotelials, tres tipus de cèl·lules que tenen un paper destacat en el desenvolupament de les complicacions relacionades amb la DM2.

A continuació, vam fer una caracterització profunda de les EV aïllades, d'acord amb les pautes MISEV. Vam demostrar que vam poder aïllar les EV CD31+, les quals representen una fracció de les EV plasmàtiques totals amb un origen heterogeni però compatible amb la hipòtesi que les plaquetes i les cèl·lules endotelials són els principals contribuents a aquest grup específic d'EV.

Per explorar la possible associació dels miRNA continguts en les EV CD31+ amb l'estat de la DM2 i les seves complicacions, seleccionem 11 miRNA amb dues característiques:

- i. Paper en el desenvolupament de complicacions CV de la DM2 o potencial diagnòstic prèviament observat en estudis de CV.
- ii. Expressió robusta en les EV CD31+ aïllades.

Aquest panel seleccionat estava compost per miR-126-3p, miR-343, miR-146a-5p, miR-155, miR-195-5p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-320, miR-342-3p, miR-376, miR-422 i miR-451. Quantifiquem els diversos miRNA per qPCR en EV CD31+ aïllades des del plasma d'una cohort transversal de 218 individus, distribuïts en 60 individus sans (Ctrl), 57 amb DM2 no complicada (DM2-NC) i 101 amb DM2 i complicacions (DM2-C). Dels miRNA provats, trobem que 10 es veuen afectats per DM2, mentre que la signatura composta per miR-146a, -320a, -422a, -451a identifica eficaçment els pacients amb DM2 amb complicacions. A més, una altra firma de miRNA continguts en les EV CD31+, és a dir, miR-155, -320a, -342-3p, -376 i -422a, va detectar pacients amb DM2 amb un esdeveniment cardiovascular advers important previ. Molts d'aquests miRNA es correlacionen significativament amb variables clíniques que es considera que tenen un paper clau en el desenvolupament de complicacions.

Finalment, atès que una de les hipòtesis del projecte era explorar si les EV recollides de pacients amb diabetis poden induir un efecte deleteri en les cèl·lules receptores, tractem les cèl·lules endotelials *in vitro* amb EV recollides del plasma dels pacients. Les EV de DM2-NC i DM2-C van augmentar significativament l'expressió de la quimiocina (motiu CC) lligand 2 (CCL2) i interleucina-1 alfa (IL-1 α) en comparació amb les EV de subjectes de control, mentre que només les EV de DM2-C van induir l'expressió de TNF α en cèl·lules endotelials receptores en comparació amb DM2-NC i controls. Finalment, l'expressió d'IL-6, quimiocines (motiu CXC) de lligand CXCL-1 i CXCL-8 no es va veure afectada per cap dels tractaments, fet que possiblement suggereix un efecte proinflamatori peculiar de les EV, en lloc d'una resposta inflamatòria no específica.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els resultats de l'estudi donen suport a la idea que els miRNA transportats per EV es podrien utilitzar com una eina potencial per preveure el desenvolupament de complicacions en pacients amb DM2. De fet, vam demostrar que la recollida d'EV CD31+, en comparació amb el plasma sencer, millora la capacitat de miR-21-5p i miR-146a-5p per detectar la DM2 i les seves complicacions. A més, aquestes dades corroboren la hipòtesi que les EV CD31+ de pacients amb DM2 estan dotades de propietats proinflamatòries, fet que possiblement contribueix al risc CV residual

observat en pacients amb aquesta afecció. En general, els resultats del projecte fomenten continuar investigant per explorar tant el potencial diagnòstic com el paper funcional de les alteracions de les EV guiades per la DM2.

En una publicació col·lateral, discutim àmpliament l'estat de l'art i les possibles direccions futures d'aquest camp d'investigació tan específic (Prattichizzo *et al.*, *Theranostics*, 2021). La biologia de les EV és un camp de recerca en ràpid creixement que té el potencial de revolucionar el diagnòstic i la teràpia d'una àmplia gamma de malalties complexes i multifactorials, inclosa la DM2 i les seves complicacions CV. La desregulació de les EV ha estat involucrada en pràcticament totes les etapes de la trajectòria de la DM2, i ha afectat el desenvolupament de la resistència a la insulina, la disfunció de les cèl·lules β , la dislipidèmia i el procés d'aterosclerosi, així com altres complicacions CV. No obstant això, cal investigació addicional per aclarir la contribució efectiva de les EV en els processos patològics rellevants per al desenvolupament i la progressió de la DM2 en humans. De fet, les troballes humanes recopilades fins ara són més associatives que no pas causals. A més, els mètodes estandarditzats per aïllament, preparació, caracterització i quantificació de les EV són obligatoris per avançar en els estadis clínics, tant amb fins diagnòstics com terapèutics. També s'ha demostrat que el nombre d'EV i la càrrega molecular es veuen afectats per la dieta i l'exercici, dues de les estratègies més poderoses per prevenir la DM2 i les malalties cardiovasculars. Aquesta dada encara rep més suport per les observacions que els aliments en si podrien contenir EV biològicament actives. Atesa la facilitat cada vegada més gran per manipular-les, les EV de múltiples fonts poden ser els candidats ideals per millorar eventualment una sèrie d'aspectes del tractament i maneig de la DM2, com l'atenuació de la resistència a la insulina en els primers passos, la millora de la insuficiència de les cèl·lules β , un major risc d'estratificació per al desenvolupament de complicacions CV i la modulació de vies que promouen el desenvolupament de complicacions. Tenint en compte el complex paquet d'informació que transporten, les EV poden eventualment afectar aquests components patològics a llarg termini, i així proporcionar una estratègia addicional i diferent a la de les teràpies convencionals. D'altra banda, és poc probable que una eina tan poderosa no vagi acompanyada d'efectes secundaris, tenint en compte que se sap que les molècules transportades per EV, inclosos els miRNA, mostren una activitat pleiotròpica. Per tant, encara que la investigació preclínica està en la fase inicial, podem preveure que la traducció a una etapa clínica requerirà entorns personalitzats i específics. No obstant això, l'evidència

disponible anima a dur a terme més investigacions per explorar el potencial de les EV com a futures eines nanodiagnòstiques i nanoterapèutiques per a la gestió de la DM2. Finalment, ens agradaria esmentar que es van generar una sèrie d'idees col·laterals durant la progressió del projecte, de manera que es van produir una sèrie de publicacions addicionals gràcies al finançament aportat per La Marató. Tot i que no estan estrictament relacionades amb l'objectiu principal, aquestes publicacions cobreixen l'ús de miRNA com a eines:

- i. per monitoritzar la resposta a la intervenció farmacològica, i
- ii. per avaluar l'efecte dels factors estressants relacionats amb la DM2 en diversos models preclínic rellevants.

A continuació es proporciona la llista de totes les publicacions generades, tant les principals com les secundàries.

4. Bibliografia científica generada

A continuació es proporciona la llista de les publicacions generades durant el desenvolupament del projecte. A la llista, els treballs principals, estrictament rellevants, apareixen amb el títol en negreta.

1. Prattichizzo F, Maticchione G, Giuliani A, Sabbatinelli J, Olivieri F, de Candia P, De Nigris V, Ceriello A.

Extracellular vesicle-shuttled miRNAs: a critical appraisal of their potential as nano-diagnostics and nano-therapeutics in type 2 diabetes mellitus and its cardiovascular complications.

Theranostics. 2021 Jan 1;11(3):1031-1045.

2. Prattichizzo F, De Nigris V, Sabbatinelli J, et al.

CD31+ Extracellular Vesicles From Patients With Type 2 Diabetes Shuttle a miRNA Signature Associated With Cardiovascular Complications.

Diabetes. 2021 Jan;70(1):240-254.

3. Mensà E, Guescini M, Giuliani A, *et al.*

Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells.

J Extracell Vesicles. 2020 Feb 18;9(1):1725285.

4. Prattichizzo F, Giuliani A, Sabbatinelli J, Mensà E, De Nigris V, La Sala L, de Candia P, Olivieri F, Ceriello A.

Extracellular vesicles circulating in young organisms promote healthy longevity.

J Extracell Vesicles. 2019 Aug 15;8(1):1656044.

5. Prattichizzo F, Giuliani A, Mensà E, Sabbatinelli J, De Nigris V, Rippo MR, La Sala L, Procopio AD, Olivieri F, Ceriello A.

Pleiotropic effects of metformin: Shaping the microbiome to manage type 2 diabetes and postpone ageing. Ageing Res Rev. 2018 Dec;48:87-98.

6. Prattichizzo F, De Nigris V, Micheloni S, La Sala L, Ceriello A.

Increases in circulating levels of ketone bodies and cardiovascular protection with SGLT2 inhibitors: Is low-grade inflammation the neglected component?

Diabetes Obes Metab. 2018 Nov;20(11):2515-2522.

7. La Sala L, Micheloni S, De Nigris V, Prattichizzo F, Ceriello A.

Novel insights into the regulation of miRNA transcriptional control: implications for T2D and related complications.

Acta Diabetol. 2018 Oct;55(10):989-998.

8. Prattichizzo F, De Nigris V, Mancuso E, *et al.*

Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages.

Redox Biol. 2018 May;15:170-181.

9. Prattichizzo F, De Nigris V, Spiga R, Mancuso E, La Sala L, Antonicelli R, Testa R, Procopio AD, Olivieri F, Ceriello A.

Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes.

Ageing Res Rev. 2018 Jan;41:1-17.

10. Testa R, Bonfigli AR, Prattichizzo F, La Sala L, De Nigris V, Ceriello A.
*The "Metabolic Memory" Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in
Prevention of Diabetic Complications.*
Nutrients. 2017 Apr 28;9(5):437.