



Fundació
La Marató de TV3
21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



LOS RECEPTORES DE ADENOSINA COMO NUEVA DIANA PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBRILACIÓN AURICULAR: BIOMARCADORES, ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR Y TERAPIA

Leif Hove Madsen

CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Francisco Ciruela Alférez

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resumen

Objetivo

El objetivo general del proyecto Marato2015-2030-31 era evaluar el potencial de los receptores de adenosina como nueva fuente de dianas terapéuticas y biomarcadores para la prevención, la estratificación del riesgo y el tratamiento de la fibrilación auricular. Con este propósito, el proyecto fue diseñado para lograr los tres siguientes objetivos principales:

1. Determinar el funcionamiento espaciotemporal del receptor de adenosina A_{2A} en cardiomiocitos de humanos y modelos experimentales.
2. Explorar los receptores de adenosina como diana farmacológica para el tratamiento de la fibrilación auricular.
3. Evaluar la utilidad de los receptores de adenosina como biomarcadores para la estratificación del riesgo de fibrilación auricular.

Diseño y metodología

Para alcanzar estos objetivos, el proyecto se estructuró en dos subproyectos dotados de equipos científicos con conocimientos complementarios que emplean técnicas de vanguardia, como optogenética, fotofarmacología, *patch-clamp* y visualización de calcio en cardiomiocitos en tiempo real, con el fin de desarrollar nuevas herramientas moleculares para el descubrimiento de nuevos biomarcadores y dianas farmacológicas de adenosina para farmacoterapia. Posteriormente se probaron nuevos compuestos en miocitos auriculares humanos aislados y modelos *in vitro* para la detección de patrones arrítmicos con el fin de aumentar la traslación de los resultados de la investigación a un entorno clínico.

2. Resultados

Manipulación fotofarmacológica de los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} .

Se sintetizaron derivados de los activadores de adenosina A_1 y de los inhibidores de A_{2A} que permitieron liberar estas moléculas por fotoactivación, con el fin de inducir una

liberación local controlada y, por lo tanto, prevenir la actividad eléctrica arrítmica debida a la activación excesiva del receptor de adenosina A_{2A} en pacientes con fibrilación auricular.

Primero, el compuesto MRS7145 se sintetizó como un derivado de SCH442416, un inhibidor selectivo del receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}R$). Las pruebas posteriores revelaron que la liberación de SCH442416 del MRS7145, inducida con luz de una longitud de ondas más cortas que 405 nm, redujo efectivamente la producción de AMPc mediada por $A_{2A}R$ en suspensiones de cardiomiocitos. Es importante destacar que la fotoactivación de MRS7145 también evitó las respuestas arrítmicas en preparaciones de cardiomiocitos multicelulares y la liberación de calcio arritmogénico en miocitos auriculares humanos aislados, apuntando que MRS7145 podría ser una herramienta útil para el control farmacológico local de la actividad de los receptores A_{2A} y la actividad eléctrica auricular espontánea.

Posteriormente se desarrolló un nuevo modulador alostérico positivo del receptor de adenosina A_1 (A_1R) denominado T62 y se sintetizó un derivado fotoactivable (pc-T62). Sin embargo, debido a que las pruebas iniciales de la eficacia del T62 fotoliberado revelaron que solo producía una activación moderada del A_1R de un 15%, también se desarrolló otro derivado fotoactivable del agonista A_1R CPA (pc-CPA). Las pruebas de la eficacia de la fotoliberación de CPA revelaron que CPA abolió la producción de AMPc inducida por forskolina. La utilidad de T62 y CPA se está probando en la actualidad en miocitos auriculares humanos (ver más abajo).

Evaluación de la expresión de adenosina $A_{2A}R$ y A_1R y heteromerización.

Para optimizar terapias basadas en los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , se determinaron en primer lugar los perfiles de expresión de A_1R y $A_{2A}R$ en biopsias auriculares humanas de pacientes con y sin fibrilación auricular. Este análisis reveló que la fibrilación auricular está asociada con la remodelación opuesta de la expresión de A_1R y $A_{2A}R$, con un aumento del 250% de los niveles de $A_{2A}R$ y una reducción del 40% de los niveles de A_1R en pacientes con fibrilación auricular. En consecuencia, la relación $A_{2A}R:A_1R$ aumenta 7 veces en pacientes con fibrilación auricular, lo cual apunta a una posible desregulación de la señalización adenosinérgica en la fibrilación auricular y sugiere que las estrategias terapéuticas destinadas a restablecer el equilibrio entre los receptores A_1 y A_{2A} podrían ser óptimas.

Además, para evaluar la formación de heterómeros $A_{2A}R/A_{1}R$, también desarrollamos e implementamos un nuevo ensayo. En el mismo se utilizan anticuerpos específicos de $A_{2A}R$ y $A_{1}R$ que permiten una transferencia de energía a través de anticuerpos secundarios específicos. Usando este ensayo en membranas auriculares de cerdos con y sin fibrilación auricular, encontramos una reducción significativa en la formación de heterómeros $A_{2A}R/A_{1}R$ en la fibrilación auricular, lo que apunta a una reducción de la modulación alostérica negativa que controla la función $A_{2A}R$ y, por lo tanto, una mayor actividad de $A_{2A}R$ intrínseca en la fibrilación auricular.

Control de la homeostasis del calcio y la actividad eléctrica mediante la manipulación de la actividad de los receptores de adenosina A_{2A} y A_{1} .

Para determinar el impacto funcional de las alteraciones en los niveles plasmáticos de adenosina, la remodelación de la expresión de $A_{1}R$ y $A_{2A}R$ y su heteromerización en la fibrilación auricular, investigamos el impacto del aumento de los niveles de adenosina, así como el impacto de las manipulaciones farmacológicas de la actividad $A_{1}R$ y/o $A_{2A}R$ en la homeostasis del calcio y en la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos aislados.

Por lo tanto, para determinar si la desregulación de la señalización adenosinérgica en la fibrilación auricular tiene un impacto funcional en la homeostasis del calcio intracelular, realizamos un análisis de los efectos del aumento de las concentraciones de adenosina en la incidencia de corrientes de entrada transitoria (I_{TI}) inducidas por la liberación de calcio y en la corriente de calcio tipo L en miocitos auriculares humanos. Estos análisis mostraron que una baja concentración de adenosina (6 nM) puede reducir la frecuencia de las corrientes espontáneas de I_{TI} inducidas por el estrés beta-adrenérgico. Sin embargo, a concentraciones más altas de adenosina (600 nM), este efecto inhibitorio desaparece. En comparación, la activación completa de $A_{1}R$ por el agonista selectivo R-PIA abolió por completo el efecto de la estimulación beta-adrenérgica. Estos hallazgos sugieren que los receptores $A_{2A}R$ se activan por una elevada concentración de adenosina, revirtiendo el efecto inhibitorio de la activación de los receptores A_{1} sobre la incidencia de corrientes I_{TI} . Los análisis correspondientes de la corriente de calcio tipo L revelaron que, si bien hay un rebote en la frecuencia I_{TI} a concentraciones de adenosina elevadas, la estimulación beta-adrenérgica de la corriente de calcio tipo L se inhibe paulatinamente a medida que aumenta la concentración de adenosina, lo que

sugiere que los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} modulan los canales de calcio tipo L y los receptores de rianodina (que activan la corriente I_{Tl}) de una forma distinta. Debido a que la actividad eléctrica arrítmica en los miocitos de pacientes con fibrilación auricular puede desencadenarse por un aumento de la fosforilación del RyR2 y los receptores de adenosina A_{2A} pueden mediar en esta fosforilación, investigamos la relación que existe entre la activación de los receptores A_{2A} , las heterogeneidades espaciales en la fosforilación de RyR2 y alteraciones subcelulares en la homeostasis del calcio, y la actividad eléctrica arrítmica en miocitos auriculares humanos.

Nuestros hallazgos mostraron que la estimulación de los receptores A_{2A} con el agonista selectivo CGS21680 indujo la fosforilación del RyR2 en s2808 de forma más pronunciada en la membrana celular (donde se encuentran los receptores A_{2A}). Esto a su vez activó un mayor número de eventos de liberación espontánea local de calcio (*sparks*) cerca de la membrana celular. En consecuencia, se expulsó más calcio del miocito por el intercambiador Na-Ca, dando lugar a mayores despolarizaciones de membrana arritmogénicas y más frecuentes. Curiosamente, la estimulación de los receptores A_{2A} con CGS21680 en miocitos auriculares humanos de pacientes sin fibrilación auricular provocó alteraciones en la fosforilación de RyR2 y la incidencia de eventos espontáneos de liberación de calcio y despolarizaciones de membrana semejantes a las alteraciones observadas en pacientes con fibrilación auricular, lo cual demuestra que la activación excesiva de los receptores A_{2A} puede transformar miocitos auriculares humanos sanos en miocitos con actividad eléctrica arrítmica similar a la observada en los miocitos de pacientes con fibrilación auricular. Estos hallazgos, combinados con niveles de adenosina elevados y la relación $A_{2A}R:A_1R$ aumentada en pacientes con fibrilación auricular, subraya el potencial de los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} como nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la fibrilación auricular.

Evaluación de la expresión de $A_{2A}R$ en linfocitos humanos de pacientes con fibrilación auricular.

Para evaluar la utilidad de los $A_{2A}R$ como biomarcador en la fibrilación auricular, determinamos en primer lugar la expresión de $A_{2A}R$ en los linfocitos periféricos y demostramos que su expresión aumenta en los linfocitos de pacientes con fibrilación auricular. La expresión de ARNm de $A_{2A}R$ también aumenta en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con fibrilación auricular. A continuación se

determinaron los niveles de expresión de $A_{2A}R$ en diferentes poblaciones de linfocitos de sujetos con y sin fibrilación auricular. Así, los linfocitos se separaron en linfocitos T ($CD3+$ y $CD8+$) y linfocitos B ($CD19+$) y se determinó la densidad $A_{2A}R$ en cada población. Curiosamente, nuestros resultados demostraron que, si bien los $A_{2A}R$ aumentan tanto en los linfocitos T como B de pacientes con fibrilación auricular, solo las células B mostraron un aumento significativo en $CD194$, un marcador de *homing* cardíaca. Además, se observó una correlación positiva entre el aumento de la expresión de $A_{2A}R$ y la presencia de $CD194$ en los linfocitos B. Conjuntamente, estos resultados sugieren que los linfocitos B de pacientes con fibrilación auricular fueron reclutados al corazón y mostraron una mayor expresión de $A_{2A}R$, convirtiéndose así en un marcador específico de los pacientes con esta arritmia.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Receptores de adenosina como mediadores de la actividad eléctrica auricular arrítmica.

El descubrimiento de que los pacientes con fibrilación auricular presentan mayores niveles plasmáticos de adenosina que los pacientes sin arritmia, combinado con hallazgos que demuestran que la activación de $A_{2A}R$ induce alteraciones en la distribución e incidencia de liberación espontánea de calcio, que a su vez induce actividad eléctrica arritmogénica semejante a la actividad observada en pacientes con fibrilación auricular, todo ello sugiere que puede existir una correlación entre los niveles plasmáticos de adenosina y la actividad eléctrica auricular ectópica. Estos resultados proporcionan una motivación fisiopatológica para investigar una posible correlación entre los niveles de adenosina y la incidencia de actividad ectópica auricular en pacientes con fibrilación auricular paroxística o con elevado riesgo de fibrilación auricular. Consideración igualmente válida para los niveles de $CD194$ en los linfocitos B (ver también receptores de adenosina A_{2A} como biomarcadores). En colaboración con cardiólogos, en la actualidad estamos explorando la posibilidad de comprobar estas hipótesis en un entorno clínico óptimo.

Receptores de adenosina como dianas terapéuticas en la fibrilación auricular.

La constatación de que la activación excesiva de $A_{2A}R$ promueve la actividad eléctrica arritmogénica, combinada con nuestro hallazgo de que los eventos de liberación de

calcio arritmogénico inducidos por el estrés beta-adrenérgico se mantienen a un nivel elevado de adenosina (600 nM), mientras que el efecto inotrópico positivo de la estimulación beta-adrenérgica es abolido por este nivel de adenosina, sugiere que el efecto beneficioso de reducir los niveles de adenosina elevados puede ser dual. En otras palabras, nuestros hallazgos sugieren que la normalización de los niveles plasmáticos de adenosina (y/o adenosina desaminasa) en pacientes con fibrilación auricular podría, al mismo tiempo, reducir la incidencia de actividad eléctrica ectópica y aumentar la reserva inotrópica auricular en pacientes con fibrilación auricular. Nuestros hallazgos documentan que el antagonista selectivo de A_{2A}R, SCH442416, puede liberarse efectivamente por fotoactivación (sin dañar los miocitos) del compuesto MRS7145 y revertir completamente los eventos espontáneos de liberación de calcio inducidos por la activación de A_{2A}R en preparaciones de miocitos aislados y multicelulares. Estos hallazgos abren la posibilidad de utilizar la fotoactivación de MRS7145 como herramienta farmacológica para administrar SCH442416 de forma local, minimizando así los efectos sistémicos potencialmente adversos del antagonista. Para comprobar la utilidad de MRS7145 será necesario abordar una investigación que explore la viabilidad de administrar MRS7145 y liberar SCH442416 en preparaciones de corazón intacto.

Receptores de adenosina A_{2A} como biomarcadores para la estratificación del riesgo en la fibrilación auricular.

El objetivo del presente estudio era evaluar la utilidad de los receptores de adenosina como biomarcadores para la estratificación del riesgo de sufrir fibrilación auricular, y los resultados del proyecto han revelado una correlación positiva entre el aumento de la expresión de A_{2A}R y la presencia de CD194 (un marcador de *homing* para el corazón) en los linfocitos B. Además, los niveles de CD194 aumentaron significativamente en pacientes con fibrilación auricular, lo cual indica un aumento en los niveles de CD194 como sello específico de los pacientes y sugiere que el análisis de los niveles de CD194 en los linfocitos B podría ser una nueva herramienta para la predicción del riesgo y la gravedad de la fibrilación auricular. En la actualidad estamos evaluando la posibilidad de patentar estos resultados.

4. Bibliografía científica generada

Herraiz-Martínez A, Llach A, Tarifa C, Gandía J, Jiménez-Sabado V, Lozano-Velasco E, Serra SA, Vallmitjana A, Vázquez Ruiz de Castroviejo E, Benítez R, Aranega A, Muñoz-Guijosa C, Franco D, Cinca J, Hove-Madsen L (2019).

The 4q25 variant rs13143308T links risk of atrial fibrillation to defective calcium homeostasis. Cardiovascular Research 115, 578–589.

El estudio fue objeto de un comentario editorial titulado: "Ménage à trois: single-nucleotide polymorphisms, Calcium and atrial fibrillation".

Cardiovascular Research 115, 479–481. doi:10.1093/cvr/cvy283

Morató, X., Gonçalves, F.Q., Lopes, J.P., Jauregui, O., Soler, C., Fernández-Dueñas, V., Cunha, R.A. & Ciruela, F. (2019).

Chronic adenosine A2A receptor blockade induces locomotor sensitization and potentiates striatal LTD in GPR37 deficient mice.

Journal of Neurochemistry 148, 796-809.

Fernández-Dueñas, V., Gómez-Soler, M., Valle-León, M.*, Watanabe, M., Ferrer, I. & Ciruela, F. (2019).

Revealing adenosine A2A-dopamine D2 receptor heteromers in Parkinson's disease post-mortem brain through a new AlphaScreen-based assay.

International Journal of Molecular Sciences 20 (14), 3600.

Aso, E., Fernández-Dueñas, V., López-Cano, M., Taura, J., Watanabe, M., Ferrer, I., Luján, R. & Ciruela, F. (2019).

Cannabidiol blunts Δ 9-THC-induced cognitive impairment through putative pre-synaptic adenosine A2A-cannabinoid CB1 receptor heteromers in the hippocampus.

Molecular Neurobiology 56 (8), 5382–5391.

Lanznaster, D., Massari, C., Marková, V., Šimková, T., R. Duroux, Jacobson, K.A., Fernández-Dueñas, V., Tasca, C.I., & Ciruela, F. (2019).

Adenosine A1-A2A receptor-receptor interaction: contribution to guanosine-mediated effects.

Cells 8 (12), 1630.

Molina CE, Abu-Taha IH, Wang Q, Roselló-Díez E, Kamler M, Nattel S, Ravens U, Wehrens XHT, Hove-Madsen L, Heijman J, Dobrev D. (2018). *Profibrotic, Electrical, and Calcium-Handling Remodeling of the Atria in Heart Failure Patients With and Without Atrial Fibrillation*. Front Physiol. 9:1383.

Sahlholm, K., Valle-León, M., Fernández-Dueñas, V. & Ciruela, F. (2018). *Pridopidine reverses phencyclidine-induced memory impairment*. Frontiers in Pharmacology 9, 338.

Taura, J., Valle-León, M., Sahlholm, K., Watanabe, M., Van Craenenbroeck, K., Fernández-Dueñas, V., Ferré, S. & Ciruela, F. (2018). *Behavioral control by striatal adenosine A2A-dopamine D2 receptor heteromers*. Genes, Brain & Behavior 17(4), e12432.

Taura, J., Nolen E.G., Cabré, G., Hernando, J., Squarcialupi, L., López-Cano, M., Jacobson, K.A., Fernández-Dueñas, V. & Ciruela, F. (2018). *Remote control of movement disorders using a photoactivable adenosine A2A receptor antagonist*. Journal of Controlled Release 283, 135-142.

Sahlholm, K., Valle-León, M., Taura, J., Fernández-Dueñas, V. & Ciruela, F. (2018). *Effects of the dopamine stabilizer, pridopidine, on basal and phencyclidine-induced hyperlocomotion: contribution of dopamine D2 and sigma-1 receptors*. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets 17 (7), 522 - 527.

Gómez-Soler, M., Cordobilla, B., Morató, X., Fernández-Dueñas, V., Domingo, J.C. & Ciruela, F. (2018). *Triglyceride form of docosahexaenoic acid mediates neuroprotection in experimental parkinsonism*. Frontiers in Neuroscience 12, 604.

Morató, X., Luján, R., Gonçalves, N., Watanabe, M., Altafaj, X., Carvalho, A.L., Fernandez-Dueñas, V., Cunha, R.A. & Ciruela, F. (2018).

Metabotropic glutamate type 5 receptor requires contactin-associated protein 1 to control memory formation.

Human Molecular Genetics 27 (20), 3528-3541.

Núñez, F., Taura, J., Camacho, J., López-Cano, M., Fernández-Dueñas, V., Castro, N., Castro J. & Ciruela, F. (2018).

PBF509, an adenosine A2A receptor antagonist, with efficacy in rodent models of movements disorders.

Frontiers in Pharmacology, 9, 1200.

Font, J., López-Cano, M., Notartomaso, S., Scarselli, P., Di Prieto, P., Bresolí-Obach, R., Battaglia, G., Malhaire, F., Rovira, X., Catena, J., Giraldo, J., Pin, J.P., Fernández-Dueñas, V., Goudet, C., Nonell, S., Nicoletti, F., Llebaria, A., Ciruela, F. (2017).

Optical control of pain in vivo with a photoactive mGlu5 receptor negative allosteric modulator.

eLife 6, e23545.

Manuscritos remitidos para su publicación

Tarifa C, Vallmitjana A, Jiménez-Sabado V, Llach A, Herraiz-Martinez A, Marchena M, Godoy-Marín H, Nolla-Colomer C, Cabello N, Ferrero-Gregori A, Ginel A, Viñolas X, Montiel J, Echebarria B, Ciruela F, Benítez R, Cinca J, Hove-Madsen L.

Preferential subsarcolemmal calcium spark distribution potentiates arrhythmogenic electrical activity in patients with atrial fibrillation (versión revisada en preparación).

Circulation Research CIRCRES/2019/315409_R1.

Wei J, Belke D, Zhong X, Sun B, Guo W, Yao J, Wang R, Vallmitjana A, Benitez R, Hove-Madsen L, Alvarez-Lacalle A, Echebarria B, Chen SRW.

Ca²⁺-Calmodulin Dependent Inactivation of Cardiac Ryanodine Receptor Underlies Ca²⁺ Alternans in Intact Hearts (versión revisada en preparación).

Circulation Research CIRCRES/2019/315976_R1.

Sun B, Yao J, Ni M, Wei J, Zhong X, Guo W, Zhang L, Wang R, Lieve KVV, Broendberg AK, Roston TM, Blankoff I, Kammeraad JA, von Alvensleben J, Lazarte J, Vallmitjana A, Benitez R, Hove-Madsen L, Napolitano C, Hegele RA, Fill M, Sanatani S, Wilde AAM, Roberts JD, Priori SG, Jensen HK, Chen SRW (versión revisada en preparación).

Ryanodine Receptor 2 Calcium Release Deficiency Syndrome.

Nature Communications aba7287_R1.

Herraiz-Martínez A, Tarifa C, Jiménez-Sábado V, Llach A, Colino H, Godoy-Marín H, Nolla-Colomer C, Benítez I, Benítez R, Roselló-Díez E, Rodríguez-Font E, Viñolas X, Ciruela F, Cinca J, Hove-Madsen L.

Influence of gender on intracellular calcium homeostasis in patients with atrial fibrillation.

European Heart Journal EURHEARTJ-S-20-00885.