



Fundació
La Marató de TV3
21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



MOLÉCULAS INMUNOREGULADORAS Y MIRNA COMO DIANAS EN LA ENFERMEDAD DE LAS ARTERIAS CORONARIAS Y EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO

José Martínez González

CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Francisco Sánchez Madrid

Hospital Universitario de la Princesa - Madrid

1. Resumen

Antecedentes

La enfermedad de las arterias coronarias (EAC) es la enfermedad cardiovascular más frecuente. La EAC es una enfermedad crónica cuya complicación puede ocasionar el síndrome coronario agudo (SCA), causado frecuentemente por la ruptura de una placa aterosclerótica. Las lipoproteínas oxidadas (LDLox) son las responsables de desencadenar una respuesta inflamatoria que está implicada en el inicio de la enfermedad, en su desarrollo y en la ruptura de la placa. El desequilibrio entre la presencia o función de las células T reguladoras (Treg) y los linfocitos Th17 es uno de los mecanismos que participan en este proceso. Los resultados obtenidos por el grupo han mostrado que las LDLox se unen a la molécula inmunorreguladora CD69 de los linfocitos T, induciendo así la expresión de los receptores nucleares de la familia NR4A. La molécula linfocitaria CD69 es un regulador negativo de la respuesta Th17 y al mismo tiempo promotor de las células Treg.

Objetivos

i) Estudiar la participación de la unión de las LDLox a CD69 en la inmunopatogénesis de la EAC a través de la regulación de los receptores NR4A utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*; ii) analizar los niveles circulantes de células Th17 y Treg en pacientes con EAC, y el perfil de miRNA de linfocitos T en respuesta a las LDLox; y iii) estudiar el perfil de miRNA en plasma de pacientes con SCA y determinar posibles dianas de miRNA relevantes para la EAC y el SCA.

Métodos

Para el desarrollo de estos objetivos se utilizó la línea celular de linfocitos T humana Jurkat (JK) transfectada de forma estable con CD69 (JKCD69) y su respectivo control (Jurkat wt, JKwt), así como ratones deficientes para CD69 (CD69^{-/-}). Para el modelo de aterosclerosis *in vivo* estos ratones fueron cruzados con ratones deficientes para el receptor de LDL (LDLR^{-/-}) y sometidos a una dieta alta en grasa. Para estudiar el papel de CD69 en el SCA se utilizó el modelo de oclusión de la arteria coronaria descendente izquierda en ratones deficientes o no para CD69. El perfil de expresión génica y de miRNA de linfocitos T humanos inducido en respuesta a la unión de CD69 a LDLox se determinó mediante secuenciación masiva.

Resultados

Los ratones CD69^{-/-} específicos de células linfoides desarrollaron una forma más grave de enfermedad aterosclerótica con un aumento de la relación de células Th17/Treg. LDLox se une de forma específica y funcional al receptor CD69 expresado en la superficie de los linfocitos T humanos, inhibiendo la diferenciación de células Th17 e induciendo la expresión de los receptores NR4A. La unión de LDLox a CD69 indujo la expresión de la molécula PD1 en linfocitos T humanos, así como la expresión del miRNA-663a, una de cuyas dianas celulares es el transportador de aminoácidos SLC7A5.

El estudio de individuos con enfermedad aterosclerótica subclínica mostró una disminución de la expresión de CD69 y NR4A1 en leucocitos de sangre en comparación con la observada en las células de sujetos sanos.

En el modelo de isquemia de miocardio, los ratones CD69^{-/-} desarrollaron una respuesta de células T gamma delta (T $\gamma\delta$) IL-17+ temprana y un aumento de la inflamación a nivel del miocardio. La transferencia de células Treg CD69+ a los ratones CD69^{-/-} fue capaz de revertir la inflamación y el fallo cardíaco. Después de la oclusión de la arteria coronaria se detectó un aumento de las Treg circulantes y del miRNA-155 en plasma. La disminución de las Treg CD69+ o del miRNA-155 en muestras de pacientes posterior a un infarto de miocardio fue un marcador de mal pronóstico.

Conclusiones

La disminución de CD69 en las células linfoides favorece el desarrollo de aterosclerosis y su expresión puede ser un marcador predictor de aterosclerosis subclínica en humanos. La inducción de PD1 en respuesta a la unión de LDLox a CD69 podría explicar la función reguladora negativa de CD69 en la respuesta inflamatoria. La expresión de CD69 en células Treg es esencial para mantener la homeostasis inmune después de un infarto de miocardio y los niveles circulantes del miR-155 podrían ser un indicador pronóstico en el SCA.

2. Resultados

Las LDLox se unieron a las células Jurkat CD69+ (JKCD69) de forma más eficiente que a las células control Jurkat wt (JKwt) y esta unión fue capaz de inducir la internalización de CD69. La interacción de CD69 con LDLox inhibió la expresión de IL-8 e IFN-gamma en JKCD69 activadas, así como la diferenciación de células Th17 en cultivos primarios de células humanas, mientras estimuló la diferenciación de células Treg. Nuestros resultados mostraron que las LDLox inducen la expresión de los receptores NR4A1 y NR4A3 en linfocitos T CD4+ humanos. La participación de CD69 en esta inducción se demostró en células JKCD69 y JKwt mediante el uso de anticuerpos bloqueantes anti-CD69 y ensayos de RNA de interferencia. Finalmente, mediante secuenciación masiva de RNA analizamos los cambios de expresión génica y del perfil de miRNA inducidos con la unión LDLox-CD69 en linfocitos T humanos. Los datos revelaron una inducción de PD1 a nivel de mensajero que confirmamos mediante qPCR y a nivel de proteína. Realizamos un ensayo de luciferasa que confirmó que la interacción LDLox-CD69 activa el promotor de PD1. Además, determinamos que esta unión incrementa la expresión del mir-663a, regulador de la expresión del transportador de aminoácidos SLC7A5.

Para estudiar el papel de CD69 en el desarrollo de aterosclerosis *in vivo*, los ratones deficientes para CD69 (CD69^{-/-}) se cruzaron con ratones deficientes en el receptor de LDL (LDLR^{-/-}) y se generaron quimeras mixtas para obtener ratones con deficiencia de CD69 específicamente en el compartimento linfóide o mielóide. Para la inducción de aterosclerosis, los ratones fueron sometidos a una dieta alta en grasa. En los ratones CD69^{-/-} específicos de células linfoides observamos un aumento en la respuesta Th17 y un menor porcentaje de Treg en sangre periférica. Estos ratones desarrollaron lesiones ateroscleróticas más graves con mayores núcleos necróticos en comparación con los ratones CD69^{+/+} (figura 1). La deficiencia de CD69 específica del compartimento mielóide no modificó las respuestas de células Th17 y Treg ni la formación de las placas de ateroma en comparación con los ratones CD69^{+/+}. Por otra parte, la expresión de NR4A1 y NR4A3 fue menor en los ratones CD69^{-/-} sometidos a dieta grasa. Durante el desarrollo de la aterosclerosis la expresión de CD69 y NR41 en linfocitos disminuyó de forma gradual.

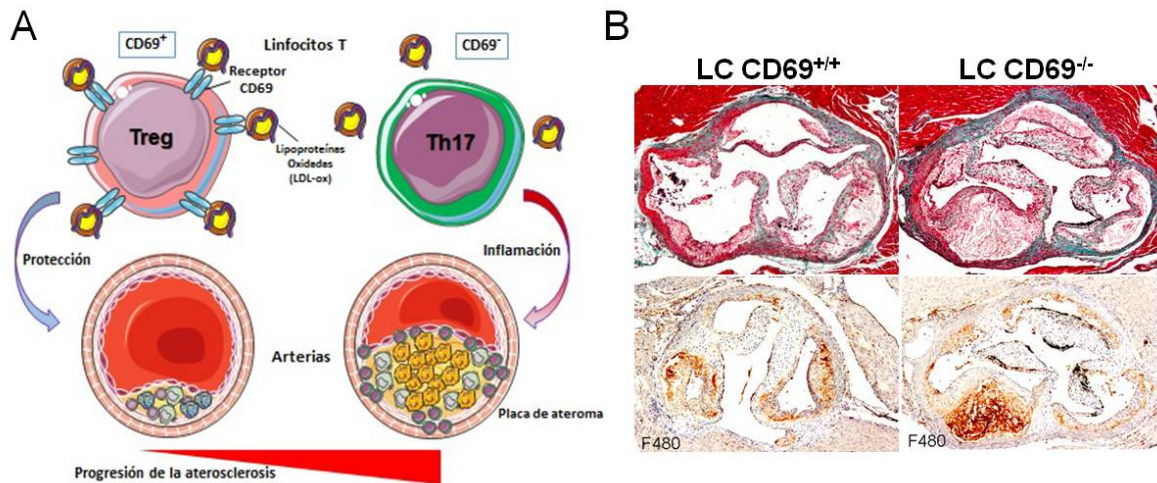


Figura 1. A) La deficiencia de CD69 en las células linfoides (LC CD69^{-/-}) favorece el desarrollo de aterosclerosis a través del aumento en la expresión de IL-17. **B)** Placa aterosclerótica y centro necrótico en válvulas aórticas de ratones deficientes para CD69 en el compartimento linfoide.

Para determinar el papel de CD69 y NR4A1 en la enfermedad aterosclerótica humana, se utilizaron muestras del estudio PESA (*Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*), que analiza la presencia de placas de ateroma mediante técnicas de imagen avanzada. Los participantes en el estudio fueron clasificados como afectados de aterosclerosis focal o generalizada, de acuerdo con el número de placas detectadas. Comparamos la expresión de CD69 y NR4A1 en individuos con enfermedad focal (n = 55) o aterosclerosis subclínica generalizada (n = 128) con la de participantes del estudio sin evidencia de aterosclerosis subclínica (n = 122). Los niveles de CD69 correlacionaron de forma significativa con la expresión de NR4A1. Los análisis estadísticos mostraron que la expresión de CD69 es un factor predictivo independiente de aterosclerosis temprana (OR = 0,62, P = 0,0056) (figura 2).

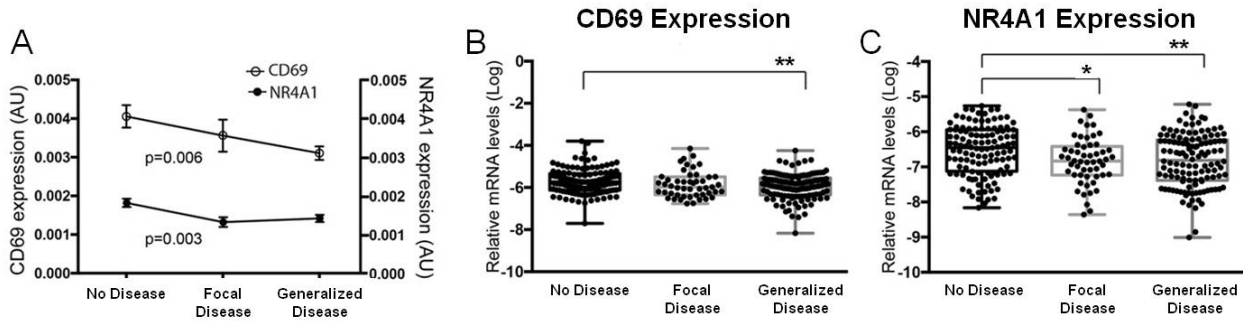


Figura 2. Expresión de CD69 y NR4A1 en leucocitos de sangre periférica de individuos con aterosclerosis subclínica clasificados como enfermedad focal y generalizada o sujetos sanos. **A)** Disminución progresiva de la expresión de CD69 y NRA4A1 durante el desarrollo de la aterosclerosis en humanos. **B y C)** Disminución de la expresión de CD69 y NR4A1 en individuos con aterosclerosis subclínica en comparación con sujetos sanos.

Para determinar el papel de CD69 y los miRNA en el síndrome coronario agudo (SCA), estudiamos la expresión de CD69 en células Treg en 238 pacientes con SCA (con y sin elevación del segmento ST) después de la cateterización y en 80 voluntarios sanos. Respecto a los factores de riesgo cardiovasculares, en todos los casos el porcentaje de pacientes con al menos un factor de riesgo siempre fue mayor al 90%, siendo los tres más frecuentes la dislipidemia, la hipertensión arterial y antecedentes de tabaquismo. En base a la expresión de CD69 definimos dos poblaciones: un grupo de pacientes con >50% de células CD69+ y un grupo de pacientes con <50% de células CD69+ tanto en los grupos STEMI (*ST-segment elevation myocardial infarction*) como en los NSTEMI (*Non-STEMI*). Los CD4+ y Treg que expresan CD69+ se correlacionan significativamente con los niveles de troponina (TnT) y de creatina quinasa (CK) y con anormalidades en la función cardíaca. Además, los pacientes con niveles de expresión de CD69 altos se correlacionan con mayor TnT indicando una correlación entre la expresión de CD69 y la severidad del daño en el corazón en los pacientes con infarto agudo de miocardio (*acute myocardial infarction*, AMI). Encontramos que la falta de expresión de CD69 en las células Treg en sangre es un indicador de pacientes con mal pronóstico tras un AMI, lo que sugiere que la expresión de CD69 en las células Treg circulantes detectadas tempranamente tras el evento isquémico podría ser un marcador de pronóstico (figuras 3A y 3B).

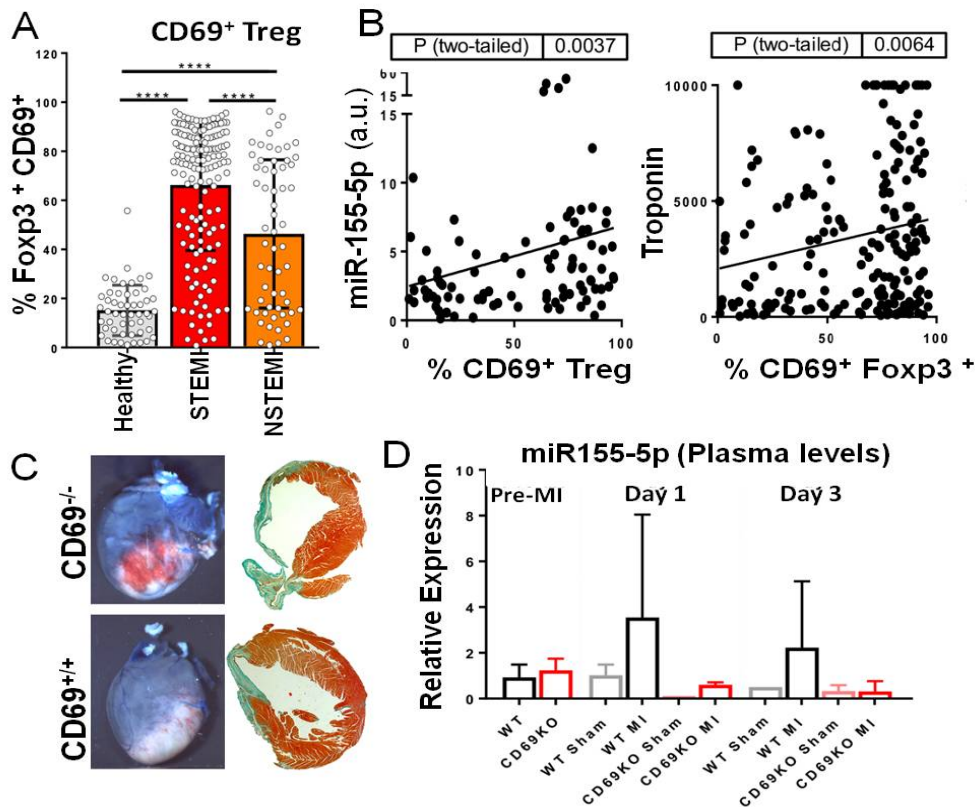


Figura 3. A) Los niveles circulantes de células CD69⁺ aumentan después de un AMI, particularmente en los pacientes con STEMI. **B)** Se observa correlación entre los niveles de células CD69⁺ y los niveles circulantes de miR-155 y los niveles de troponina T. **C y D)** En los ratones a los que se indujo infarto por ligadura de la LAD, este fue de mayor tamaño en los animales CD69^{-/-} (**C**). La expresión de miR-155 es dependiente de CD69, y después de un infarto sus niveles aumentan en los animales WT (CD69^{+/+}) pero no en los CD69 KO.

Para estudiar las rutas reguladoras de CD69 en SCA, analizamos ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} tras la oclusión permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (*left anterior descending coronary artery, LAD*). Los ratones CD69^{-/-} desarrollan respuestas de células T $\gamma\delta$ IL17⁺ de manera temprana tras la isquemia, lo que induce un incremento de la inflamación del miocardio y, como consecuencia, peor función cardíaca. La transferencia adoptiva de células Treg CD69⁺ a ratones CD69^{-/-} tras la ligadura de la LAD mejora la supervivencia y disminuye el fallo cardíaco, lo que muestra el papel de CD69 en el mantenimiento de la homeostasis inmune después del AMI. Las células CD69⁺ expresan el miRNA 155 (miR-155), aumentan la señalización STAT-5 y promueven Foxp3 y la diferenciación de las células Treg. En este sentido, detectamos un incremento de células Treg CD69⁺ así como de los niveles plasmáticos

del miR-155 en ratones después de la ligadura de la LAD (figuras 3C y 3D). Además, en pacientes que han sufrido un AMI, tanto los niveles de células Treg CD69+ como los niveles plasmáticos de miR-155 se correlacionaron con los niveles de TnT en sangre (figura 3B).

Estos resultados sugieren que la expresión de CD69 aumenta en paralelo con el daño cardíaco y contrarresta el exceso de inflamación (figura 4). Nuestros datos mostraron que la ausencia de CD69 en células Treg o del miR-155 en plasma son indicadores de mal pronóstico en pacientes con infarto de miocardio.

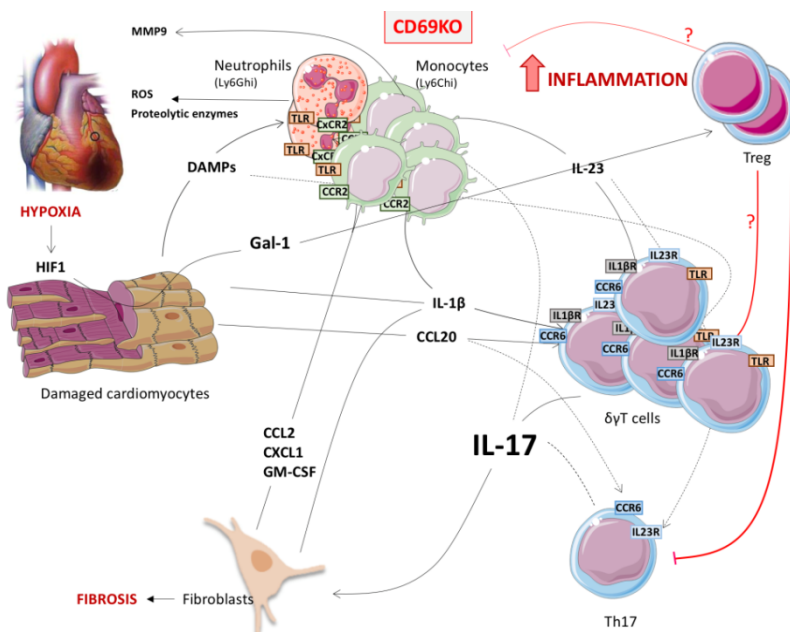


Figura 4. La expresión de CD69 es importante para el mantenimiento de la homeostasis inmune después de un infarto agudo de miocardio (AMI). La ausencia de CD69 en las células Treg induce un aumento de la expresión de IL-17 por las células T gamma delta ($T\gamma\delta$) que se traduce en una mayor inflamación y remodelado cardíaco adverso.

3. Relevancia e implicaciones futuras

La identificación de moléculas que puedan ser de utilidad en el diagnóstico temprano y el seguimiento de pacientes es una estrategia esencial en el manejo y la prevención de la enfermedad de las arterias coronarias. En este proyecto hemos identificado la expresión del receptor de activación leucocitario CD69 como un marcador independiente de aterosclerosis subclínica. Así mismo, hemos determinado que la expresión del miR-155 y los niveles de linfocitos Treg CD69+ en sangre periférica son indicadores de pronóstico en pacientes con infarto de miocardio.

4. Bibliografía científica generada

Tsilingiri K, de la Fuente H, Relaño M, Sánchez-Díaz R, Rodríguez C, Crespo J, Sánchez-Cabo F, Dopazo A, Alonso-Lebrero JL, Vara A, Vázquez J, Casanovas JM, Alfonso F, Ibáñez B, Fuster V, Martínez-González J, Martín P, Sánchez-Madrid F. *Oxidized low-density lipoprotein receptor in lymphocytes prevents atherosclerosis and predicts subclinical disease.*

Circulation 2019; 139: 243-255.

Sánchez-Díaz R, Blanco-Domínguez R, Lasarte S, Tsilingiri K, Martín-Gayo E, Linillos-Pradillo B, de la Fuente H, Sánchez-Madrid F, Nakagawa R, Toribio ML, Martín P. *Thymus-Derived Regulatory T Cell Development Is Regulated by C-Type Lectin-Mediated BIC/MicroRNA 155 Expression.*

Mol. Cell. Biol. 2017;37(9). pii: e00341-16.

Cibrian D, Castillo-González R, Fernández-Gallego N, de la Fuente H, Jorge I, Saiz ML, Punzón C, Ramírez-Huesca M, Vicente-Manzanares M, Fresno M, Daudén E, Fraga-Fernandez J, Vazquez J, Aragonés J, Sánchez-Madrid F.

Targeting L-type amino acid transporter 1 in innate and adaptive T cells efficiently controls skin inflammation.

J. Allergy Clin. Immunol. 2020; 145(1): 199-214.e11.

Blanco-Domínguez R, Sánchez-Díaz R, de la Fuente H, Sánchez-Madrid F, Martín P. *Circulating hsa-miR-Chr8:96, a new biomarker for acute myocarditis.*

Versión revisada actualmente en evaluación en *Circulation*.

Blanco-Domínguez R, Sánchez-Días R, de la Fuente H, Rodríguez C, Alfonso F, Duran A, Sánchez-Madrid F, Martínez-González J, Martínez P.

CD69 expression in CD4⁺Foxp3⁺ protects from immune-mediated damage after MI

Enviado.

Clemente C, Rius C, Alonso-Herranz L, Martín-Alonso M, Pollán A, Camafeita E, Martínez F, Mota RA, Núñez V, Rodríguez C, Seiki M, Martínez-González J, Andrés V, Ricote M, Arroyo AG.

MT4-MMP deficiency increases patrolling monocyte recruitment to early lesions and accelerates atherosclerosis.

Nat. Commun. 2018; 9(1): 910.

Alonso J, Cañes L, García-Redondo AB, García de Frutos P, Rodríguez C, Martínez-González J.

The nuclear receptor NOR-1 modulates redox homeostasis in human vascular smooth muscle cells.

J. Mol. Cell. Cardiol. 2018; 122: 23-33.

Martí-Pàmies I, Cañes L, Alonso J, Rodríguez C, Martínez-González J.

The nuclear receptor NOR-1/NR4A3 regulates the multifunctional glycoprotein vitronectin in vascular smooth muscle cells.

FASEB J. 2017;31:4588-4599.

Cañes L, Martí-Pàmies I, Ballester-Servera C, Herraiz-Martínez A, Alonso J, Galán M, Nistal JF, Muniesa P, Osada J, Hove-Madsen L, Rodríguez C, Martínez-González J.

Neuron-derived orphan receptor-1 modulates cardiac gene expression and exacerbates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.

Clin. Sci. 2020; 134: 359-377

Rodríguez C, Martínez-González J.

The role of lysyl oxidase enzymes in cardiac function and remodeling.

Cells. 2019; 8 (12). pii: E1483.

Varona S, Orriols M, Galán M, Guadall A, Cañes L, Aguiló S, Sirvent M, Martínez-González J, Rodríguez C.

Lysyl oxidase (LOX) limits VSMC proliferation and neointimal thickening through its extracellular enzymatic activity.

Sci. Rep. 2018; 8(1): 13258.

Galán M, Varona S, Guadall A, Orriols M, Navas M, Aguiló S, de Diego A, Navarro MA, García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J, Rodríguez C.

Lysyl oxidase over-expression accelerates cardiac remodelling and aggravates angiotensin II-induced hypertrophy.

FASEB J. 2017; 31: 3787-3799.

Alonso J, Galán M, Martí-Pàmies I, Romero JM, Camacho M, Rodríguez C, Martínez-González J.

NOR-1/NR4A3 regulates the cellular inhibitor of apoptosis 2 (cIAP2) in vascular cells: role in the survival response to hypoxic stress.

Sci. Rep. 2016; 6: 34056.

Ferrán B, Martí-Pàmies I, Alonso J, Rodríguez-Calvo R, Aguiló S, Vidal F, Rodríguez C, Martínez-González J.

The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation.

Sci. Rep. 2016; 6: 25944.