



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



ELS RECEPTORS D'ADENOSINA COM A NOVA DIANA PER AL TRACTAMENT DE LA FIBRIL·LACIÓ AURICULAR: BIOMARCADORS, ESTRATIFICACIÓ DEL RISC CARDIOVASCULAR I TERÀPIA

Leif Hove Madsen

CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Francisco Ciruela Alférez

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resum

Objectiu

L'objectiu general del projecte Marato2015-2030-31 era avaluar el potencial dels receptors d'adenosina com una nova font de dianes terapèutiques i biomarcadors per a la prevenció, l'estratificació del risc i el tractament de la fibril·lació auricular. Amb aquest propòsit, el projecte va ser dissenyat per aconseguir els tres objectius principals següents:

1. Determinar el funcionament del receptor d'adenosina A_{2A} en cardiomiòcits d'humans i de models experimentals.
2. Explorar els receptors d'adenosina com a diana farmacològica per al tractament de la fibril·lació auricular.
3. Avaluar la utilitat dels receptors d'adenosina com a biomarcadors per a l'estratificació del risc de patir fibril·lació auricular.

Disseny i metodologia

Per assolir aquests objectius, el projecte es va estructurar en dos subprojectes dotats d'equips científics amb coneixements complementaris que utilitzen tècniques d'avantguarda, com optogenètica, fotofarmacologia, pinçament de membrana (*patch-clamp*) i visualització de calci en cardiomiòcits en temps real, per desenvolupar noves eines moleculars per al descobriment de nous biomarcadors i dianes farmacològiques d'adenosina per a farmacoteràpia. Posteriorment es van provar nous compostos en miòcits auriculars humans aïllats i models *in vitro* per a la detecció de patrons arrítmics a fi d'augmentar la translació dels resultats de la investigació a un entorn clínic.

2. Resultats

Manipulació fotofarmacològica dels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} .

Es van sintetitzar derivats dels activadors d'adenosina A_1 i dels inhibidors de A_{2A} que van permetre alliberar aquestes molècules per fotoactivació, a fi de poder induir un alliberament local controlat i, per tant, prevenir l'activitat elèctrica arrítmica causada

per l'activació excessiva del receptor d'adenosina A_{2A} en pacients amb fibril·lació auricular.

Primer, el compost MRS7145, que és fotoactivable, es va sintetitzar com un derivat d'SCH442416, que és un inhibidor selectiu del receptor d'adenosina A_{2A} ($A_{2A}R$). Les proves posteriors van revelar que la fotoactivació d'MRS7145, induïda amb llum d'una longitud d'ones més curtes que 405 nm, va alliberar SCH442416, tot reduint la producció d'AMPC per la inhibició dels $A_{2A}R$ en suspensions de cardiomiòcits. És important destacar que la fotoactivació d'MRS7145 també va evitar les respostes arrítmiques en preparacions de cardiomiòcits multicel·lulars i l'alliberament de calci arritmogènic en miòcits auriculars humans aïllats, tot apuntant que MRS7145 seria una eina útil per al control farmacològic local de l'activitat dels receptors A_{2A} i l'activitat elèctrica auricular espontània.

Posteriorment es va desenvolupar un nou modulador al·lostèric positiu del receptor d'adenosina A_1 (A_1R) anomenat T62 i un derivat d'aquest fotoactivable (pc-T62). No obstant això, les proves inicials de l'eficàcia de T62 fotoalliberat van revelar que només es produïa una activació del 15% d' A_1R . També es va desenvolupar un altre derivat fotoactivable de l'agonista A_1R CPA (pc-CPA). Les proves de l'eficàcia del fotoalliberament de CPA van revelar que CPA va abolir la producció d'AMPC induïda per forskolina. La utilitat de T62 i CPA s'està provant actualment en miòcits auriculars humans (vegeu també l'apartat de receptors d'adenosina A_{2A} com a biomarcadors).

Avaluació de l'expressió i heteromerització d' $A_{2A}R$ i A_1R .

Per optimitzar teràpies basades en els receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} , primer es van determinar els perfils d'expressió d' A_1R i $A_{2A}R$ en biòpsies auriculars humanes de pacients amb i sense fibril·lació auricular. Aquesta anàlisi va revelar que la fibril·lació auricular està associada amb la remodelació oposada de l'expressió d' A_1R i $A_{2A}R$, amb un augment del 250% dels nivells d' $A_{2A}R$ i una reducció del 40% dels nivells d' A_1R en pacients amb fibril·lació auricular. En conseqüència, la relació $A_{2A}R:A_1R$ augmenta 7 vegades en pacients amb fibril·lació auricular, la qual cosa apunta a una possible desregulació de la senyalització adenosinèrgica en la fibril·lació auricular i suggereix que les estratègies terapèutiques destinades a restablir l'equilibri entre els receptors A_1 i A_{2A} podrien ser òptimes.

A més, per avaluar la formació d'heteròmers $A_{2A}R/A_1R$ vam desenvolupar i implementar un nou assaig, en el qual s'utilitzen anticossos específics d' $A_{2A}R$ i A_1R que permeten una transferència d'energia a través d'anticossos secundaris específics. Usant aquest assaig en membranes auriculars de porcs amb i sense fibril·lació auricular, vam trobar una reducció significativa en la formació d'heteròmers $A_{2A}R/A_1R$ en la fibril·lació auricular, fet que apunta una reducció de la modulació al·lostèrica negativa que controla la funció $A_{2A}R$ i, per tant, una activitat més alta d' $A_{2A}R$ intrínseca en la fibril·lació auricular.

Control de l'homeòstasi del calci i l'activitat elèctrica mitjançant la manipulació de l'activitat dels receptors d'adenosina A_{2A} i A_1 .

Per determinar l'impacte funcional de les alteracions en els nivells plasmàtics d'adenosina, la remodelació de l'expressió i l'heteromerització dels A_1R i $A_{2A}R$ en la fibril·lació auricular, vam investigar l'impacte de l'augment dels nivells d'adenosina, així com l'impacte de les manipulacions farmacològiques de l'activitat A_1R i/o $A_{2A}R$ en l'homeòstasi del calci i en l'activitat elèctrica en miòcits auriculars humans aïllats. Per tant, per determinar si la desregulació de la senyalització adenosinèrgica en la fibril·lació auricular té un impacte funcional en l'homeòstasi del calci intracel·lular, vam fer una anàlisi dels efectes de l'augment de les concentracions d'adenosina en la incidència de corrents d'entrada transitòria (I_{TI}) induïdes per l'alliberament de calci i en el corrent de calci tipus L en miòcits auriculars humans. Aquestes anàlisis van mostrar que una baixa concentració d'adenosina (6 nM) pot reduir la freqüència dels corrents espontanis d' I_{TI} induïts per l'estrès beta-adrenèrgic. No obstant això, amb concentracions més altes d'adenosina (600 nM), aquest efecte inhibitor desapareixia. En comparació, l'activació completa d' A_1R per l'agonista selectiu R-PIA va eliminar completament l'efecte de l'estimulació beta-adrenèrgica. Aquestes troballes suggereixen que els receptors $A_{2A}R$ s'activen per una elevada concentració d'adenosina, tot revertint l'efecte inhibitor de l'activació dels receptors A_1 sobre la incidència de corrents I_{TI} . Les anàlisis corresponents del corrent de calci tipus L mostren que, si bé hi ha un efecte rebot en la freqüència d' I_{TI} a concentracions elevades d'adenosina, l'estimulació beta-adrenèrgica del corrent de calci tipus L s'inhibeix progressivament a mesura que augmenta la concentració d'adenosina, la qual cosa suggereix que els receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} modulen els canals de calci tipus L i els receptors de rianodina (que activen el corrent I_{TI}) d'una manera diferent.

A causa del fet que l'activitat elèctrica arrítmica en els miòcits de pacients amb fibril·lació auricular es pot desencadenar per un augment de la fosforilació dels receptors RyR2 i que els A_{2A}R poden intervenir en aquesta fosforilació, vam investigar la relació entre l'activació dels A_{2A}R, les heterogeneïtats espacials en la fosforilació dels RyR2 i les alteracions subcel·lulars en l'homeòstasi del calci, i l'activitat elèctrica arrítmica en miòcits auriculars humans.

Els nostres resultats van mostrar que l'estimulació dels receptors A_{2A} amb l'agonista selectiu CGS21680 induïa la fosforilació del RyR2 en s2808 d'una forma més pronunciada en la membrana cel·lular (on es troben els A_{2A}R). Això, al seu torn, activava un major nombre d'esdeveniments d'alliberament espontani local de calci (*sparks*) a prop de la membrana cel·lular. En conseqüència, s'expulsava més calci del miòcit per l'intercanviador Na-Ca, i es donava lloc a despolaritzacions de membrana arritmogèniques més grans i més freqüents. Curiosament, l'estimulació dels A_{2A}R amb CGS21680 en miòcits auriculars humans de pacients sense fibril·lació auricular provocava alteracions en la fosforilació del RyR2 i la incidència d'alliberament espontani de calci i de despolaritzacions de membrana semblants a les alteracions observades en pacients amb fibril·lació auricular, la qual cosa demostra que l'activació excessiva dels receptors A_{2A} pot transformar miòcits auriculars humans sans en miòcits amb activitat elèctrica arrítmica similar a l'observada en els miòcits de pacients amb fibril·lació auricular. Aquestes troballes, combinades amb nivells elevats d'adenosina, i la relació A_{2A}R:A₁R augmentada en pacients amb fibril·lació auricular, subratlla el potencial dels receptors d'adenosina A₁ i A_{2A} com a noves dianes farmacològiques per al tractament de la fibril·lació auricular.

Avaluació de l'expressió d'A_{2A}R en limfòcits humans de pacients amb fibril·lació auricular.

Per avaluar la utilitat dels A_{2A}R com a biomarcador en la fibril·lació auricular, vam determinar en primer lloc l'expressió d'A_{2A}R en els limfòcits perifèrics i vam demostrar que la seva expressió augmenta en els limfòcits de pacients amb fibril·lació auricular. L'expressió d'ARNm d'A_{2A}R també augmenta en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica de pacients amb fibril·lació auricular. A continuació es van determinar els nivells d'expressió d'A_{2A}R en diferents poblacions de limfòcits de subjectes amb i sense fibril·lació auricular. Així, els limfòcits es van separar en limfòcits T (CD3+ i CD8+) i limfòcits B (CD19+) i es va determinar la densitat A_{2A}R en cada població de limfòcits.

Curiosament, els resultats van demostrar que, si bé els A_{2A}R augmenten tant en els limfòcits T com en els B de pacients amb fibril·lació auricular, només les cèl·lules B van mostrar un augment significatiu en CD194, un marcador de *homing* cardíaca. A més, es va observar una correlació positiva entre l'augment de l'expressió dels A_{2A}R i la presència de CD194 en els limfòcits B. Conjuntament, aquests resultats suggereixen que els limfòcits B de pacients amb fibril·lació auricular van ser reclutats al cor i van mostrar una major expressió d'A_{2A}R, tot convertint-se en un marcador específic dels pacients amb aquesta arrítmia.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Receptors d'adenosina com a mediadors de l'activitat elèctrica auricular arítmica.

El descobriment que els pacients amb fibril·lació auricular tenen nivells plasmàtics d'adenosina més elevats que els pacients sense arrítmia, combinat amb troballes que demostren que l'activació d'A_{2A}R indueix alteracions en la distribució i incidència d'alliberament espontani de calci, que alhora indueix activitat elèctrica arritmogènica semblant a l'activitat observada en pacients amb fibril·lació auricular, suggereix que pot haver-hi una correlació entre els nivells plasmàtics d'adenosina i l'activitat elèctrica auricular ectòpica. Aquests resultats proporcionen una base fisiopatològica per investigar una possible correlació entre els nivells d'adenosina i la incidència d'activitat ectòpica auricular en pacients amb fibril·lació auricular paroxística o amb elevat risc de patir-la. A més, això també és cert per als nivells de CD194 en els limfòcits B (vegeu també receptors d'adenosina A_{2A} com a biomarcadors). En col·laboració amb cardíologs, actualment estem explorant la possibilitat de comprovar aquestes hipòtesis en un entorn clínic òptim.

Receptors d'adenosina com a dianes terapèutiques en la fibril·lació auricular.

El fet que l'activació excessiva dels A_{2A}R promogui l'activitat elèctrica arritmogènica, combinat amb la nostra troballa que els esdeveniments d'alliberament de calci arritmogènic induïts per l'estrès beta-adrenèrgic es mantenen a un nivell elevat d'adenosina (600 nM), mentre que l'efecte inotrópic positiu de l'estimulació beta-adrenèrgica és abolit per aquest nivell d'adenosina, tot plegat suggereix que l'efecte beneficiós de reduir els nivells d'adenosina elevats pot ser dual. En altres paraules, les

nostres troballes suggereixen que la normalització dels nivells plasmàtics d'adenosina (i/o adenosina desaminasa) en pacients amb fibril·lació auricular podria, al mateix temps, reduir la incidència d'activitat elèctrica ectòpica i augmentar la reserva inotròpica auricular en pacients amb fibril·lació auricular.

Les nostres troballes documenten que l'antagonista selectiu de l'A_{2A}R, SCH442416, es pot alliberar per fotoactivació (sense danyar els miòcits) de la molècula MRS7145 i revertir completament l'alliberament espontani de calci induïts per l'activació de l'A_{2A}R en preparacions de miòcits aïllats i multicel·lulars. Aquestes troballes obren la possibilitat d'utilitzar la fotoactivació d'MRS7145 com una eina farmacològica per administrar SCH442416 localment, i minimitzar així els efectes sistèmics potencialment adversos de l'antagonista. Per comprovar la utilitat d'MRS7145 caldrà abordar una investigació que explori la viabilitat d'administrar MRS7145 i alliberar SCH442416 en preparacions de cor intactes.

Receptors d'adenosina A_{2A} com a biomarcadors per a l'estratificació de risc en la fibril·lació auricular.

Aquest estudi va tenir com a objectiu avaluar la utilitat dels receptors d'adenosina com a biomarcadors per a l'estratificació del risc de patir fibril·lació auricular, i els resultats del projecte han revelat una correlació positiva entre l'augment de l'expressió d'A_{2A}R i la presència de CD194 (un marcador de *homing* per al cor) en els limfòcits B. A més, els nivells de CD194 van augmentar significativament en pacients amb fibril·lació auricular; això indica un augment en els nivells de CD194 com a segell específic dels pacients i suggereix que l'anàlisi dels nivells de CD194 en els limfòcits B podria ser una nova eina útil per predir el risc i la gravetat de la fibril·lació auricular. Actualment estem avaluant la possibilitat de patentar aquests resultats.

4. Bibliografia 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.

L'estudi va ser objecte d'un comentari editorial titulat: "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 Δ9-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.

Manuscris enviats per publicar

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* (versió revisada en preparació). 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* (versió revisada en preparació). 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 (versió revisada en preparació). *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.