



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



MOLÈCULES IMMUNOREGULADORES I miRNA COM A DIANES TERAPÈUTIQUES EN LA MALALTIA CORONÀRIA I LA SÍNDROME CORONÀRIA AGUDA

José Martínez González

CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Francisco Sánchez Madrid

Hospital Universitario de la Princesa - Madrid

1. Resum

Antecedents

La malaltia de les artèries coronàries (MAC) és la malaltia cardiovascular més freqüent. La MAC és una malaltia crònica la complicació de la qual pot ocasionar la síndrome coronària aguda (SCA), causada freqüentment per la ruptura d'una placa ateroscleròtica. Les lipoproteïnes oxidades (LDLox) desencadenen una resposta inflamatòria que està implicada en l'inici de la malaltia, en el seu desenvolupament i en la ruptura de la placa. El desequilibri entre la presència o funció de les cèl·lules T reguladores (Treg) i els limfòcits Th17 és un dels mecanismes que participen en aquest procés. Els resultats obtinguts pel grup han mostrat que les LDLox s'uneixen a la molècula immunoreguladora CD69 de limfòcits T induint així l'expressió dels receptors nuclears de la família NR4A. La molècula limfocitària CD69 és un regulador negatiu de la resposta Th17 i, al mateix temps, promotor de les cèl·lules Treg.

Objectius

i) Estudiar la participació de la unió de les LDLox a CD69 en la immunopatogènesi de la MAC a través de la regulació dels receptors NR4A utilitzant models *in vitro* i *in vivo*; ii) analitzar els nivells circulants de cèl·lules Th17 i Treg en pacients amb MAC i el perfil de miRNA de limfòcits T en resposta a les LDLox, i iii) estudiar el perfil de miRNA en plasma de pacients amb SCA i determinar possibles dianes de miRNA rellevants per a la MAC i l'SCA.

Mètodes

Per al desenvolupament d'aquests objectius es va utilitzar la línia cel·lular de limfòcits T humans Jurkat (JK) transfectada de manera estable amb CD69 (JKCD69) i el seu control respectiu (Jurkat wt, JKwt), així com ratolins deficients per a CD69 (CD69^{-/-}). Per al model d'aterosclerosi *in vivo* es van creuar aquests ratolins amb ratolins deficients per al receptor d'LDL (LDLR^{-/-}) i es van sotmetre a una dieta alta en greix. Per estudiar el paper de CD69 en l'SCA es va utilitzar el model d'oclusió de l'artèria coronària descendent esquerra en ratolins deficients o no per a CD69. El perfil d'expressió gènica i de miRNA de limfòcits T humans induït en resposta a la unió de CD69 a LDLox es va determinar mitjançant seqüenciació massiva.

Resultats

Els ratolins CD69^{-/-} específics de cèl·lules limfoides van desenvolupar una forma més greu de malaltia ateroscleròtica amb un augment de la relació de cèl·lules Th17/Treg. LDLox s'uneix de forma específica i funcional al receptor CD69 expressat en la superfície dels limfòcits T humans, i inhibeix la diferenciació de cèl·lules Th17 i indueix l'expressió dels receptors NR4A. La unió d'LDLox a CD69 va induir l'expressió de la molècula PD1 en limfòcits T humans, així com l'expressió del miRNA-663a, que té com a diana cel·lular el transportador d'aminoàcids SLC7A5.

L'estudi d'individus amb malaltia ateroscleròtica subclínica va mostrar una disminució de l'expressió de CD69 i NR4A1 en leucòcits de sang en comparació amb l'observada en les cèl·lules de subjectes sans.

En el model d'isquèmia miocardiaca, els ratolins CD69^{-/-} van desenvolupar una resposta de cèl·lules T gamma delta (T $\gamma\delta$) IL-17+ primerenca i un augment de la inflamació al miocardi. La transferència de cèl·lules Treg CD69+ a ratolins CD69^{-/-} va ser capaç de revertir la inflamació i la fallida cardíaca. Després de l'oclusió de l'artèria coronària es va detectar un augment de les Treg circulants i del miRNA-155 en plasma. La disminució de les Treg CD69+ o del miRNA-155 en mostres de pacients posterior a un infart de miocardi va ser un marcador de mal pronòstic.

Conclusions

La disminució de CD69 en les cèl·lules limfoides afavoreix el desenvolupament d'aterosclerosi i la seva expressió pot ser un marcador predictiu d'aterosclerosi subclínica en humans. La inducció de PD1 en resposta a la unió d'LDLox a CD69 podria explicar la funció reguladora negativa de CD69 en la resposta inflamatòria. L'expressió de CD69 en cèl·lules Treg és essencial per mantenir l'homeòstasi immune després d'un infart de miocardi i els nivells circulants del miR-155 podrien ser un indicador pronòstic en l'SCA.

2. Resultats

Les LDLox es van unir a les cèl·lules Jurkat CD69+ (JKCD69) de forma més eficient que a les cèl·lules control Jurkat wt (JKwt), i aquesta unió va ser capaç d'induir la internalització de CD69. La interacció de CD69 amb les LDLox va inhibir l'expressió d'IL-8 i IFN-gamma en JKCD69 activades, així com la diferenciació de cèl·lules Th17 en cultius primaris de cèl·lules humanes, mentre que va estimular la diferenciació de cèl·lules Treg. Els nostres resultats van mostrar que les LDLox indueixen l'expressió dels receptors NR4A1 i NR4A3 en limfòcits T CD4+ humans. La participació de CD69 en aquesta inducció es va demostrar en cèl·lules JKCD69 i JKwt mitjançant l'ús d'anticossos de bloqueig anti-CD69 i assajos d'RNA d'interferència. Finalment, mitjançant la seqüenciació massiva d'RNA vam analitzar els canvis d'expressió gènica i del perfil de miRNA induïts per la unió LDLox-CD69 en limfòcits T humans. Les dades van revelar una inducció de PD1 en el missatger, que vam confirmar mitjançant qPCR i en la proteïna. Vam fer un assaig de luciferasa que va confirmar que la interacció LDLox-CD69 activa el promotor de PD1. A més, vam determinar que aquesta unió incrementa l'expressió del mir-663a, regulador de l'expressió del transportador d'aminoàcids SLC7A5.

Per estudiar el paper de CD69 en el desenvolupament d'ateroesclerosi *in vivo*, els ratolins deficients per a CD69 (CD69^{-/-}) es van creuar amb ratolins deficients en el receptor d'LDL (LDLR^{-/-}) i es van generar quimeres mixtes per obtenir ratolins amb deficiència de CD69 específicament en el compartiment limfoide o mieloide. Per induir aterosclerosi, es van sotmetre els ratolins a una dieta alta en greix. En els ratolins CD69^{-/-} específics de cèl·lules limfoides vam observar un augment en la resposta Th17 i un percentatge més baix de Treg en sang perifèrica. Aquests ratolins van desenvolupar lesions ateroscleròtiques més greus amb centres necròtics més grans en comparació amb els ratolins CD69^{+/+} (figura 1). La deficiència de CD69 específica del compartiment mieloide no va modificar les respostes de les cèl·lules Th17 i Treg ni la formació de les plaques d'ateroma en comparació amb els ratolins CD69^{+/+}. D'altra banda, l'expressió d'NR4A1 i NR4A3 va ser menor en els ratolins CD69^{-/-} sotmesos a dieta alta en greix. Durant el desenvolupament de l'ateroesclerosi l'expressió de CD69 i NR41 en limfòcits va disminuir de manera gradual.

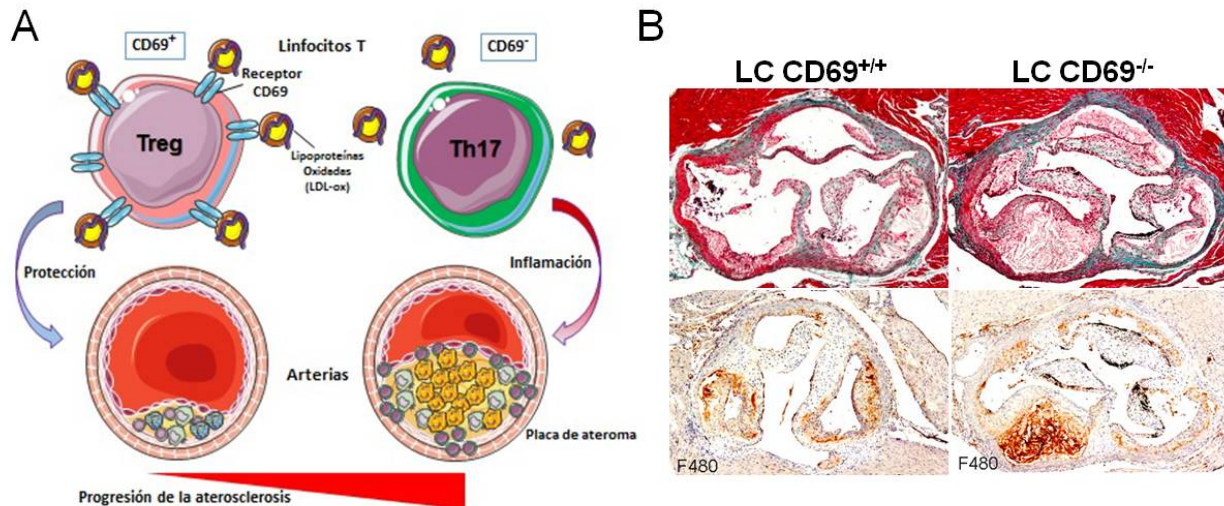


Figura 1. A) La deficiència de CD69 en les cèl·lules limfoides (LC CD69^{-/-}) afavoreix el desenvolupament d'ateroesclerosi a través de l'augment en l'expressió d'IL-17. **B)** Placa ateroscleròtica i centre necròtic en vàlvules aòrtiques de ratolins deficients per a CD69 en el compartiment limfoide.

Per determinar el paper de CD69 i NR4A1 en la malaltia ateroscleròtica humana, es van utilitzar mostres de l'estudi PESA (*Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*), que analitza la presència de plaques d'ateroma mitjançant tècniques d'imatge avançada. Els participants en l'estudi van ser classificats com afectats d'ateroesclerosi focal o generalitzada, segons el nombre de plaques detectades. Vam comparar l'expressió de CD69 i NR4A1 en individus amb malaltia focal (n = 55) o aterosclerosi subclínica generalitzada (n = 128) amb la de participants de l'estudi sense evidència d'ateroesclerosi subclínica (n = 122). Els nivells de CD69 es van correlacionar de manera significativa amb l'expressió d'NR4A1. Les anàlisis estadístiques van mostrar que l'expressió de CD69 és un factor predictiu independent d'ateroesclerosi primerenca (OR = 0,62, P = 0,0056) (figura 2).

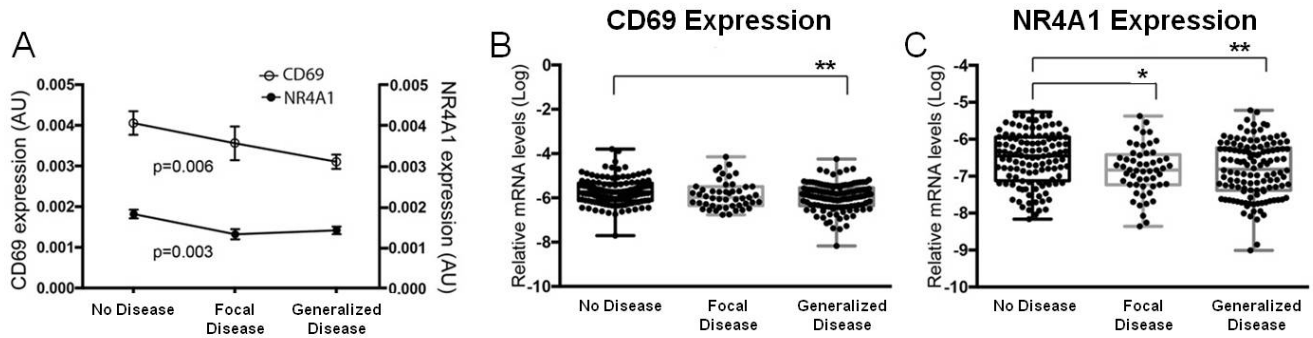


Figura 2. Expressió de CD69 i NR4A1 en leucòcits de sang perifèrica d'individus amb aterosclerosi subclínica classificats com a malaltia focal, generalitzada o subjectes sans. **A)** Disminució progressiva de l'expressió de CD69 i NRA4A1 durant el desenvolupament d'aterosclerosi en humans. **B i C)** Disminució de l'expressió de CD69 i NR4A1 en individus amb aterosclerosi subclínica en comparació amb subjectes sans.

Per determinar el paper de CD69 i els miRNA en la síndrome coronària aguda (SCA), vam estudiar l'expressió de CD69 en cèl·lules Treg en 238 pacients amb SCA (amb i sense elevació del segment ST) després de la cateterització i en 80 voluntaris sans. Respecte als factors de risc cardiovascular, en tots els casos el percentatge de pacients amb almenys un factor de risc sempre va ser superior al 90%; essent els tres més freqüents la dislipidèmia, la hipertensió arterial i antecedents de tabaquisme. Sobre la base de l'expressió de CD69 vam definir dues poblacions: un grup de pacients amb >50% de cèl·lules CD69+ i un grup de pacients amb <50% de cèl·lules CD69+ tant en els grups STEMI (*ST-segment elevation myocardial infarction*) com en els NSTEMI (*Non-STEMI*). Els CD4+ i Treg que expressen CD69+ es correlacionen significativament amb els nivells de troponina (TnT), creatina quinasa (CK) i amb anormalitats en la funció cardíaca. A més, els pacients amb nivells d'expressió de CD69 alts es correlacionen amb més TnT, cosa que indica una correlació entre l'expressió de CD69 i la gravetat del dany al cor en els pacients amb infart agut de miocardi (*acute myocardial infarction*, AMI). Vam trobar que la falta d'expressió de CD69 en les cèl·lules Treg en sang és un indicador de pacients amb mal pronòstic després d'un infart agut de miocardi, fet que suggereix que l'expressió de CD69 en les cèl·lules Treg circulants detectades de manera primerenca després de l'esdeveniment isquèmic podria ser un marcador de pronòstic (figures 3A i 3B).

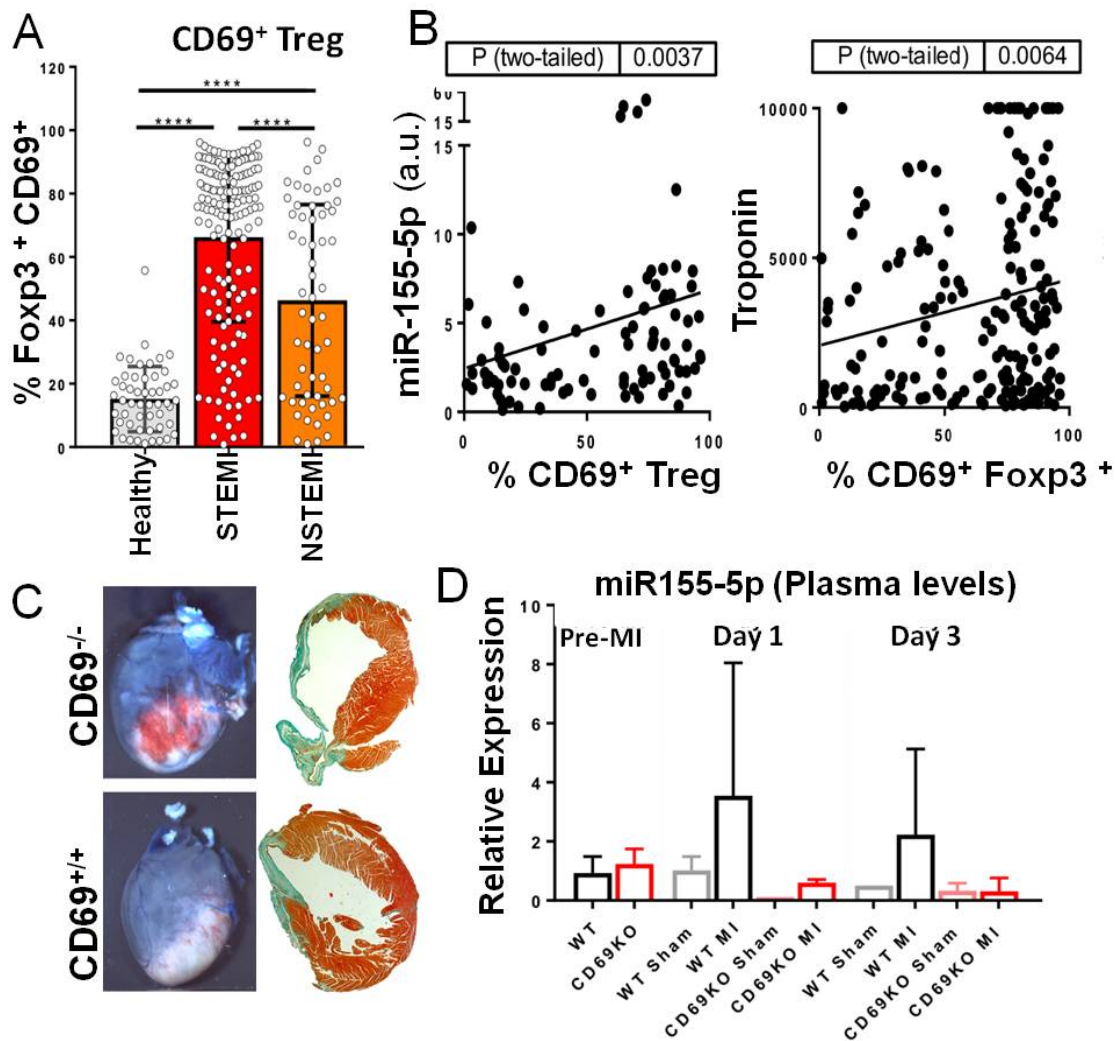


Figura 3. A) Els nivells circulants de cèl·lules CD69⁺ augmenten després d'un AMI, particularment en els pacients amb STEMI. **B)** S'observa una correlació dels nivells de cèl·lules CD69⁺ amb els nivells circulants de miR-155 i amb els nivells de troponina T. **C i D)** En els ratolins als quals s'indueix infart per lligadura de la LAD, aquest és més gran en els animals CD69^{-/-} (**C**). L'expressió de miR-155 és dependent de CD69, i després d'un infart el seus nivells augmenten en els animals WT (CD69^{+/+}) però no en els CD69^{-/-}.

Per estudiar les rutes reguladores de CD69 en l'SCA, vam analitzar ratolins CD69^{+/+} i CD69^{-/-} després de l'oclusió permanent de l'artèria coronària descendent anterior esquerra (*left anterior descending coronary artery*, LAD). Els ratolins CD69^{-/-} desenvolupen respostes de cèl·lules T γ δ IL17⁺ de manera primerenca després de la isquèmia, fet que indueix un increment de la inflamació del miocardi i, com a conseqüència, pitjor funció cardíaca. La transferència adoptiva de cèl·lules Treg CD69⁺ en ratolins CD69^{-/-} després de la lligadura de la LAD millora la supervivència i disminueix la fallida cardíaca, cosa que mostra el paper de CD69 en el manteniment de

l'homeòstasi immune després de l'AMI. Les cèl·lules CD69+ expressen el miRNA 155 (miR-155), augmenten la senyalització STAT-5 i promouen Foxp3 i la diferenciació de cèl·lules Treg. En aquest sentit, vam detectar un increment de cèl·lules Treg CD69+ així com dels nivells plasmàtics del miR-155 en ratolins després de la lligadura de la LAD (figures 3C i 3D). A més, en pacients que han patit un AMI tant els nivells de cèl·lules Treg CD69+ com els nivells plasmàtics del miR-155 es van correlacionar amb els nivells de TnT en sang.

Aquests resultats suggereixen que l'expressió de CD69 augmenta en paral·lel amb el dany cardíac i es contraresta l'excés d'inflamació (figura 4). Les nostres dades van mostrar que l'absència de CD69 en cèl·lules Treg o del miR-155 en plasma són indicadors de mal pronòstic en pacients amb infart de miocardi.

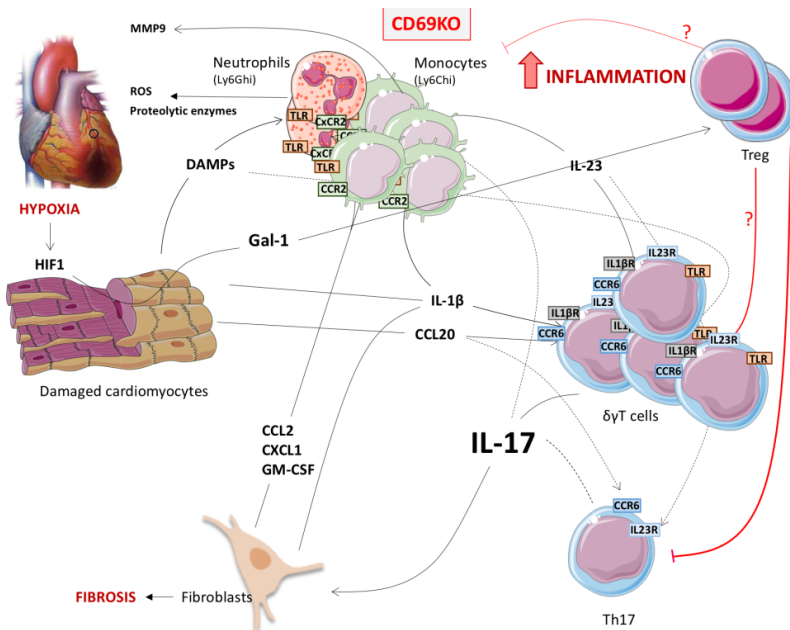


Figura 4. L'expressió de CD69 és important per al manteniment de l'homeòstasi immune després d'un infart agut de miocardi (AMI). L'absència de CD69 en les cèl·lules Treg induïx un augment de l'expressió d'IL-17 per les cèl·lules T gamma delta ($T\gamma\delta$) que es tradueix en més inflamació i en un remodelatge cardíac advers.

3. Rellevància i implicacions futures

La identificació de molècules que poden ser útils en el diagnòstic primerenc i el seguiment de pacients és una estratègia essencial en el maneig i prevenció de la malaltia arterial coronària. En aquest projecte hem identificat l'expressió del receptor d'activació leucocitari CD69 com un marcador independent d'ateroesclerosi subclínica. Així mateix, hem determinat que l'expressió del miR-155 i els nivells de limfòcits Treg CD69+ en sang perifèrica són indicadors de pronòstic en pacient amb infart de miocardi.

4. Bibliografia 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, Casasnovas 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.*

Versió revisada actualment en avaluació a *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

Enviat.

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.