

Estudio de las células T reguladoras Foxp3⁺CD69⁺ en muestras de sangre de pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM)

Daniela Poullion Díaz^{1, 2, a}, Pilar Martín Fernández^{2, b}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Departamento de Fisiopatología Vascular, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, España.

a. danyoullion@gmail.com b. pmartinf@cnic.es

Palabras clave: infarto agudo de miocardio; linfocitos T reguladores; antígeno CD69; Foxp3; miR-155

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, siendo el infarto agudo de miocardio (IAM) el de mayor índice de mortalidad y hospitalizaciones al año. La desestabilización de las placas de ateroma puede causar la liberación de un trombo y en el caso de las coronarias, el infarto, y se ha visto que las células inflamatorias juegan parte importante en este proceso. Este trabajo propone estudiar el fenotipo de las células hematopoyéticas circulantes en el IAM, específicamente los mecanismos inflamatorios en los que participan los tipos de células Th17 y T reguladoras (Treg) del sistema inmune adaptativo, así como el papel de otras moléculas implicadas en la diferenciación de los linfocitos T hacia estos linajes, como factores de transcripción y el marcador de activación leucocitaria CD69. Participaron de este estudio 425 pacientes ingresados con síntomas de IAM al Hospital La Princesa, quien colabora en este proyecto con el CNIC. Se sub-clasificaron según características diagnósticas en diversos grupos, siendo los que consideraremos en este estudio a quienes cursaron con y sin elevación del segmento ST (non/ST *elevation myocardial infarction*; STEMI y NSTEMI). La población está compuesta mayoritariamente por hombres con un promedio de edad entre 63 y 66 años. Más del 90% presentaba al menos un factor de riesgo cardiovascular, siendo los principales la dislipidemia, hipertensión arterial y hábito tabáquico. Se constató que la expresión del marcador CD69 y el miR-155 implicados en la diferenciación a Treg correlaciona con los biomarcadores cardíacos Troponina y CK-MB demostrando la activación del fenotipo regulador luego del infarto. Además, se observó mayor expresión de CD69Foxp3 en pacientes STEMI y NSTEMI con respecto a controles sanos, sugiriendo así que la vía de activación de las células Treg se pone en marcha luego del daño cardíaco para compensar la respuesta inflamatoria inicialmente generada.

Cita: Poullion Díaz, Daniela; Martín Fernández, Pilar (2019) Estudio de las células T reguladoras Foxp3⁺CD69⁺ en muestras de sangre de pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). *dianas* 8 (2): e201909fa02. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e201909fa02](http://www3.uah.es/dianas/e201909fa02) <http://www3.uah.es/dianas/e201909fa02>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Poullion-Díaz D, Martín-Fernández P. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan un 30% de las causas de muerte en España según lo refiere en el año 2018 la Fundación Española del Corazón (FEC). A nivel mundial las cifras también son de relevancia pues las ECV representan la principal causa de muerte. Sólo en 2016 causaron 17.9 millones de muertes [1]. Dentro del amplio rango de las ECV, el infarto agudo de miocardio (IAM) es el que representa la mayor causa de mortalidad y de hospitalizaciones al año [2]. El IAM se caracteriza por una isquemia en una región del músculo cardíaco, originada mediante una oclusión total o parcial de alguna de las arterias coronarias que lo irrigan. A este respecto, el acúmulo de lípidos y células hematopoyéticas en la pared vascular ocasiona lo que se conoce como placa de ateroma mediante el proceso de aterosclerosis. La placa obstruye parcialmente la arteria coronaria y puede llegar a romperse, ocasionando un trombo que impide la circulación sanguínea a una región del miocardio [3]. Sin embargo, también desde hace unos años ya se sabe el rol proaterogénico que la respuesta inflamatoria tiene en dichos eventos aterotrombóticos, ya que los lípidos mayoritariamente componen la placa de ateroma, pero son las células inflamatorias las que la desestabilizan causando su rotura y liberación del trombo [4]. No obstante, si bien se ha venido estudiando la interrelación entre el metabolismo de los lípidos con la respuesta inflamatoria, no está aún del todo claro y queda mucho por recorrer en este camino [3].

En este diverso grupo de ECV el diagnóstico diferencial puede ser complejo; sin embargo, estudios previos nos demuestran que la respuesta inmune en el momento agudo de los síntomas de daño cardíaco puede ser muy diferente según las situaciones, por lo tanto es imprescindible la búsqueda de nuevos biomarcadores que nos ayuden a clarificar el diagnóstico y/o pronóstico, ya que los utilizados hasta el presente, como elevaciones en los valores de las troponinas cardíacas (cTn) y la creatina-quinasa MB

(CK-MB) nos indican presencia de daño cardíaco pero no nos definen la causa de dicho daño, por lo que en la práctica resulta difícil interpretarlos sin la ayuda de otras herramientas [5, 6]. Actualmente, además de estos marcadores se recurre a técnicas de imagen como la coronariografía y la resonancia magnética cardíaca (RMC) [7], siendo esta última un método no invasivo válido para identificar daños del miocardio, sin embargo, no siempre disponible en todos los centros asistenciales [8].

Considerando la cantidad de investigaciones previas que mencionan la presencia de cambios en el balance de los linfocitos T en sangre de pacientes con diversas miocardiopatías, el objetivo de este estudio es caracterizar las poblaciones leucocitarias presentes en muestras de sangre en infartos agudos de miocardio y potenciales biomarcadores derivados de ellas. En este sentido cabe mencionar también a los microRNAs (miRNAs), los cuales surgen como una herramienta innovadora para el desarrollo de dianas terapéuticas en diversas enfermedades [9]. Los microRNAs son ARN endógenos formados por aproximadamente 20-22 nucleótidos que tienen como diana a ARN mensajeros para su escisión o la represión de su traducción, constituyéndose en importantes elementos reguladores [10]. Referente a las ECV también se ha estudiado que los microRNAs tienen diversos roles, y estarían implicados en la muerte y proliferación de los cardiomiocitos, y otros procesos en el corazón infartado como reparación por células progenitoras [9].

Así pues, este laboratorio tiene como uno de sus objetivos estudiar células y moléculas reguladoras implicadas en dichos procesos, para lo cual se ha enfocado en el papel del balance de las células T CD4 en la homeostasis de la inflamación. Se ha visto que los linfocitos Th17 tienen un carácter proinflamatorio mientras que los linfocitos T reguladores (Treg) tienen un perfil antiinflamatorio respecto a las citoquinas que cada uno de ellos produce, por lo que el equilibrio entre estos dos tipos de células en el foco inflamatorio es crucial para el desarrollo de la respuesta inmune [11, 12]. De hecho, los linfocitos T reguladores están implicados en la prevención de enfermedades autoinmunes [12] y se ha visto en modelos in vivo de aterosclerosis que atenúan la respuesta inflamatoria disminuyendo la progresión de las lesiones ateroscleróticas y controlando así el desarrollo de la enfermedad [13].

De manera general, cualquier daño cardíaco inicia una respuesta inflamatoria activando primeramente la inmunidad innata provocando el infiltrado de células como macrófagos y neutrófilos en el miocardio. Luego de la muerte de los cardiomiocitos se va formando cicatriz en su reemplazo, pudiendo comprometer seriamente la funcionalidad del órgano según el tamaño del infarto del miocardio, ya que cuanto mayor sea éste, mayor será el remodelado del tejido [14, 15]. Este proceso inflamatorio agudo se debe resolver de manera a evitar una activación prolongada de estos macrófagos y disminuir así el daño tras el IAM; y son células de la inmunidad adaptativa quienes se encargan de esta función [16]. Específicamente, se ha visto que las células Treg son las responsables de esta transición de la fase aguda inflamatoria luego del infarto hacia la resolución del mismo, gracias a la secreción local de citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento [17], quedando esto demostrado en estudios en los que ratones con ablación de Tregs inducidos a infarto de miocardio presentaban un tamaño aumentado del mismo, una deficiente resolución de la inflamación, persistencia de macrófagos con perfil inflamatorio y en definitiva un retraso en la curación de la zona isquémica afectada [18]. Esta función reparadora clave de los Tregs en la lesión inicial del corazón infartado está ampliamente descrita y bajo este supuesto se podría afirmar que los Tregs en el infarto mantienen un fenotipo antiinflamatorio estable y ejercen efectos protectores prolongados sobre la remodelación del miocardio al atenuar la activación de los macrófagos y las células T efectoras. Sobre esa base, se ha especulado que la terapia celular con Tregs puede ser un enfoque prometedor para los pacientes que sobreviven al IAM; sin embargo, se desconocen los mecanismos de acción de los Tregs en el desarrollo y control de la insuficiencia cardíaca isquémica crónica. De hecho, estudios recientes amplían el papel de los Tregs en el periodo posterior a la resolución de la inflamación luego del IAM; en este escenario, estas células sufren una transición de su fenotipo reparador a uno inflamatorio disfuncional que contribuye inclusive a la patogénesis del daño cardíaco crónico [17]. Todos estos datos generados en modelos animales indican la necesidad de realizar caracterizaciones exhaustivas de los perfiles de Treg en pacientes para explorar su función, mecanismos de acción y estudiar en profundidad su potencial en el diagnóstico de poblaciones con distinto riesgo tras un IAM.

Los linfocitos T, luego de su maduración en el timo y tras recibir distintos estímulos procederán a definirse hacia un linaje específico. Los linfocitos T colaboradores o efectoras CD4⁺, como respuesta a citoquinas y factores de transcripción específicos, se diferenciarán hacia varios tipos, como los inicialmente identificados Th1 y Th2, los cuales producen interferón gamma (IFN γ) e interleucina 4 (IL-4) respectivamente [19] (Fig.1A). Posteriormente se definieron más subpoblaciones de células T CD4⁺, como Th17, que secretan interleucina 17 (IL-17) e interleucina 22 (IL-22) y promueven la respuesta proinflamatoria, estando implicados en los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos específicos y en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes [20, 21]. El factor de transcripción implicado en la diferenciación a Th17 es ROR γ t (*retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma*), y se activa a través de la señalización de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) quien a su vez es fosforilado mediante señales provenientes de citoquinas como el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) e interleucina 6 (IL-6). Así mismo, la señalización por interleucina 23

(IL-23) es importante para mantener la función de las células Th17 [21, 22, 23, 24]. Por otro lado, el marcador de activación de linfocitos CD69 (receptor de lectina tipo C) interviene en la diferenciación de los linfocitos T reguladores. La cola citoplasmática del receptor CD69 se asocia con JAK3 (*Janus kinase 3*), promoviendo la fosforilación de STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) y su posterior traslocación al núcleo donde activa al factor de transcripción Foxp3 (*forkhead box P3*) mediante su unión a BIC (*B-cell integration cluster*), un gen que codifica la transcripción del precursor del miRNA 155 (miR-155). Una vez en el citosol, este miRNA inhibe a SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) quien inhibe a STAT5, por lo que entonces la presencia de miR-155 genera un ciclo de retroalimentación positiva, favoreciendo así a la diferenciación de las células Treg [25] (Fig.1B). Foxp3 estimula también la expresión de TGF-β e interleucina 2 (IL-2), citoquinas que incrementan la diferenciación al linaje regulador [26]. A la vez de inducir la diferenciación a Treg, la señalización a través de CD69 inhibe la diferenciación a Th17; ya que al activar a STAT5, éste impide la traslocación al núcleo de STAT3 inhibiendo la transcripción de RORγt [27, 28].

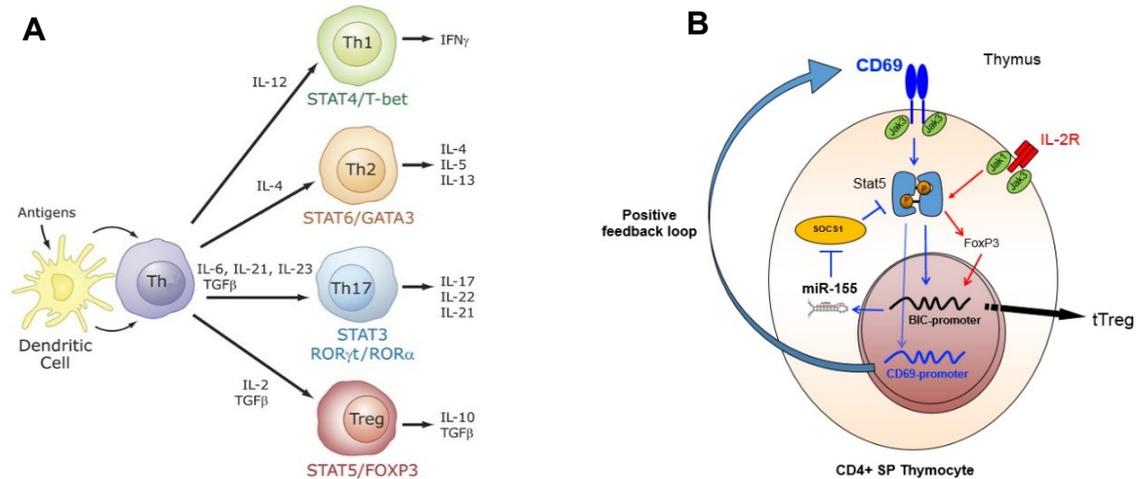


Figura 1.- Diferenciación de las células T CD4 y señalización molecular del receptor CD69.

- La diferenciación de las células T CD4⁺ en distintos linajes efectoras requiere la implicación de varias citoquinas y la activación de cascadas de señalización y factores de transcripción específicos. Las células efectoras resultantes se caracterizan por la producción de determinadas citoquinas que se traducen en funciones inmunorreguladoras concretas para cada caso. Figura original del trabajo de Jetten, A. 2009. *Retinoid-related orphan receptors: critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism*. Nuclear Receptor Signaling.
- Señalización molecular de CD69 en células T CD4⁺. La cola citoplasmática de CD69 se asocia con JAK3 promoviendo la fosforilación y traslocación al núcleo de STAT5, y la activación de Foxp3 mediante su unión a BIC. Este gen es responsable de la transcripción de miR-155, quien en el citosol inhibe a SOCS-1, de manera que éste ya no inhibe a STAT5, favoreciendo así a la diferenciación de las células Treg. Figura original del trabajo de Sánchez-Díaz, R. et al. 2017. *Thymus-derived regulatory T cell development is regulated by C-type lectin-mediated BIC/microRNA 155 expression*. Mol Cell Biol.

Estudios previos de nuestro laboratorio ponen en evidencia que la presencia de CD69 está efectivamente implicada en la regulación de los linajes Th17/Treg de las células T. Se va visto en modelos de ratones *knock-out* para CD69 que éstos tienen un peor pronóstico y menor supervivencia tras ser sometidos a IAM respecto a los ratones *wild-type* (datos no publicados). Además, existe evidencia suficiente que demuestra que la deficiencia de CD69 en modelos in vivo de enfermedades tiene implicaciones en el desarrollo de las mismas; como es el caso de la miocarditis autoinmune experimental, un modelo de miocarditis post-infección en ratones, en la que animales deficientes de CD69 desarrollaron una respuesta inflamatoria Th17 exacerbada progresando finalmente a insuficiencia cardíaca [29]; en el área de alergias y autoinmunidad se demostró que la expresión de CD69 es crucial para el control de la función supresora de los Tregs en la inmunotolerancia [30]; así también se observó que CD69 sirve como mediador clave en la patogénesis de la psoriasis al controlar señales metabólicas que contribuyen al desarrollo de la enfermedad [31]. Recientemente se ha demostrado que la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) induce la expresión de Foxp3 gracias a su unión a CD69. Esta unión confiere un fenotipo regulador que se observó mejora la aterosclerosis en modelos in vivo. Además, la expresión de CD69 en células T circulantes correlaciona inversamente con la presencia de aterosclerosis subclínica en un estudio realizado en individuos sin sintomatología [32].

Por todo esto, en este trabajo hemos profundizado en el estudio de la respuesta inflamatoria a través del fenotipado de los leucocitos de sangre periférica y más en concreto de las células T Th17 y Treg, así como la expresión de CD69 y miR-155 en el plasma de pacientes de IAM. La presencia de células Treg CD69⁺ así como del miR-155 se correlaciona con una elevación de las troponinas en estos pacientes lo

que sugiere que esta población se activa específicamente tras un IAM. Estos datos abren un campo de investigación para el estudio del potencial de estas células como posibles candidatos a biomarcadores, o para estudiar la evolución de un paciente tras el infarto.

Métodos

Para el logro de estos objetivos, el grupo tiene una colaboración estable con el Dr. Fernando Alfonso Manterola (Jefe del servicio de Cardiología del Hospital Universitario La Princesa, Madrid). Las muestras de sangre de estos pacientes se reciben en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) el mismo día del ingreso en el hospital, iniciándose posteriormente su procesamiento. Existe para tal efecto un permiso aprobado por el Comité Ético de dicho Hospital y del Instituto de Salud Carlos III para el análisis de las muestras en el CNIC.

Criterio de inclusión de pacientes para el estudio

Se reclutaron pacientes con IAM (síndrome coronario agudo con o sin elevación del ST y aumento significativo de la creatina quinasa MB y troponina, angina inestable confirmada por dolor torácico en reposo con isquemia definida incluyendo cambios del segmento ST y/o inversión de la onda T, y evidencia angiográfica de estenosis coronaria arterial >70%). Ninguno de los pacientes fue tratado con fármacos anti-inflamatorios, esteroideos o no esteroideos.

La inclusión de pacientes se viene realizando desde el año 2017, habiéndose reclutado hasta el momento 425 pacientes en total, los cuales posteriormente se sub-clasifican como será detallado más adelante. Durante el periodo de ejecución de este proyecto de fin de máster se han procesado las muestras de los pacientes ingresados entre abril y agosto de 2019, pero se ha considerado para el análisis global los datos del total de pacientes del estudio.

Análisis de Th17 y Treg en sangre de pacientes

Los análisis se realizaron a partir de 2 ml de sangre (como mínimo) mantenida con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético). 1 ml se utilizó para el análisis de leucocitos de sangre periférica (PBLs) después de su aislamiento mediante un gradiente de densidad (Ficoll). Este método de separación se fundamenta en la diferencia de densidad entre células mononucleares y el resto de los componentes sanguíneos; al ser menos densas, las células mononucleares quedan por encima de la capa de Ficoll, y los granulocitos y eritrocitos, al tener mayor densidad quedan debajo de la capa de Ficoll. El volumen restante de sangre se utilizó para el análisis de plasma. Los PBLs fueron sometidos a protocolos de marcaje celular que serán descritos a continuación; y posterior análisis por citometría de flujo para determinar el fenotipo de la respuesta inmune periférica aguda.

Marcajes celulares y análisis FACS

En el proceso de marcaje y análisis por citometría de flujo (FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*), el primero en ser realizado es el de las poblaciones mieloides. Para lo cual, los PBLs aislados mediante gradiente de densidad con Ficoll, fueron resuspendidos en tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato [PBS], albúmina sérica bovina al 5% [BSA], EDTA 0.5 M) para luego ser incubados con anticuerpos específicos de humanos conjugados con fluorocromos contra CD4, CD66b, CD16, CD14 y HLA-DR. Para los marcajes de las poblaciones Th17 y Treg las células fueron dejadas en cultivo "overnight" en placas de fondo plano p96. Para activar las células T se realizó previamente la preparación de la placa con anti-CD3 (solución OKT3 3µg/ml en PBS 1x). De esta manera nos aseguramos de que las células estén activadas y expresen en su membrana al marcador CD69. Las células fueron dejadas en medio RPMI suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS), l-glutamina, antibióticos, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y β-mercaptoetanol. El medio fue calculado en cada caso tras contar las células y ajustar el volumen para dejarlas a 2.5 millones/ml. El marcaje de membrana para la población Treg se realizó con anticuerpos específicos de humanos conjugados con fluorocromo contra CD4, CD45RO (para identificar linfocitos T de memoria), CD45RA (para identificar linfocitos T naive), CD69 y CD25; y para el marcaje intracelular de Foxp3 utilizamos el kit de tinción Foxp3 (Miltenyi Biotec). Finalmente, para el tercer grupo de marcajes, la población Th17, se dejaron las células en estimulación por 4 horas con PMA (acetato de miristato forbol), ionomicina y brefeldina A; con el fin de promover la activación de los linfocitos T y síntesis de citoquinas al mismo tiempo bloqueando su secreción para asegurarnos de que éstas permanezcan dentro de la célula. Antes de proceder al marcaje, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% y se permeabilizaron con saponina al 0.5%. Las células se incubaron con anticuerpos específicos de humanos conjugados con fluorocromo contra IL-17, IL-22 e IFN-γ. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BD Biosciences. Las células se analizaron en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences) equipado con cuatro láseres (405, 488, 561 y 640 nm) y los datos se procesaron con FlowJo v10.6.0 (TreeStar) (Fig.2).

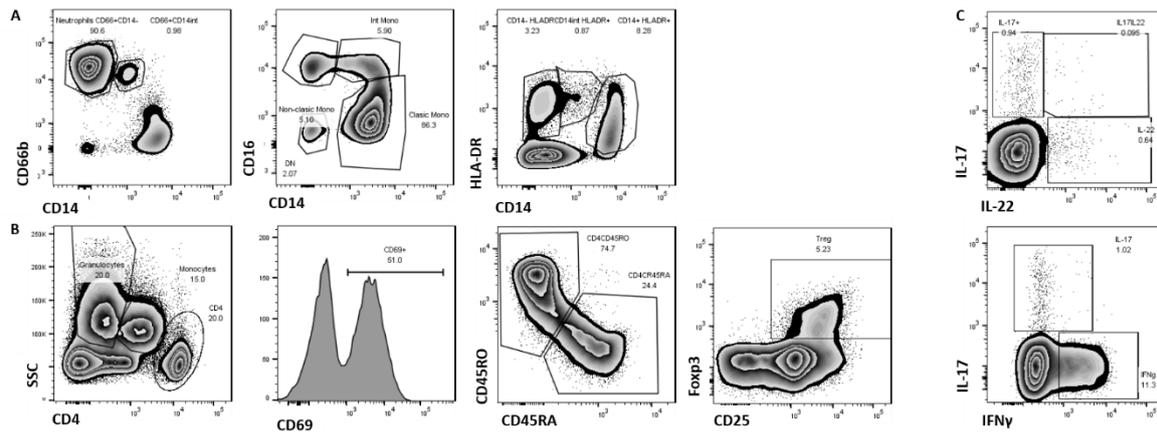


Figura 2.- Plots representativos de FACS mostrando análisis fenotípico de los PBL de los pacientes.

(A) Análisis de las poblaciones mieloides. (B) Análisis de los marcajes intranucleares, de células Treg, de células T memoria/naive, de la expresión F_{oxp3}/CD25. (C) Análisis de los marcajes intracelulares de Th17, Th22, Th1.

Perfil de miRNAs en pacientes

Los niveles de expresión del miRNA-155 se analizaron en el plasma de los pacientes mediante qPCR con sondas Taqman. Para ello, primeramente, el RNA total se extrajo del plasma de los pacientes con el Kit miRVANA (Invitrogen). La pureza y concentración se determinaron con un NanoPhotometer (Pearl). La transcripción reversa se realizó utilizando el Kit miRCURY LNA RT (Qiagen). Se realizó un análisis de PCR cuantitativo en tiempo real con un termociclador ABI Prism 7900HT 384 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre 2 medias, los valores de P se calcularon mediante la prueba T (*T test*) no pareada o la prueba de la U de Mann-Whitney según la prueba de normalidad, y las diferencias entre medias de más de dos grupos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía o la prueba de Kruskal-Wallis según la prueba de normalidad. Para los análisis de correlaciones se calculó el p valor a través del coeficiente de correlación Pearson o Spearman según la prueba de normalidad. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas a p valor <0.05. El software utilizado para dichos análisis fue GraphPad Prism (versión 7).

Resultados

Características de la población estudiada

El total de pacientes reclutados con síntomas de infarto agudo de miocardio ha sido clasificado en varios grupos diagnósticos: STEMI (aquellos que se presentan con elevación del segmento ST), NSTEMI (aquellos sin elevación del segmento ST), UA (*unstable angina*), SA (*stable angina*); MINOCA (*myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries*); NTCO (*non-thrombotic coronary occlusion*); MYO/PERICARDITIS y TAKOT-SUBO; siendo procesados y analizados los datos de todos los pacientes. En el presente estudio hemos analizado únicamente IAM con diagnóstico confirmado por angiografía coronaria. En todos los casos, los hombres representaron mayoría frente a las mujeres; con edad promedio de presentación de estos eventos entre 63.13 y 65.39 años. El dato denominado TIDS hace referencia al tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas hasta la admisión hospitalaria, y con respecto a esto los casos de STEMI son los que hacen acudir al paciente al hospital en el mismo día de aparición de los síntomas prácticamente en casi todos los casos (TIDS 0.380 días), mientras que en los NSTEMI el promedio es de 2.72 días. Respecto a los factores de riesgo cardiovascular, en todos los casos el porcentaje de pacientes que presentaba al menos un factor de riesgo siempre fue mayor al 90%; siendo los tres más frecuentes dislipidemia, hipertensión arterial y antecedente de haber sido fumador o actual fumador. En la Tabla 1 se resumen además los datos respecto a los biomarcadores, presencia de alteración en el electrocardiograma (ECG), presencia de vasos enfermos, ecocardiografía realizada durante la admisión, promedio de los valores de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y presencia de anomalías de contracción segmentaria. Datos referentes a la realización de la resonancia magnética cardiovascular (RMC) son escasos; pero los pocos números de pacientes cuyos datos de RMC se disponen presentan realce tardío con gadolinio, indicador de regiones con fibrosis miocárdica.

Parámetro	DD	Grupo Control	DD	STEMI	DD	NSTEMI	P Valor
N		80		196		74	
Edad, años	80	42.31±1.2	193	63.13±12.98	74	65.39±13.32	0.1327
Sexo (mujer/hombre)	80	41/39	192	42/150	74	20/54	
TIDS, días	-	-	192	0.380±1.264	71	2.718±6.668	<0.0001
FRC, %		-	192	96.87	74	93.24	
Dislipidemia, %		-	192	54.69	74	68.92	
Fumador o ex-fumador, %		-	192	75.5	74	59.46	
HTA, %		-	192	52.60	74	58.11	
Diabetes, %		-	192	20.31	74	27.03	
Insuficiencia Renal, %		-	192	8.33	73	6.85	
EAP, %		-	192	4.69	73	6.85	
Biomarcadores			192		73		
Pico Troponina I		-	03	5.91±5.044	25	4.904±6.759	0.3474
Pico Troponina T		-	189	4488.9±7643	48	1157.4±2136	<0.0001
Pico CK, U/L		-	192	1645.1±1444	68	371.4±414.8	<0.0001
Alteraciones ECG%	80	100	192	100	74	70.27	
Elevación segmento ST, %	80	0	192	98.96	74	41.89	
Onda-Q, %	80	0	192	31.25	74	16.22	
TC o angiografía coronaria realizada, %		0	192	100	74	100	
EAC, %		-	192	100	74	93.24	
Eocardiografía en admisión, %	80	100	190	100	65	100	
FEVI, %	80	63.81±0.55	190	52.98±10.27	65	57.58±9.569	0.0012
Anomalías de contracción segmentaria, %	80	0	190	89.47	65	56.92	
RMC realizada, %		11.25	8	100	1	100	
RTG, %	9	0	8	100	1	100	

Tabla 1.- Características de la población estudiada. Los datos se expresan como medias ± SD o como porcentajes de pacientes. DD, pacientes con datos disponibles; TIDS, tiempo de inicio de los síntomas hasta admisión hospitalaria; FRC, factores de riesgo cardiovascular; HTA, hipertensión arterial; EAP, enfermedad de la arteria periférica; CK, creatina quinasa; ECG, electrocardiograma durante admisión; EAC, enfermedad de la arteria coronaria; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; RMC, resonancia magnética cardiovascular; RTG, realce tardío con gadolinio. P-valor calculado mediante Test de Mann-Whitney.

Fenotipo inmunológico periférico

Las muestras de sangre de los pacientes fueron sometidas a análisis de todas las poblaciones leucocitarias previamente expuestas (Tabla 2). Han sido analizados los datos de pacientes hombres y mujeres por separado no observándose diferencias significativas por lo que se presentan los datos de ambos sexos juntos, agrupados tan sólo por diagnósticos (donadores sanos como grupo control, STEMI y NSTEMI). Respecto a las subpoblaciones analizadas, no se ha obtenido correlación entre células mieloides circulantes y los niveles de biomarcadores cardiacos. Sin embargo, la expresión de CD69 en células T se correlaciona con estos marcadores de daño cardiaco por lo que se ha enfocado el estudio en el análisis de estas subpoblaciones de células T CD4⁺ y Treg CD69.

	TnT	CK	FEVI
CD4+	P= 0.0210	P= 0.0008	P= NS
CD4+ CD69+	P= 0.0061	P= 0.0005	P= NS
Foxp3+	P= NS	P= NS	P= NS
Foxp3+ CD69+	P= 0.0064	P= 0.0015	P= NS
IFNγ	P= NS	P= NS	P= NS
IL17	P= NS	P= NS	P= NS
IL22	P= 0.0172	P= 0.0270	P= NS (0.0516)
CD14+HLADR+	P= NS	P= NS	P= NS
CD14+HLADR-	P= NS	P= NS	P= NS
CD14intHLADR+	P= NS	P= NS	P= NS
CD66+CD14int	P= NS	P= NS	P= NS
Lymphocytes	P= NS	P= NS	P= NS
Classic Monocytes	P= NS	P= NS	P= NS
CD14-CD16-	P= NS	P= NS	P= NS (0.0650)
Int Monocytes	P= NS	P= NS	P= NS
Non-classic Monocytes	P= NS	P= NS	P= NS
Myeloids	P= NS	P= NS	P= NS
CD16intHLADR+	P= NS	P= NS	P= NS
CD16+HLADR+	P= NS	P= NS	P= NS
CD16+HLADR-	P= NS	P= NS	P= NS
CD16-HLADRint	P= NS	P= NS	P= NS
CD66+CD14int	P= NS	P= NS	P= NS
CD66+CD14lo	P= NS	P= NS	P= NS
Neut. CD66b+CD14lo	P= NS	P= NS	P= NS

Tabla 2.- Resumen de datos de correlación. P valores de correlaciones de todas las poblaciones leucocitarias analizadas frente a marcadores de daño cardiaco: TnT, troponina T; CK, creatina quinasa; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

Tras el análisis FACS se observa que la población total de células T efectoras CD4⁺ se encuentra significativamente más elevada en los controles sanos que en los casos de infarto (Fig.3A), no obstante, al caracterizar cada subpoblación de interés dentro de las CD4⁺ es cuando realmente se obtienen los datos de relevancia. Las células CD4⁺CD69⁺ se expresan en mayor porcentaje en los IAM respecto al control sano, siendo los STEMI los que presentan mayor expresión (Fig.3B). Así también, el marcador de las células Treg, Fcpx3, se expresa mayoritariamente en los infartos (Fig.3C) y las CD69⁺Fcpx3⁺ presentan un patrón aún más elevado de expresión en los infartos STEMI y NSTEMI respecto al grupo control (Fig.3D) demostrando que la expresión de Fcpx3 está estrechamente relacionada con la señalización a través de CD69 tal como está descrito, promoviendo así el fenotipo regulador. En el análisis de las poblaciones Th17 y Th1 no se observan cambios significativos en los infartos entendiéndose que esto se debe a que, al estar activado el fenotipo regulador reparando el daño, estas subpoblaciones de perfil inflamatorio se encuentran compensadas (Fig.3E y 3F).

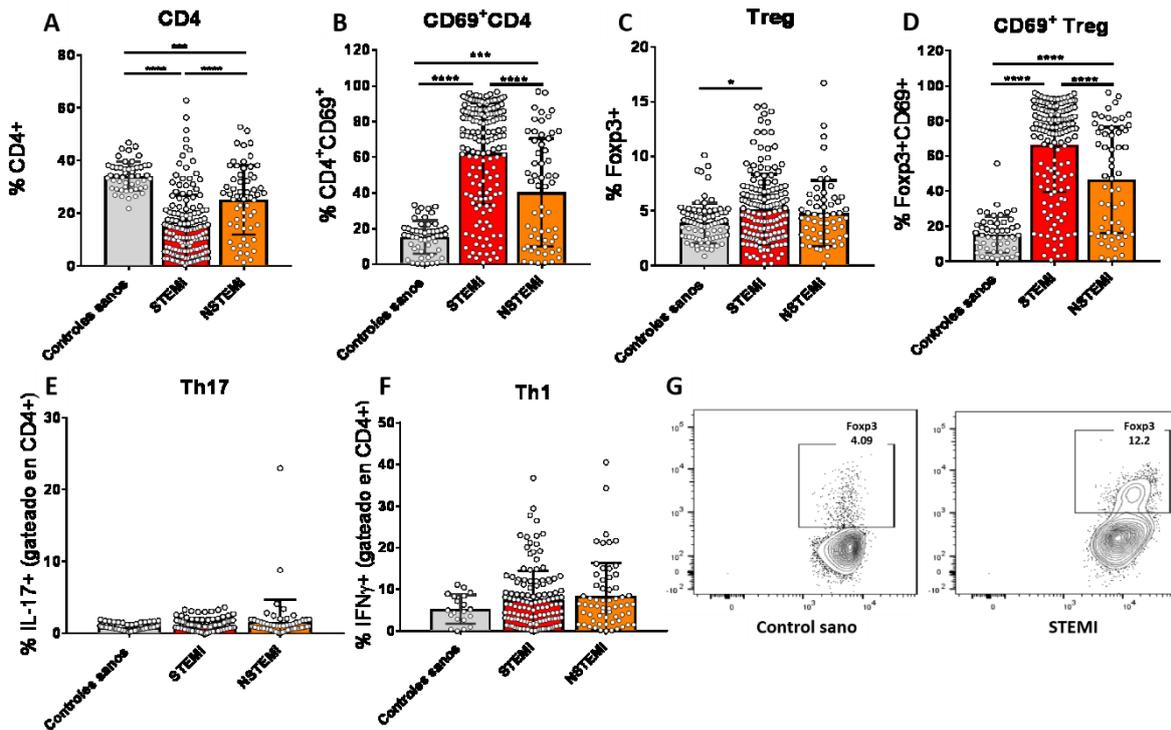


Figura 3.- Fenotipo inmunológico periférico. Análisis estadístico de las poblaciones (A) CD4⁺, (B) CD4⁺CD69⁺, (C) Fcpx3⁺, (D) CD69⁺Fcpx3⁺, (E) Th17, (F) Th1 en controles sanos y pacientes con IAM STEMI y NSTEMI. Test de Kruskal-Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar. (G) Plots de FACS representando la expresión de Fcpx3 en un control sano y un paciente STEMI.

La expresión de CD69 en células T se correlaciona con marcadores de daño cardíaco

Luego del análisis de todas las poblaciones leucocitarias presentadas en la Tabla 2, hemos visto que la mayor expresión de CD69 se correlaciona con el aumento en los valores de los marcadores de daño cardíaco, demostrando la activación de las células T CD4⁺ hacia el fenotipo regulador para disminuir el daño provocado tras el infarto.

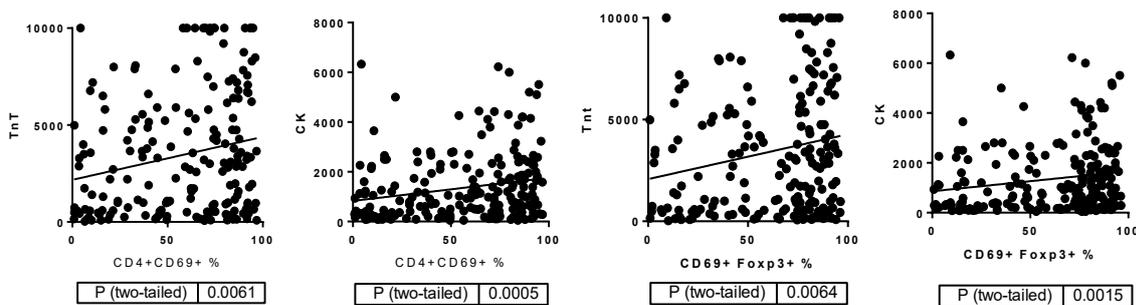


Figura 4.- Gráficas de las correlaciones entre los marcadores de daño cardíaco -TnT, troponina T y CK, creatina quinasa- y las células CD4⁺CD69⁺ y CD69⁺Fcpx3. Prueba de correlación de Spearman.

El miR-155 circulante se correlaciona con la expresión de CD69 en las células T

Por lo anteriormente expuesto, analizamos además el miR-155 en plasma de los pacientes en la búsqueda de un biomarcador soluble de daño cardíaco, y para comprobar que su expresión correlacionara con la de CD69. El análisis del miR-155 realizado nos muestra que en efecto, su expresión se encuentra significativamente aumentada en los infartos respecto al grupo control sano (Fig.5A), y que existe una notable correlación positiva entre este parámetro y la expresión de CD69 (Fig.5B) confirmando efectivamente el vínculo existente entre este microRNA y la mayor expresión de células CD69⁺Foxp3 como se describe en la vía de diferenciación de células T reguladoras. Para poder tener una mejor visualización de este hecho, se han dividido los pacientes en dos grupos según tengan CD69⁺Foxp3⁺ mayor o menor al 50% (denominados para el efecto CD69 Alto / CD69 Bajo) y bajo esta consideración se vuelve a comprobar que la expresión del miR-155 es significativamente mayor en el grupo de pacientes que tiene CD69⁺Treg mayor al 50% (Fig.5C). Además, se analizaron los datos obtenidos previamente por el grupo, correspondientes a la expresión del mRNA de SOCS-1, constatando que efectivamente éste se encuentra disminuido en pacientes con mayor expresión de CD69⁺Treg (Fig.5D), corroborando así la señalización descrita. Así mismo, se puede observar que parece haber una correlación entre los niveles de expresión del miR-155 y marcadores de daño cardíaco como la troponina T (Fig.5E) y lo mismo se manifiesta en el análisis por grupos de mayor y menor expresión de CD69, donde se observan valores más altos de troponina en el grupo de pacientes de CD69⁺Treg elevado (Fig.5F) indicativo de que las células T reguladoras están actuando cuando se produce daño en el miocardio.

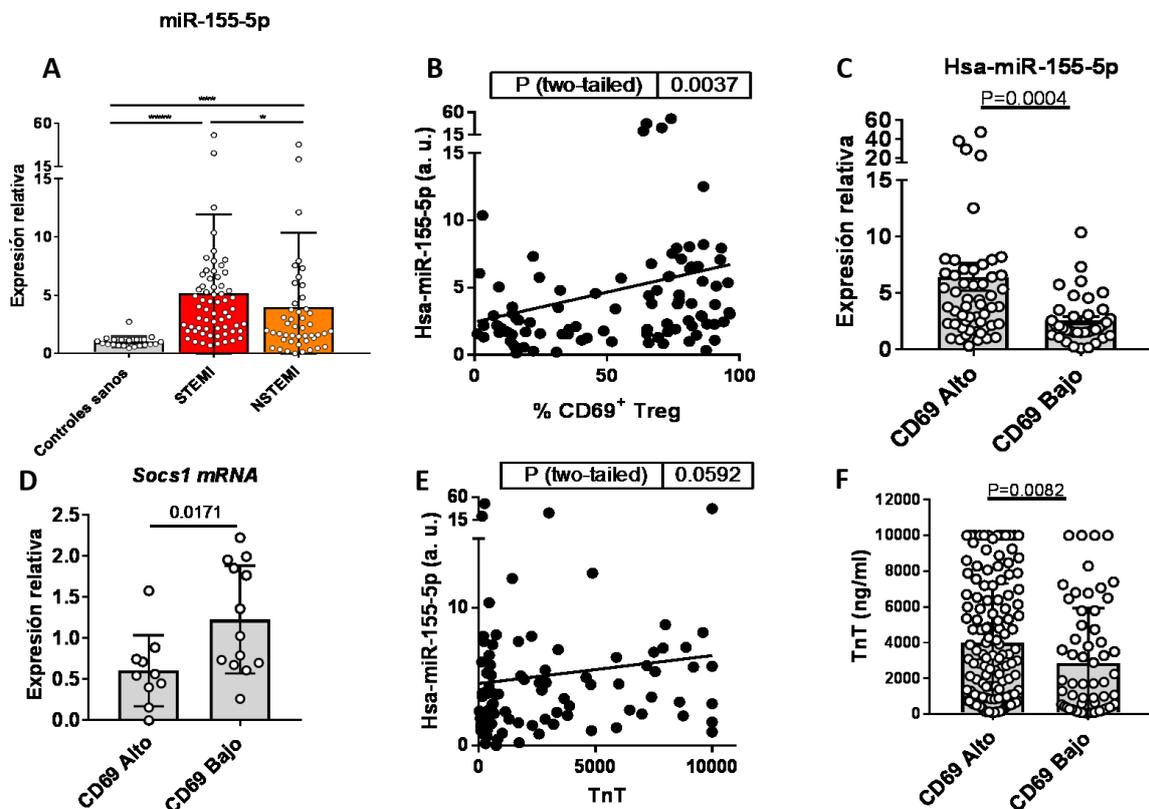


Figura 5.- (A) Análisis estadístico de la expresión de miR-155 en grupos: control, STEMI y NSTEMI. (B) Gráfica de correlación entre miR-155 y CD69⁺Treg. (C) Expresión relativa de miR-155 en grupos de pacientes con CD69⁺Treg mayor y menor al 50%. (D) Expresión relativa de SOCS-1 mRNA en grupos de pacientes con CD69⁺Treg mayor y menor al 50%. (E) Gráfica de correlación entre miR-155 y Troponina T (TnT). (F) Expresión de Troponina T (TnT) en grupos de pacientes con CD69⁺Treg mayor y menor al 50%. A.U, *arbitrary units* – unidades arbitrarias.

Discusión

Como las ECV tienen una alta importancia e impacto en la salud pública mundial resulta imprescindible el estudio de todos los aspectos posibles implicados en ellas. En el caso del IAM, por años se ha centrado especial atención en los lípidos como protagonistas de la fisiopatología de la enfermedad aterosclerótica. Sin embargo, estudios posteriores demostraron el papel fundamental del componente inflamatorio en esta patología. Por este motivo nos hemos enfocado en el estudio de las células Treg como marcadores de IAM a partir de muestras de sangre de 425 pacientes, a través del cual se comprobó que la presencia de células Treg CD69⁺ así como del miR-155 se correlacionan con una elevación de las troponinas en estos pacientes lo que sugiere que esta población se activa específicamente tras un infarto. Estos resultados plantean el potencial de estas células como candidatos a biomarcadores.

La presente caracterización del fenotipo inmunológico periférico obtenido de una cohorte tan sólida de pacientes brinda un panorama interesante para posteriores estudios sobre predicción de la evolución o mejora de un paciente que sobrevive al IAM, ya que también fueron analizados datos de algunos pacientes de la cohorte que han tenido una peor evolución posterior al infarto y se constató que presentan niveles bajos de expresión de CD69 en las células Foxp3 que el resto de los pacientes; aunque no llega a ser una diferencia significativa en el reducido subgrupo de pacientes analizado, esta tendencia podría sugerirnos que efectivamente en personas con menor expresión de CD69 habría peor resolución respecto a la homeostasis de la inflamación, convirtiéndose así en potencial biomarcador o predictor de la evolución tras IAM.

Se deberá seguir profundizando el estudio para poder ver un perfil más claro como en los modelos in vivo. Esto normalmente representa un desafío en muchos estudios: poder trasladar los datos obtenidos en modelos animales a la clínica de los pacientes; por ese motivo este proyecto puede ser considerado de gran impacto, ya que a través de él se están obteniendo datos sobre el fenotipo inmunológico periférico en el infarto agudo de miocardio en un número importante de pacientes - que continúan reclutándose - que nos permite comprender mejor la respuesta inflamatoria real con miras a identificar posibles dianas y modos de intervenirlas para un mejor pronóstico.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Pilar Martín por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de fin de máster en su laboratorio y en tan prestigioso centro; y a todos los miembros de su equipo de investigación que me brindaron su ayuda durante mi estancia allí.

Referencias

1. Cardiovascular Diseases. 2017 (17 mayo). En World Health Organization. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Andrés, E., Cordero, A., Magán, P., Alegría, E., León, M., Luengo, E., Magallón, R., García, L. and Casasnovas, J. A. 2012. Mortalidad a largo plazo y reingreso hospitalario tras infarto agudo de miocardio, un estudio de seguimiento de ocho años. *Rev Esp Cardiol.* 65(5):401-99.
3. Lim, H., Kim, Y.U., Sun, H., Lee, J.H., Reynolds, J.M., Hanabuchi, S., Wu, H., Teng, B.B. and Chung, Y. 2014. Proatherogenic conditions promote autoimmune T helper 17 cell responses in vivo. *Immunity.* 40(1):153-65.
4. Libby, P. 2017. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond. *J Am Coll Cardiol.* 70(18):2278-2289.
5. Kytö, V., Sipilä, J. and Rautava, P. 2015. Acute myocardial infarction or acute myocarditis? Discharge registry-based study of likelihood and associated features in hospitalised patients. *BMJ Open.* 5(5):e007555.
6. Agewall, S., Giannitsis, E., Jernberg, T. and Katus, H. 2011. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. *Eur Heart J.* 32(4):404-11.
7. Gannon, M., Schaub, E., Grines, C. and Saba, S. 2019. State of the art: Evaluation and prognostication of myocarditis using cardiac MRI. *J Magn Reson Imaging.* 49(7):e122-e131.
8. Caforio, A., Cheng, C., Perazzolo, M. and Tarantini, G. 2019. How to improve therapy in myocarditis: role of cardiovascular magnetic resonance and of endomyocardial biopsy. *Eur Heart J Suppl.* 21(Suppl B): B19–B22.
9. Boon, R. and Dimmeler, S. 2015. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol.* 12(3):135-42.
10. Bartel, D. 2004. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell.* 116(2):281-97.
11. Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361(9):888-98.
12. Campbell, D.J., Koch, M.A. 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 11(2):119-30.
13. Ait-Oufella, H., Salomon, B.L., Potteaux, S. et al. 2006. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* 12(2):178-80.
14. Ertl, G. and Frantz, S. 2005. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 66(1):22–32.
15. Ertl, G. and Frantz, S. 2005. Wound model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(3):H981–H983.

16. Weirather, J., Hofmann, U., Beyersdorf, N. and Ramos, G. 2014. Foxp3⁺ CD4⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res.* 115(1):55-67.
17. Frangogiannis, N. 2019. Protean Functions and Phenotypic Plasticity of Regulatory T Cells in Chronic Ischemic Heart Failure. *Circulation.* 139:222–225.
18. Nahrendorf, M. and Swirski, F. 2015. Regulating repair: Tregs in myocardial infarction. *Circ Res.* 115(1): 7–9.
19. Murphy, K.M. and Reiner, S.L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2(12):933-44.
20. Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R. et al. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6(11):1123-32.
21. Adamson, A. S., Collins, K., Laurence, A. and O’Shea, J. J. 2009. The Current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players (STATs in lymphocyte signaling). *Curr Opin Immunol.* 21(2):161–166.
22. Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L. et al. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 126(6):1121-33.
23. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 24(2):179-89.
24. Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S. and Dong, C. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem.* 282(13):9358-63.
25. Sánchez-Díaz, R., Blanco-Dominguez, R., Lasarte, S., Tsilingiri, K. et al. 2017. Thymus-derived regulatory T cell development is regulated by C-type lectin-mediated BIC/microRNA 155 expression. *Mol Cell Biol.* 37(9). pii: e00341-16
26. Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., Farrar, M.A. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 78(1):280-90.
27. Martín, P. and Sánchez-Madrid, F. 2011. CD69: An Unexpected Regulator of TH17 Cell–Driven Inflammatory Responses. *Science Signaling.* 4(165):pe14.
28. Martín, P., Gómez, M., Lamana, A. et al. 2010. CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 30(20):4877-89.
29. Cruz-Adalia, A., Jiménez-Borreguero, L., Ramírez-Huesca, M., Chico-Calero, I., Barreiro, O. et al. 2010. CD69 Limits the Severity of Cardiomyopathy After Autoimmune Myocarditis. *Circulation.* 122(14):1396–1404.
30. Cortés, J., Sánchez-Díaz, R., Bovolenta, E., Barreiro, O., Lasarte, S. et al. 2014. Maintenance of immune tolerance by Foxp3⁺ regulatory T cells requires CD69 expression. *J Autoimmun.* 55:51–62.
31. Cibrian, D., Saiz, M., De la Fuente, H., Sánchez-Díaz, R., Moreno-Gonzalo, O., Jorge, I. et al. 2016. CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis. *Nat Immunol.* 17:985–996.
32. Tsilingiri, K., de la Fuente, H., Relano, M., Sánchez-Díaz, R. et al. 2019. Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor in Lymphocytes Prevents Atherosclerosis and Predicts Subclinical Disease. *Circulation.* 139(2):243-255.