

El potencial terapéutico de las microvesículas en la calcificación de la válvula aórtica.

Alberto Cook Calvete^a, Paula Reventún, Marta Saura Redondo

Unidad de Fisiopatología, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. mcooky_8@hotmail.com

Resumen

La calcificación valvular es una enfermedad multifacética que representa uno de los principales factores de morbimortalidad cardiovascular en los países desarrollados. Estudios recientes han identificado a las microvesículas como potenciales unidades de comunicación intercelular con la capacidad de iniciar y promover patologías como la calcificación valvular. Sin embargo, las acciones de las microvesículas dependen del fenotipo celular que las libera y del ambiente extracelular, ya que las microvesículas también se liberan en nuestro organismo de forma ubíqua y fisiológica. El contenido proteico o de microRNAs vehiculizados en las microvesículas que pueden inducir diversas respuestas biológicas participando en procesos como la calcificación y diferenciación celular. Por ello, cada vez son más frecuentes las tecnologías ómicas realizadas sobre las microvesículas en numerosas enfermedades que revelan su potencial como dianas y herramientas terapéuticas y/o biomarcadores. En este trabajo se describe el papel fisiológico de las microvesículas como vectores transductores de señales y se destaca su rol fisiopatológico en la calcificación de la válvula aórtica. Nuestro laboratorio trabaja con un modelo murino al que se le ha delecionado de forma inducible la quinasa ligada a integrinas específicamente en el endotelio, y se ha observado que estos animales sufren calcificación en la válvula. El objetivo de este trabajo es describir el papel fisiopatológico de las microvesículas plasmáticas generadas tras la deleción de la quinasa ligada a integrinas en el endotelio y encontrar los mecanismos de acción que expliquen los eventos patológicos encontrados en nuestros modelos animales. Finalmente, el análisis del contenido de las MVs, incluyendo los miRNAs potencialmente vehiculizados en ellas, podría identificar nuevos biomarcadores que podrían ser incluso trasladados a la medicina clínica en un futuro.

Cita: Cook Calvete, Alberto; Reventún, Paula; Saura Redondo, Marta (2020) El potencial terapéutico de las microvesículas en la calcificación de la válvula aórtica. *dianas* 9 (2): e202009fa04. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa04](http://www3.uah.es/dianas/e202009fa04) <http://www3.uah.es/dianas/e202009fa04>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Cook-Calvete A, Reventún P, Saura-Redondo M. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Abreviaturas

ACE: enzima convertidora de angiotensina; ALP: fosfatasa alcalina; Ang: angiotensina; AS: estenosis aórtica; AT1r: receptor de angiotensina II tipo 1; AT2r: receptor de angiotensina II tipo 2; ATP: adenosín trifosfato; BMP2: proteína morfogénica del hueso; Ca²⁺: ión calcio; CAVD: enfermedad de la válvula aórtica calcificada; ECV: enfermedades cardiovasculares; ECM: matriz extracelular; EV: vesículas extracelulares; MSC: células mesenquimales; MVE: microvesículas endoteliales; MVP: microvesículas de plaquetas; MVs: microvesículas; Pi: fosfato inorgánico; PPI: pirofosfato; PS: fosfatidil serina; TNF- α : factor de necrosis tumoral; TGF- β : factor de crecimiento transformante; VCAM: molécula de adhesión celular vascular; VECs: células endoteliales valvulares; VICs: células intersticiales valvulares; VSCM: células del músculo liso de la vasculatura.

Introducción

La calcificación de la válvula aórtica (CAVD) es un desorden cardiovascular altamente prevalente que representa una creciente carga económica y social, especialmente para las poblaciones envejecidas. A pesar de que se sigue estudiando la fisiopatología de la enfermedad, actualmente no existen terapias médicas para prevenir la progresión de la CAVD. El descubrimiento de biomarcadores representa un enfoque potencialmente complementario para estratificar el riesgo y el momento de la intervención en la CAVD, y tiene la ventaja de proporcionar una visión de los factores causales de la enfermedad. Aunque existen numerosos estudios de biomarcadores con potencial de utilidad clínica en la aterosclerosis, con las que la CAVD comparte algunas características, las investigaciones análogas sobre la CAVD son menos sólidas; existiendo sólo algunos estudios disponibles sobre biomarcadores en CAVD prometedores para su traslado a la clínica [1].

Las vesículas extracelulares (EV) son liberadas de forma ubicua por casi todas las células humanas, y se hallan tanto en los tejidos, como en los fluidos biológicos de nuestro organismo. Las EV son estructuras membranosas de tamaño nanométrico variable, cuya carga puede contener un compendio de moléculas

proteicas, RNA y metabolitos. En un principio se pensaba que estas partículas formaban parte de un modo de eliminación de desechos celulares sin embargo, investigaciones recientes atribuyen un rol activo a estas vesículas en la regulación de numerosos procesos celulares. En las últimas décadas se han encontrado evidencias de que las EV liberadas por determinadas células están implicadas en la mineralización de la vasculatura. Estas micropartículas tienen el potencial de formar microcalcificaciones y promover la diferenciación patológica de tejidos cercanos. Aparentemente, la liberación de esas EV calcificantes inician y promueven la progresión de la calcificación vascular [2].

La dualidad de las EV de participar tanto en la homeostasis como en la patología del organismo ha llevado a los científicos a utilizarlas como herramientas terapéuticas, aprovechando sus propiedades beneficiosas (baja toxicidad, fenotipos estables, dianas específicas, vida-media alta...etc); pero también a identificarlas como dianas terapéuticas en numerosas enfermedades [3]. Estudios recientes de nuestro laboratorio han identificado a las EV como posibles dianas terapéuticas en la calcificación de la válvula aórtica.

En esta revisión, se resume el papel de las EV, en concreto de las microvesículas (MVs), como biomarcadores nuevos para esta enfermedad, su contribución a la fisiopatología de la calcificación de la válvula aórtica y su posible utilidad clínica, y se ofrece una vía para orientar las futuras investigaciones en este campo.

EVs: señalización celular

En la literatura científica hay poco consenso sobre cómo clasificar de forma metódica los distintos tipos de EV; sin embargo, en 2014 se realizó un riguroso estudio para unificar criterios denominado “MISEV” (actualizado en 2018), en el que se establecieron unos criterios mínimos que debían compartir cada grupo establecido (cita). Se clasifican las EVs en 3 subgrupos atendiendo a su biogénesis, carga y diámetro: (i) Cuerpos apoptóticos (>1500nm); (ii) microvesículas ó micropartículas (100-1500nm); (iii) exosomas (30-150nm) [4]. En dicho documento también se aborda el método de aislamiento de las EV. El “gold standard” para el aislamiento de las EV es la centrifugación diferencial, aunque en algunos estudios también han aprovechado la presencia de los diferentes biomarcadores específicos que caracterizan las distintas VE para su purificación [4].

En los últimos años se ha estudiado el papel de los exosomas en la iniciación y progresión de la calcificación especialmente en el contexto de la calcificación asociada a la enfermedad renal crónica [5]. En esta revisión hemos decidido analizar el papel de las MVs en la calcificación de la válvula aórtica debido a que algunas evidencias experimentales parecen indicar que las MVs podrían jugar un papel dominante como EV calcificantes, especialmente aquellas producidas en un entorno inflamatorio similar al de la aterosclerosis [2].

Las MVs, conocidas como micropartículas y que en parte también engloban a las vesículas de matriz, fueron descritas por primera vez en 1967 y en un inicio se las describió como “polvo” que desprendían las plaquetas carentes de función. Actualmente sabemos que las MVs son pequeñas vesículas lipídicas de tamaño variable (100-1500nm de diámetro) provenientes de la membrana plasmática de las células eucariotas. En la formación y liberación de MVs se ve involucrado el tráfico de la carga molecular hacia la membrana plasmática que determinará el contenido microvesicular, la redistribución lipídica de la membrana y la maquinaria contráctil en la superficie que permite finalmente su liberación a la matriz extracelular (ECM) [5].

Como podemos apreciar en la *figura 1A* las MVs se liberan a través de mecanismos contráctiles directamente de la membrana plasmática, mientras que los exosomas se forman a partir de cuerpos multivesiculares dentro de una vesícula de secreción. Esta diferencia en su biogénesis nos hace considerar que las vías de señalización que inducen la formación y liberación de cada tipo de VE son distintas. Además, al liberarse las MVs se llevan parte de la membrana plasmática de la célula de origen y por tanto pueden contener moléculas propias que caracterizan dicha célula como por ejemplo marcadores celulares, proteínas y enzimas ancladas a la membrana o expuestas hacia la hemimembrana externa [5]. Este hecho no sólo nos permite caracterizar subpoblaciones para rastrear la célula de la que se originó la MV, sino también identificar la célula diana a la que pueden ir dirigidas las MVs de forma específica y poder entender mejor su finalidad biológica.

Esta interacción MV– célula puede darse de numerosas formas como se muestra en la *Figura 1B*. Las MVs pueden contener integrinas, proteínas de la ECM, lectinas, proteoglicanos o glicolípidos que faciliten la interacción con las células que expresen receptores específicos sobre su superficie. En las células diana las MVs pueden interactuar a nivel de membrana y/o ser internalizadas por múltiples vías: fagocitosis, micropinocitosis, endocitosis o simplemente por fusión de membrana [5].

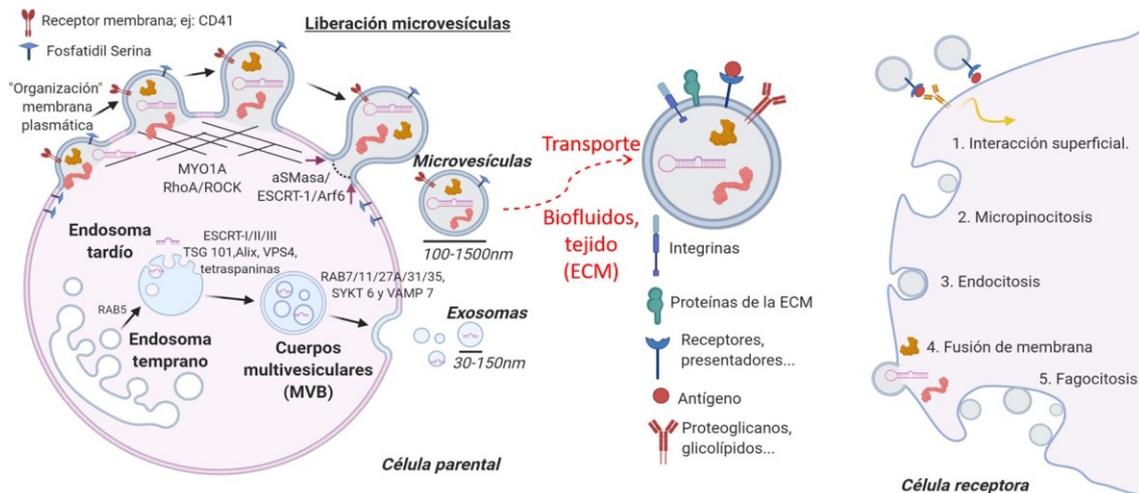
Biogénesis y Recepción de MVs

Figura 1.- **A:** EVs se pueden generar de orígenes intracelulares diferentes. Las MVs se liberan mediante una maquinaria contráctil a partir de la membrana plasmática celular llevándose consigo las moléculas de membrana que posee la célula parental; mientras que los precursores de los exosomas son los cuerpos multivesiculares (MVB) originados a partir del sistema endosomal celular. **B:** Las integrinas, proteínas de la ECM, proteoglicanos, glicolípidos pueden facilitar la interacción de las MVs con la célula diana. La célula receptora puede internalizar las MVs a través de una interacción directa superficial e inducir la señalización interna, mediante micropinocitosis, endocitosis, fusión directa de la membrana o mediante fagocitosis. (Elaboración propia).

Las MVs pueden contener un compendio de proteínas, RNA (mRNA y miRNA), metabolitos y lípidos, específico del tipo celular, estímulo, estado de activación o condición fisiopatológica. Se sabe que las células empaquetan de forma selectiva miRNAs dentro de las VE; sin embargo, los mecanismos por los cuales se procesa y se encapsula la carga proteica está aún por descubrir [2]. Los miRNA tienen el potencial de modular la expresión genómica a nivel post-transcripcional, por lo que las investigaciones actuales están centrándose en estudiar los tipos de miRNA vehiculizados por las MVs y los cambios fenotípicos que producen en las células diana. Por lo tanto, es posible encontrar una amplia gama de cargas moleculares en las MVs provenientes incluso de un mismo tipo celular, por lo que aún queda por explorar cual es la finalidad biológica de este fenómeno.

Gracias a su contenido o las moléculas bioactivas en la membrana de las MVs estas pueden participar en procesos como: angiogénesis, comunicación intercelular, supervivencia celular, activación de la inflamación y la respuesta inmune, coagulación y eliminación de residuos celulares [6]. Esta señalización mediada por MVs puede recorrer largas distancias ya que se han encontrado MVs en prácticamente todo tipo de biofluidos: saliva, leche materna, lágrimas, orina e incluso la sangre; pudiendo transmitir señales a nivel autocrino, paracrino e incluso endocrino [6].

Como hemos mencionado, la señalización a través de MVs no sólo ocurre de forma fisiológica, sino que parece estar incrementada y alterada durante un estado patológico. Se han descrito dos procesos celulares, que inducen la formación de MVs: la activación celular y la apoptosis [7]. Ambos fenómenos inducen la formación de MVs similares en tamaño, contenido proteico y lipídico y efectos fisiopatológicos. Sin embargo, podemos encontrar diferencias en los mecanismos que propician su formación los cuales se muestran en la *figura 2*.

Estas MVs formadas bajo un contexto patológico señalizan dicha alteración celular a otros tejidos. Por ejemplo, se ha visto que algunas de estas MVs liberadas al torrente sanguíneo son procoagulantes y promueven la formación de trombos por medio de la externalización del fosfolípido aniónico de fosfatidilserina (PS). Este fosfolípido se usa como marcador de las MVs ya que se externaliza y se encuentra en la hemimembrana externa de su membrana. Funcionalmente, la PS provee sitios de unión para el ensamblaje de enzimas coagulantes, induciendo así la actividad del factor tisular y promoviendo la generación de trombina y formación de trombos [8]. No obstante, la superficie de algunas MVs también puede contener el factor tisular, el cual es uno de los iniciadores en la cascada de coagulación. Por ejemplo, se ha estimado que estas MVs circulantes tienen entre 50 y 100 veces mayor actividad procoagulante que las plaquetas activadas. Además, este fenómeno patológico cuenta con una retroalimentación positiva ya que las MVs formadas por la activación celular también actúan como desencadenantes de mayor activación celular [8].

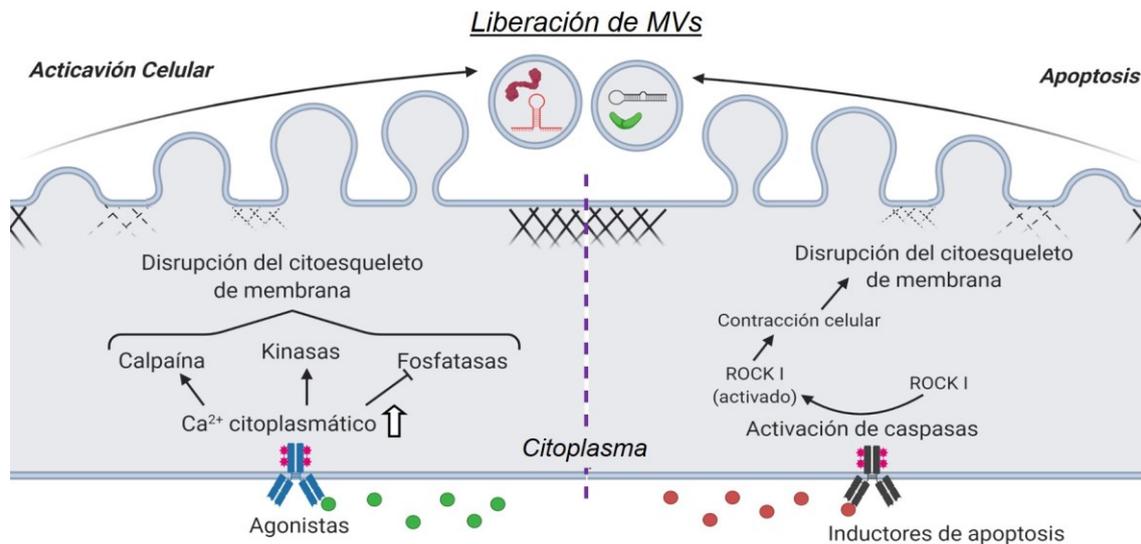


Figura 2.- Las MVs se originan de forma fisiológica, sin embargo, se ha observado que la activación celular y la apoptosis inducen la liberación de MVs a través de las siguientes rutas de señalización. (Elaboración propia).

Las últimas investigaciones muestran a las MVs como factores determinantes señalizando tanto en el inicio como el transcurso de numerosas enfermedades como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (ECV). Tanto es así que se han convertido en potenciales biomarcadores de ambas patologías abriendo la posibilidad además de ser utilizadas como dianas terapéuticas.

MVs: biomarcadores, dianas y herramientas terapéuticas en ECV

Biomarcadores

Actualmente, el desarrollo de métodos diagnósticos y pronósticos usando las EV como biomarcadores está aún por estandarizarse. Sin embargo, se ha visto que los niveles de EV se modulan de forma muy reproducible en estadios concretos de algunas enfermedades. Hay evidencias clínicas que han correlacionado los niveles altos de MVs con el riesgo de padecer lesiones coronarias [9]. En ensayos *in vitro* con células endoteliales aisladas de pacientes con infarto de miocardio han encontrado un incremento en la expresión de proteínas de adhesión vascular 1 (VCAM-1) tanto en las MVs como en las células que las liberaban [10]. Aunque en esta revisión nos hemos centrado en el papel que las MVs pueden tener en el desarrollo de la enfermedad, hemos de considerar que hay estudios que sugieren que no todas las MVs son necesariamente dañinas, ya que algunas MVs circulantes en plasma podrían tener propiedades anticoagulantes transportando trombosmodulina y el receptor endotelial de la proteína C [11].

Dianas y herramientas terapéuticas

Las EV tienen el potencial de ser unas buenas herramientas terapéuticas debido a que presentan cualidades beneficiosas para usarlas en diferentes campos de la biomedicina. Se ha analizado que las EV presentan una baja toxicidad, transportan fármacos y no presentan inmunogenicidad. Por ello, hasta la fecha, las EV se han usado en: terapias anticancerígenas (reduciendo los efectos tóxicos de la quimioterapia); vacunación (presentando un antígeno); terapias regenerativas y transporte de fármacos [9]. Por ejemplo, se están llevando a cabo numerosas investigaciones con EV procedentes de células mesenquimales (MSC) para la aplicación de terapias regenerativas. Se ha demostrado que estas EV-MSC son cardioprotectoras, capaces de reducir el tamaño del infarto en modelos murinos aumentando los niveles de NADH y ATP y reduciendo el estrés oxidativo. Además, se ha observado que la exposición de las EV-MSC mejora la función cardíaca y suprime la respuesta inflamatoria [12].

Dentro de las EV, numerosos estudios clínicos han indicado que las MVs podrían servir como nuevas dianas terapéuticas en algunos tratamientos para las enfermedades cardiovasculares como la enfermedad de la arteria coronaria [13]. Por ejemplo, se ha observado que en pacientes con infarto agudo de miocardio a los que se les trató con una angioplastia coronaria, se redujeron significativamente los niveles de MVs procoagulantes [14]. Un estudio empleó un tratamiento con ácidos grasos (omega 3) en pacientes con infarto de miocardio y observó un descenso en los niveles de MVs provenientes de plaquetas que podría explicar los mecanismos antiinflamatorios y antitrombóticos del tratamiento clínico [15]. Otros estudios han observado que tras un tratamiento con fármacos cardioprotectores (bloqueantes del receptor de angiotensina tipo 1, bloqueantes de calcio o aspirina) [9] reducían también los niveles de MVs en plasma. Sin embargo, aunque en numerosos estudios se ha identificado a las MVs como dianas

terapéuticas, se necesita profundizar más para averiguar si el descenso de MVs que se observa tras el tratamiento es la causa o la consecuencia de la mejora de los pacientes tratados.

Como conclusión, los avances recientes en el campo de EV han conducido a un renovado interés por encontrar nuevos usos a las MVs como biomarcadores de condiciones patológicas como inflamación, disfunción endotelial, trombosis o angiogénesis. Además, las MVs también pueden usarse como poderosas herramientas diagnósticas, pronósticas y monitorización de la enfermedad. Aunque los mecanismos de acción por los cuales las MVs contribuyen en numerosos procesos fisiopatológicos está aún por descubrir, cada vez más investigaciones usan estrategias terapéuticas con MVs abriendo un amplio abanico terapéutico de posibilidades en la biomedicina actual.

MVs: fisiopatología de la CAVD

La CAVD se caracteriza por el engrosamiento y la calcificación de la válvula aórtica en ausencia de enfermedad cardíaca reumática. La estenosis aórtica (AS) representa la manifestación clínica de la CAVD, que se produce cuando la remodelación del tejido de la válvula es lo suficientemente grave como para producir cambios hemodinámicos en la válvula aórtica impidiendo la apertura y cierre adecuados y el correcto flujo sanguíneo hacia los tejidos. La esclerosis aórtica es un término utilizado para referirse a la manifestación subclínica de la CAVD: una remodelación patológica asintomática de la válvula aórtica sin consecuencia hemodinámica. La esclerosis aórtica puede identificarse mediante un engrosamiento cualitativo de la válvula aórtica acompañado de la calcificación del tejido de la válvula aórtica [16]. No está claro qué pacientes con esclerosis aórtica progresarán hacia una AS y por tanto tendrán que ser sometidos a una cirugía de reemplazo de la válvula que, actualmente, es el único tratamiento posible.

Antes se pensaba que la válvula sufría un proceso degenerativo con la edad, sin embargo, recientemente se ha observado que la progresión de la CAVD constituye un proceso celular activo que ocurre dentro de las valvas de la válvula aórtica. En términos generales, la fisiopatología de las CAVD sigue un mecanismo similar al de la aterosclerosis, culminando en la fibrosis, la calcificación y, finalmente, la alteración hemodinámica en la válvula aórtica. A pesar de compartir rutas biológicas y de la presencia de muchos factores de riesgo clínicos y bioquímicos comunes, la CAVD es una entidad biológica distinta de la aterosclerosis [17].

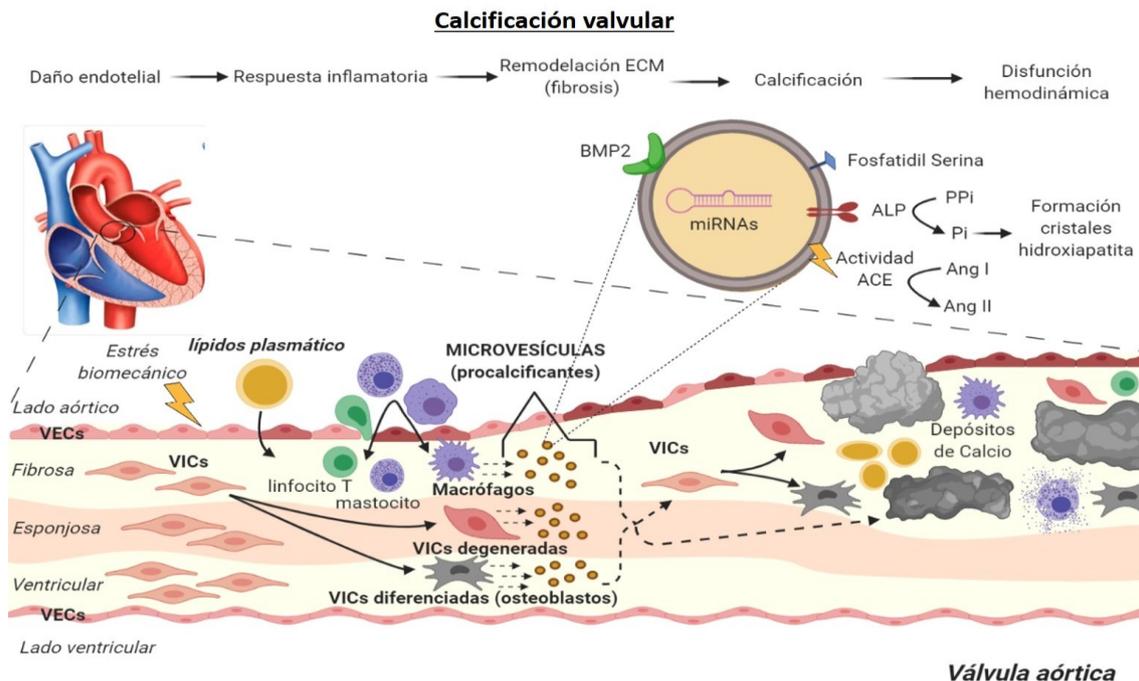


Figura 3.- Las valvas de la válvula aórtica están compuestas por una matriz extracelular rellena con células valvulares intersticiales (VICs), distribuidas en tres capas: la capa fibrosa colágena dispuesta hacia el lado aórtico de la válvula, la capa intermedia o esponjosa rica en glicosaminoglicano y la capa ventricular rica en elastina. Tanto el lado ventricular como el aórtico, se encuentra cubierto por células endoteliales valvulares (VECs). La capa situada hacia el lado aórtico es la más susceptible de iniciar la calcificación. El daño endotelial y la inflamación se caracterizan por la infiltración de macrófagos y células inmunes, que junto a las células VICs diferenciadas y degeneradas o quiescentes son capaces de liberar MVs con un alto potencial calcificante. Estas MVs poseen determinados factores y miRNAs en su membrana que las predisponen a formar cristales de hidroxiapatita e incluso, inducir la diferenciación celular en las VICs. (Elaboración propia).

Se ha visto que el inicio fisiopatológico de la CAVD es el daño endotelial, lo que lleva a una respuesta inflamatoria, seguida de la síntesis de componentes de la ECM fibrótica por las VICs que aumenta el engrosamiento de la valva, la rigidez y facilita el depósito de minerales responsables de la calcificación. Así en los primeros estadios de la enfermedad se propicia el daño endotelial de las VECs y un estado inflamatorio crónico caracterizado por la infiltración de macrófagos, linfocitos T y mastocitos. En estadios más avanzados, se produce la diferenciación de las VICs hacia un fenotipo osteogénico que desencadena la calcificación de la válvula. Sin embargo, uno de los grandes misterios de la biología valvular es cómo se produce la transducción de señales entre las VECs y las VICs [18]. Hay estudios que sugieren que las MVs participan en este proceso de transdiferenciación entre las VECs y VICs ya que se ha visto que de forma fisiológica las VICs pueden inhibir la migración y diferenciación osteogénica de las VECs [18].

Durante años, en la fisiopatología de la CAVD se le ha atribuido un papel predominante a la acción de los macrófagos en inducir la diferenciación celular anómala mediante la acción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF- α), factor de crecimiento similar a la insulina 1 y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) [17]. No obstante, investigaciones recientes han observado que tanto los macrófagos como las células diferenciadas y en proceso de degeneración son capaces de liberar unas MVs (conocidas como vesículas de matriz) con actividad procalcificante a la ECM [19] (*figura 3*). Además, se ha observado que la biogénesis de las EV es distinta según el tipo celular que las produzca. Por ejemplo, los macrófagos tienden a liberar MVs procalcificantes mientras que la mayoría de las EV provenientes de las células del músculo liso vascular (VSCM) son de tipo exosomal [2]. Estos resultados se han conseguido reproducir *in vitro* imitando las condiciones fisiopatológicas altas de calcio (Ca) y fosfato inorgánico (Pi) presentes en la CAVD para inducir la liberación de MVs procalcificantes [2]. Funcionalmente, estas MVs procalcificantes son capaces de inhibir la acción de fetuina-A y la esfingolina fosfodiesterasa 3 (inhibidores de la calcificación) y pueden acumular y agregar cristales de hidroxiapatita formando microcalcificaciones [2]. Además, estas MVs pueden contener una gran variedad de integrinas y metaloproteinasas (MMP-2,-3,-9,-13) que asisten en el remodelado de la ECM para exponer sitios cargados en las fibras de colágeno que induce la iniciación de la nucleación mineral [2,9]. Incluso se ha llegado a detectar la presencia de BMP2 (factor principal en la diferenciación a osteoblastos) en el interior de estas vesículas calcificantes. Por lo tanto, se las ha atribuido un papel fisiopatológico en la CAVD promoviendo de forma activa la fibrosis y calcificación del tejido. Los principales mecanismos fisiopatológicos que se producen en la remodelación de la ECM durante la CAVD pueden ser causados por las enzimas y factores que se encuentran en la membrana de estas MV procalcificantes: la fosfatasa alcalina (ALP), fosfolípidos aniónicos y anexinas [19], miRNAs, y la actividad de enzima convertidora de angiotensina (ACE) [17].

Fosfatasa alcalina: Por lo que respecta a la bioquímica de la calcificación, el pirofosfato (PPi) derivado del trifosfato de adenosina (ATP) es el principal inhibidor endógeno de la formación y crecimiento de los cristales de calcio y fosfato. Sin embargo, por acción de la fosfatasa alcalina, el PPi se transforma en Pi promoviendo la formación de cristales de hidroxiapatita. Además, este proceso fisiopatológico se ve retroalimentado ya que la exposición al mineral de hidroxiapatita induce la diferenciación osteoblástica de las VICs, y éstas a su vez secretan más MVs procalcificantes [20].

Fosfolípidos aniónicos y anexina: A diferencia de la membrana plasmática celular, las EV se caracterizan fenotípicamente por la externalización de fosfatidil serina (PS) y la formación de complejos PS-anexina. Las anexinas actúan como canales de voltaje de Ca²⁺. En la calcificación de la válvula aórtica, se ha visto que la anexina A6 colocaliza con las EV y que los niveles de anexina A2 están aumentados en las EV promoviendo la activación de la ALP potenciando la calcificación fisiopatológica [21].

miRNA: Se ha visto que la mayoría de los miRNA circulantes en plasma están asociados a EV, ya que las vesículas protegen al RNA de la degradación por ribonucleasas y proteasas extracelulares [22]. Se le concede a los miRNAs un papel importante en la patología ya que son capaces de alterar a nivel post-traduccionales numerosas rutas celulares. En la CAVD, se ha encontrado un incremento de miRNAs en estas EV que inducen la expresión de genes osteogénicos: miRNA-27a, -196a, y -206. Estos miRNA son capaces de modular la expresión de proteínas como Smad1, Runx2 y la fosfatasa alcalina, alterando rutas de señalización de las MAPK, Hippo, Wnt, mTOR y el metabolismo del calcio que desemboca en la inducción de la calcificación vascular [2].

Enzima convertidora de angiotensina (ACE): se sabe que la actividad de ACE se encuentra incrementada en la CAVD, sin embargo, hace unos años se descubrió que las MVs originadas en este contexto patológico pueden tener la actividad ACE en la superficie de su membrana [23]. Además, estas MVs son capaces de inducir en las células diana la sobreexpresión de ACE y de receptores de angiotensina II tipo I (AT1). Por lo tanto, las MVs facilitan la conversión de Angiotensina (Ang) I a II, la cual media los efectos profibróticos vía AT1r. Aunque la Ang II también es capaz de mediar efectos antifibróticos y antiinflamatorios por la vía del receptor de Ang II tipo 2 (AT2), la diferencia en la expresión de estos receptores a favor de AT1 ha demostrado que en la CAVD dominan sus efectos profibróticos [17]. Además, el hecho de que el sistema renina-angiotensina se vea incrementado tiene una finalidad biológica

en esta patología, ya que la calcificación de la válvula impide su correcto funcionamiento y el sistema circulatorio necesita aumentar la presión sanguínea del organismo a través de este sistema para mantener constante el flujo sanguíneo.

MVs: ILK Y CAVD

Entre los principales problemas del estudio de la CAVD es la ausencia de modelos animales que reproduzcan los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en el proceso de la patología. El grupo de investigación de la Dra M. Saura ha desarrollado un modelo de ratón con delección endotelial inducible de la quinasa ligada a integrinas (ILK). ILK es una serina-treonina quinasa que juega un papel importante en la transducción de señales tras la interacción entre las células y la ECM [24]. Las respuestas generadas mediante la activación de ILK son diversas y complejas, ya que es una proteína que se integra en una gran plataforma proteica de señalización, siendo una de sus principales funciones la de regular la respuesta del corazón a estímulos de estrés biomecánico [25]. Además, se le atribuyen otras funciones en el sistema cardiovascular: la remodelación del citoesqueleto, la angiogénesis, el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de cardiomiocitos y células endoteliales entre otras [26]. ILK posee un papel clave en el endotelio regulando el tono vasomotor promoviendo la producción adecuada de óxido nítrico (NO) y previniendo la aterosclerosis. De hecho, sus niveles disminuyen durante la progresión de esta enfermedad debido a la inflamación [27].

Al eliminar de forma específica la expresión de ILK en el endotelio, se produce calcificación valvular, así como disfunción de la válvula e insuficiencia cardíaca reproduciendo las etapas de la enfermedad humana (figura 4). Basado en estos estudios preliminares, nos planteamos si la expresión de ILK juega un papel protector frente al desarrollo de calcificación valvular. Apoyando esta hipótesis, un estudio piloto en muestras de estenosis aórtica humana observó una correlación negativa entre el grado de calcificación y la expresión de ILK (resultado no mostrado).

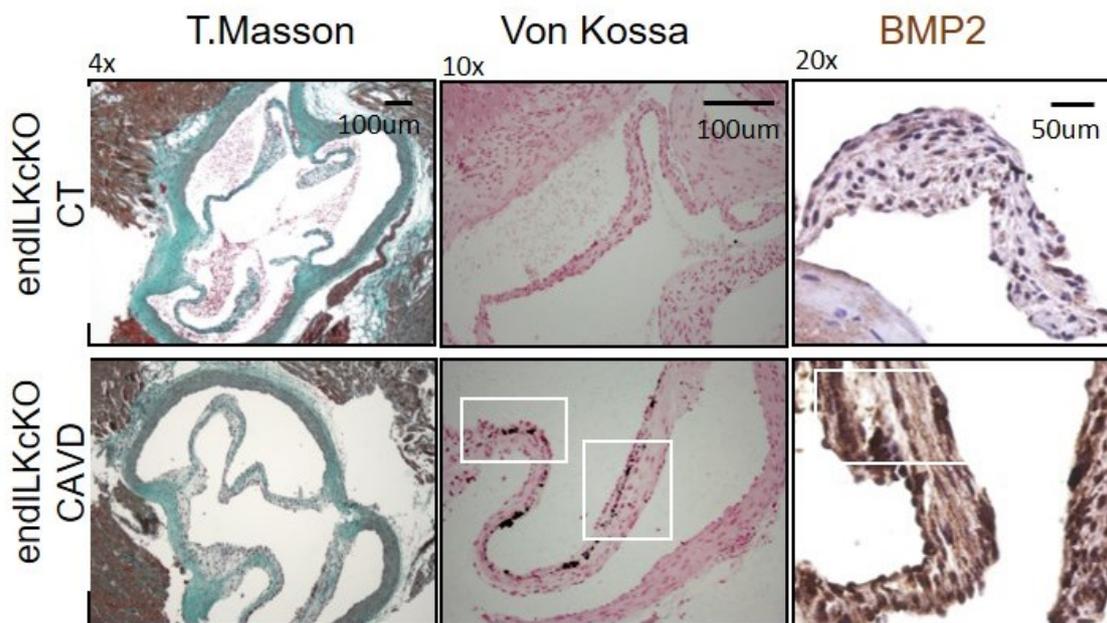


Figura 4.- Tinciones de válvula aórtica. Imágenes representativas en cortes seriados de válvula aórtica de ratones CT y con delección endotelial de ILK. **A:** Tinción Masson para observar la fibrosis valvular (verde). **B:** Tinción de Von Kossa para detectar la calcificación (negro). **C:** Inmunohistoquímica de BMP2.

En nuestro estudio nos centramos en caracterizar el papel que desempeñan las MVs en el proceso patológico de esta enfermedad y cómo este tipo de comunicación intercelular puede jugar un rol imprescindible en la transmisión de señales entre las VECs y VICs.

En este sentido un primer abordaje no permitió determinar la existencia de diferencias cuantitativas en el número de MV y tipo de MV en el plasma de ratones con y sin la delección de ILK en el endotelio.

Para detectar las MVs se realizó un abordaje de citometría de flujo usando para ello un patrón de tamaño de bolas fluorescentes (0,2µm / 0,5µm / 1µm / 2µm) (Flow cytometry Sub-Micron Size, Invitrogen). Este patrón nos permitió definir la población de interés marcando una región comprendida entre los 0,2 y 1µm discriminando por encima de 1µm a los cuerpos apoptóticos que comparten el mismo fenotipo. Lo que nos permite caracterizar las MVs es la presencia de PS mediante su unión a Anexina V dependiente de calcio [28]. Para poder normalizar los resultados entre experimentos, se añadieron a las muestras unas

“bolas fluorescentes de conteo” (Flow-Count Fluorospheres, Invitrogen) para asegurarnos de pasar la misma cantidad de muestra en cada medida analítica.

Además, se analizaron de forma cualitativa las subpoblaciones de MV halladas en plasma, empleándose marcadores específicos de los distintos tipos celulares. Así, las MVs endoteliales se identificaron como CD31⁺, CD41⁻, mientras que las MVs provenientes de plaquetas se caracterizaron como CD31⁺, CD41⁺.

Los plasmas sanguíneos de cada ratón fueron analizados en ensayos independientes según la plantilla generada en la puesta a punto del protocolo. Al analizar el resultado observamos que la cantidad de MVs presente en el plasma de los ratones con fenotipo calcificante era mayor que en los ratones CT (*Figura 5*). Debido a que las MVs circulantes están compuestas por diferentes subespecies de MVs liberadas por las células endoteliales y sanguíneas, utilizamos citometría de flujo para explorar los orígenes celulares de nuestras MV. Como se observa en la *Figura 5*, los ratones que padecían la patología presentaron mayor expresión en MVs derivadas de células endoteliales CD31⁺/CD41⁻ (MVe), así como MV derivadas de plaquetas (MVp) CD31⁺/CD41⁺. Los resultados obtenidos se correlacionan con las investigaciones en las que este aumento de MV endoteliales y plaquetarias en plasma se describe ante la presencia de disfunción endotelial y remodelación vascular [29].

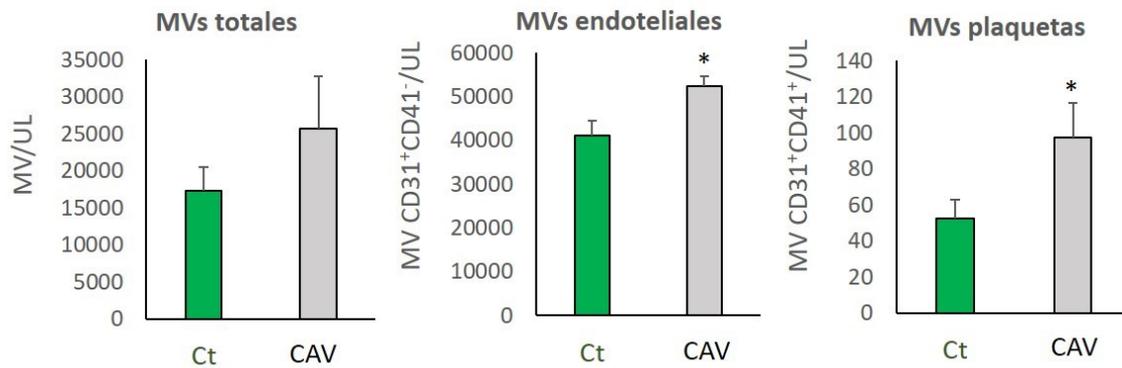


Figura 5.- Cuantificación de MVs plasmáticas mediante marcaje por fluorocromos [isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE)] en citometría de flujo (n=3). Se gateó previamente la región de estudio para las MVs (Anexina V⁺ y tamaño/complejidad comprendido entre 0.1 y 1.5µm). **A:** MVs totales /µl [FITC-Anexina V⁺ y complejidad (SSC)] en ratones controles respecto a ratones con calcificación valvular. **B:** MVs procedentes de células endoteliales (FITC-CD31⁺ y PE-CD41⁻) de ratones controles frente a ratones con calcificación valvular. **C:** MVs procedentes de plaquetas (FITC-CD31⁺ y PE-CD41⁺) de ratones controles frente a ratones con calcificación valvular. *p< 0,05 vs Ct.

Aunque no se ha podido profundizar en estos resultados, el hecho de que el número de MVs circulantes aumente al deletar ILK indica que estos ratones podrían estar sufriendo daño endotelial, incluido el endotelio que recubre las válvulas, pudiendo potencialmente inducir los fenómenos que desencadenan el proceso de calcificación. Además, el incremento del número de MVs procedentes de plaquetas podría indicar un entorno procoagulante. Esto es importante puesto que se ha reportado que debido a la alteración del flujo y la exposición al *shear stress*, tras una activación inicial, las plaquetas se degranulan parcialmente, desprenden MVs y pueden verse implicadas en la patogénesis de la disfunción microvascular y los eventos trombóticos en los pacientes con disfunción de la válvula aórtica [30]. En este sentido se quiso indagar en el contenido de las MVs plasmáticas para determinar el contenido en miRNAs de las MVs. Los resultados podrán servir para clasificar las MVs por su contenido en miRNAs así como identificar miRNAs nuevos que puedan estar jugando un papel clave en la remodelación valvular inducido por el déficit de ILK.

Asimismo, se podrá explorar el papel procalcificante de las MVs generadas tras la delección de ILK y los mecanismos de acción por los cuales se pueda estar estableciendo una transmisión intercelular de señales que expliquen el fenotipo patológico encontrado en nuestro modelo.

Conclusiones

La literatura científica presenta a las EV como un nuevo mecanismo de señalización intercelular responsable del inicio y progresión de numerosas patologías. En el desarrollo de la CAVD, las MVs podrían tener un papel protagonista en producir la remodelación valvular y desencadenar los eventos fisiopatológicos que caracterizan la enfermedad. La versatilidad de las MVs permite identificarlas, no sólo como biomarcadores diagnósticos de diferentes enfermedades, sino que también están resultando muy prometedoras como herramientas y dianas terapéuticas en la biomedicina moderna. En nuestro estudio, las MVs podrían usarse como biomarcadores plasmáticos, pudiendo representar un enfoque complementario para estratificar el riesgo y el momento de la intervención en la CAVD. Además, la

variedad de mecanismos de acción desempeñados por las MVs tiene la ventaja de proporcionar una visión más completa de los factores causales de la enfermedad.

Nuestro trabajo experimental en un modelo animal y muestras humanas ha determinado que la expresión endotelial de ILK es factor protector importante en el proceso de calcificación de la válvula aórtica, estudiando la producción de MVs cuando la expresión de ILK disminuye. Se ha comprobado que la delección endotelial de ILK induce una mayor liberación de MVs circulantes totales, tanto endoteliales como plaquetarias, que podrían estar participando en este proceso fisiopatológico a distintos niveles. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder establecer una relación causa-efecto entre la producción de MVs en los animales y la calcificación. No obstante, los resultados que se obtengan tras el estudio de las MVs podrán permitirnos identificar nuevos biomarcadores y mecanismos de acción celular basados en miRNAs y genes diana específicos que podría incluso ser trasladado al paciente en un futuro.

Referencias

- [1] P. Vyas, J. D. Hutcherson, and E. Aikawa. 2018. “Calcific Aortic Valve Disease: Pathobiology, Basic Mechanisms, and Clinical Strategies,”. *Advances in Heart Valve Biomechanics* Springer International Publishing. pp. 153–179.
- [2] M. C. Blaser and E. Aikawa. 2018. “Roles and Regulation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Mineral Metabolism,”. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 5. Frontiers Media S.A.. vol. 21, no. 4, pp. 414–422.
- [3] A. T. Reiner et al. 2017. “Concise review: Developing best-practice models for the therapeutic use of extracellular vesicles,” *Stem Cells Translational Medicine*. vol. 6, no. 8. pp. 1730–1739.
- [4] C. Théry et al. 2018. “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines,”. *J. Extracell. Vesicles*. vol. 7, no. 1.
- [5] D. W. Greening and R. J. Simpson. 2018. “Understanding extracellular vesicle diversity—current status,”. *Expert Review of Proteomics*. vol. 15, no. 11. pp. 887–910.
- [6] Y. Yuana, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2013. “Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions,”. *Blood Rev.* vol. 27, no. 1, pp. 31–39.
- [7] M. J. VanWijk, E. VanBavel, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2003. “Microparticles in cardiovascular diseases,”. *Cardiovascular Research*. vol. 59, no. 2. pp. 277–287.
- [8] G. Chiva-Blanch, A. Sala-Vila, J. Crespo, E. Ros, R. Estruch, and L. Badimon. 2020. “The Mediterranean diet decreases prothrombotic microvesicle release in asymptomatic individuals at high cardiovascular risk,”. *Clin. Nutr.* vol. 88, no. 4, pp. 567–578.
- [9] Y. Chen, G. Li, and M. L. Liu. 2018. “Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases,”. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. vol. 16, no. 1. Beijing Genomics Institute, pp. 50–62.
- [10] C. E. Radecke, A. E. Warrick, G. D. Singh, J. H. Rogers, S. I. Simon, and E. J. Armstrong. 2015. “Coronary artery endothelial cells and microparticles increase expression of VCAM-1 in myocardial infarction,”. *Thromb. Haemost.* vol. 113, no. 3, pp. 605–616.
- [11] A. M. Curtis et al. 2013. “Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function,”. *Vascular Medicine (United Kingdom)*. vol. 18, no. 4. pp. 204–214.
- [12] S. Keshtkar, N. Azarpira, and M. H. Ghahremani. 2018. “Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine,”. *Stem Cell Research and Therapy*. vol. 9, no. 1.
- [13] A. Small et al. 2017. “Biomarkers of calcific aortic valve disease,”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. vol. 37, no. 4. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 623–632,
- [14] D. M-p, C. J-p, and F. J-m. 2015. “Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists,” vol. 91, no. 2, pp. 416–422.
- [15] S. Del Turco et al. 2008. “Effect of the administration of n-3 polyunsaturated fatty acids on circulating levels of microparticles in patients with a previous myocardial infarction,”. *Haematologica*. vol. 93, no. 6, pp. 892–899.
- [16] S. Coffey, B. Cox, and M. J. A. Williams. 2014. “The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: A systematic review and meta-analysis,”. *J. Am. Coll. Cardiol.* vol. 63, no. 25 PART A, pp. 2852–2861.

- [17] T. A. Pawade, D. E. Newby, and M. R. Dweck. 2015. "THE PRESENT AND FUTURE STATE-OF-THE-ART REVIEW Calcification in Aortic Stenosis The Skeleton Key,". vol. 39, no. 4, pp. 234–245.
- [18] J. Hjortnaes et al. 2015. "Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells,". *Atherosclerosis*. vol. 242, no. 1, pp. 251–260.
- [19] L. L. Demer and Y. Tintut. 2014. "Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification,". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 715–723,.
- [20] A. P. Sage, J. Lu, Y. Tintut, and L. L. Demer. 2011. "Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro,". *Kidney Int.* vol. 79, no. 4, pp. 414–422.
- [21] R. J. Majeska and R. E. Wuthier. 1975. "STUDIES ON MATRIX VESICLES ISOLATED FROM CHICK EPIPHYSEAL CARTILAGE ASSOCIATION OF PYROPHOSPHATASE AND ATPase ACTIVITIES WITH ALKALINE PHOSPHATASE,". vol. 92, no. 8, pp. 300–321.
- [22] L. Cheng, R. A. Sharples, B. J. Scicluna, and A. F. Hill. 2014. "Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood,". *J. Extracell. Vesicles*. vol. 3, no. 1.
- [23] M. Abbas et al. 2017. "Endothelial Microparticles from Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways,". *Circulation*. vol. 135, no. 3, pp. 280–296.
- [24] S.-P. Lee, S.-W. Youn, and H.-S. Kim. 2007. "Integrin-Linked Kinase: It's Role in the Vascular System,". vol.45, no. 3, pp. 404–422.
- [25] G. Bendig et al. 2006. "Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart,". *Genes Dev.* vol. 20, no. 17, pp. 2361–2372.
- [26] A. Brodehl et al. 2019. "Mutations in ILK, encoding integrin-linked kinase, are associated with arrhythmogenic cardiomyopathy,". *Transl. Res.* vol. 208, pp. 15–29.
- [27] P. Reventun et al. 2017. "INOS-Derived Nitric Oxide Induces Integrin-Linked Kinase Endocytic Lysosome-Mediated Degradation in the Vascular Endothelium,". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* vol. 37, no. 7, pp. 1272–1281.
- [28] S. Cointe et al. 2017. "Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop,". *J. Thromb. Haemost.* vol. 15, no. 1, pp. 187–193.
- [29] S. Paone, A. A. Baxter, M. D. Hulett, and I. K. H. Poon. 2019. "Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis,". *Cellular and Molecular Life Sciences*. vol. 76, no. 6. Birkhauser Verlag AG, pp. 1093–1106.
- [30] J. L. Francis and W. Disney. 2000. "Platelet dysfunction detected at high shear in patients with heart valve disease,". vol. 9, no. 6, pp. 34–42.