



Fundació
La Marató de TV3

21^o SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS Y FIBROBLASTOS RESIDENTES EN EL REMODELADO MIOCÁRDICO Y LA REGENERACIÓN TISULAR TRAS EL INFARTO DE MIOCARDIO: CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA GAS6-TAM

José Tomás Ortiz Pérez

Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

Pablo García de Frutos

Institut Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Andrés Hidalgo Alonso

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - Madrid

1. Resumen

A pesar de la terapia de reperfusión y farmacológica, la incidencia del remodelado ventricular izquierdo (VI) en el infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) es alta. Son necesarias nuevas dianas terapéuticas para prevenir la insuficiencia cardíaca y la muerte. El macrófago residente y fibroblasto tienen un papel clave en la inflamación y la reparación tisular interactuando mediante señales paracrinas. El sistema Gas6-TAM de ligandos y receptores está implicado en la reparación de los tejidos, regula la eliminación de las células dañadas y modula la función del fibroblasto, pero su papel en el proceso de curación tras un infarto de miocardio es desconocido. Nosotros hemos estudiado la modulación de los macrófagos residentes y fibroblastos por el sistema Gas6-TAM en el remodelado VI en el IAMCEST humano y experimental.

El papel de los macrófagos residentes y la interacción con los fibroblastos se caracterizaron experimentalmente en modelos de cardiomiopatía inducida por isoproterenol y de infarto de miocardio en ratones deficientes en macrófagos cardíacos y en controles. El papel del sistema Gas6-TAM en la diferenciación de miofibroblastos fue evaluado mediante la combinación de mutaciones en los genes *Axl*, *Mertk* y *Gas6* con ratones deficientes en macrófagos residentes, estudiados con técnicas de imagen avanzada y de histología para estudiar el remodelado VI. Paralelamente, en un estudio clínico, medimos los niveles de *Axl*, *Mertk* y *Gas6* en suero en una serie de enfermos ingresados con un primer IAMCEST. La relación con el remodelado VI y la fibrosis intersticial en el miocardio no infartado fue evaluada por resonancia magnética cardíaca (RMC), realizada en el ingreso y a los 6 meses.

Nuestra hipótesis era que el sistema Gas6-TAM estaría activado y modularía la función de los macrófagos residentes y fibroblastos en la reparación de tejidos después de un infarto de miocardio, y así podría convertirse en una diana terapéutica para prevenir la remodelación patológica VI en el IAMCEST.

1.1. Objetivos

1. Estudiar la contribución de los macrófagos residentes en el remodelado VI después del IAMCEST y en el modelo de sobrecarga de presión inducida por isoproterenol.

2. Estudiar el papel del eje Gas6-AXL en la activación de miocitos profibróticos tras el infarto de miocardio experimental y en el modelo de isoproterenol.
3. Determinar el efecto de la inhibición de la vía AXL en la remodelado cardíaco y la fibrosis después de un infarto de miocardio.
4. Determinar los niveles séricos de Gas6 y las formas solubles de sus receptores TAM en la fase aguda y a los 6 meses tras el IAMCEST, y compararlos con los valores obtenidos en controles sanos ajustados por la edad y por factores de riesgo clásicos.
5. Determinar si los niveles séricos de Gas6 o Axl y Mertk se correlacionan con la remodelación VE adversa o el aumento de la fibrosis intersticial mediante la RMC.

1.2. Diseño del estudio

Estudios experimentales

Utilizamos diversas cepas de ratones mutantes: Axl KO, Mertk KO, Gas6 KO y CD169-DTR. Para los animales CD169-DTR, se había previsto inyectar la toxina diftérica los días 2, 5 y 7 días hasta 14 días (10 ng/g). Se ha demostrado que este tratamiento suprime las células positivas con CD169. Los controles DTR negativo fueron inyectados con la misma dosis de toxina diftérica.

Modelo murino de infarto de miocardio

Se crearon dos modelos de isquemia-reperfusión y de infarto de miocardio por oclusión temporal (45') y permanente de la arteria descendente anterior respectivamente. Se midió la función cardíaca por ecocardiografía antes del infarto y a los 28 días en los diferentes grupos. Tras sacrificar a los ratones, realizamos procedimientos rutinarios de sección y análisis histológicos. Las secciones histológicas de los corazones se tiñeron con tinción tricrómica de Masson y rojo picrosirius y se examinaron dos veces a ciegas.

Modelo de isoproterenol

Se administró isoproterenol mediante bombas peristálticas ALZET que liberan de forma continua el isoproterenol en el espacio subcutáneo del animal durante 14 días. Se empleó un flujo de 0,25 ml/hora de una solución del fármaco de 25 mg/kg/día. Los animales se monitorizaron de manera continua y se sacrificaron en el día 14. Se recogieron las muestras de tejido pertinentes y se caracterizaron. Se han evaluado

varios parámetros de la activación de señalización TAM, incluidas las fosfotirosinas Mertk y Axl, la fosforilación AKT y la activación STAT1 y 3. Además, se determinaron parámetros de un fenotipo profibrótico, incluida la TGF-beta, la fibronectina, los colágenos I y III y la angiotensina I. Estos análisis definieron si el eje Gas6/Mertk controlaba la activación de miofibroblastos cardíacos.

Estudio clínico

Hemos realizado un estudio de casos-controles observacional y prospectivo. Incluimos a 117 pacientes con un primer IAMCEST tratados con angioplastia primaria. Se obtuvo suero en tres momentos: a las 24 horas, a los 7 días y a los 6 meses del infarto. La función cardíaca, el tamaño del infarto y la fibrosis intersticial del miocardio no infartado fueron evaluados con cine RMC, mapas T2 y T1 y realce tardío. Los niveles de los diferentes componentes del sistema Gas6-TAM se midieron en el suero mediante técnicas de ELISA.

2. Resultados

2.1. Papel de los macrófagos en el remodelado cardíaco tras el infarto de miocardio

La contribución de los macrófagos cardíacos al remodelado tras un infarto se estudió usando la línea CD169DTR, que permite la depleción de los macrófagos en el momento deseado. La depleción antes del infarto, 3 o 7 días después del infarto, demostró que la ausencia de macrófagos próxima al infarto causa daños graves al miocardio y una mortalidad elevada (figura 1B). Por eso establecimos un sistema para eliminar macrófagos 7 días después del infarto mediante ligadura permanente. Con este modelo medimos la función cardíaca por ecografía y el remodelado (fibrosis) a los 28 días. Los resultados muestran un claro efecto de esta depleción tardía en el remodelado cardíaco que se refleja en un aumento de la fibrosis y una reducción en la contractilidad miocárdica (figuras 1C y 1D), con disminución de la fracción de eyección y acortamiento y del volumen latido (figura 1E).

2.2. Papel de los receptores TAM en el control del remodelado cardíaco después de un infarto

Hemos estudiado específicamente los receptores Mertk y Axl usando ratones

deficientes en estos receptores. En el modelo de isquemia-reperfusión, los ratones *Mertk*^{-/-}, que no tienen este receptor fagocítico en macrófagos, registran un incremento significativo y marcado en el tamaño de infarto 24 horas después del infarto, que se acompaña de un incremento notable en la mortalidad precoz (de 3 a 5 días después del infarto). El modelo de oclusión coronaria permanente nos mostró además un marcado incremento en la fibrosis en el corazón de los ratones mutantes (figuras 1F y 1H), lo que indica una clara deficiencia en la cicatrización normal en ausencia de este receptor.

El receptor *Axl* y su ligando *Gas6* también controlan la fagocitosis y se localizan en las células del sistema inmune. En el modelo de infarto agudo con reperfusión, ambos mutantes muestran un incremento en el área de miocardio infartado (figura 2A).

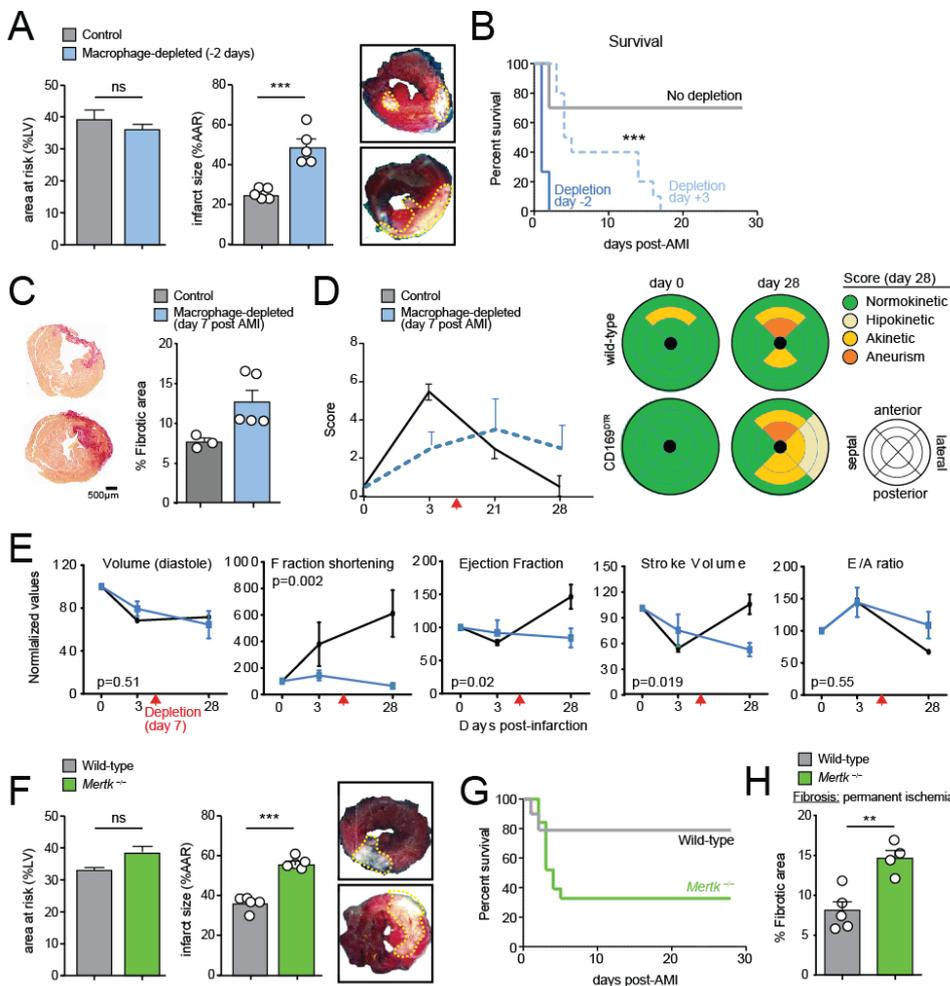


Figura 1

Esta observación contrasta con una reducción en el área de infarto en condiciones de oclusión coronaria permanente (figura 2B), lo que indica que el componente inflamatorio en condiciones de reperfusión puede ser determinante en etapas precoces

postisquémicas en ausencia de Axl. La reducción en fibrosis, sin embargo, no previene una mayor pérdida de función cardíaca (fracción de eyección y número de segmentos VI afectados) (figura 2C). En resumen, estos datos sugieren un importante papel cardioprotector de los macrófagos residentes fagocíticos en la fase aguda del infarto.

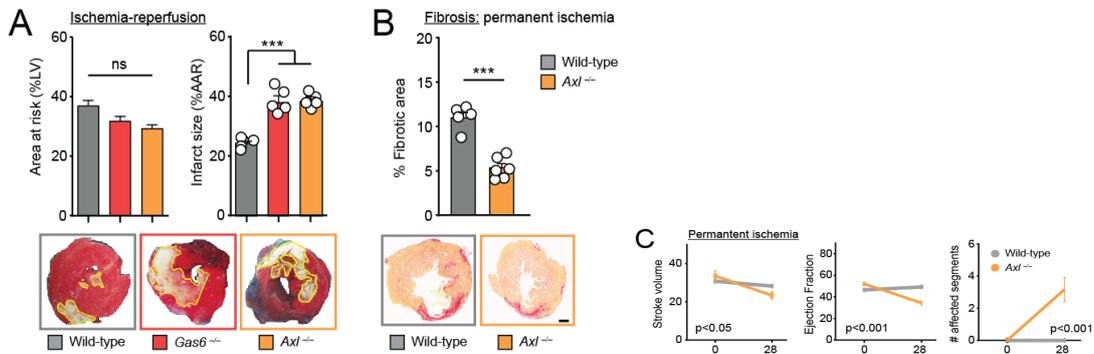


Figura 2

2.3. Efecto del isoproterenol en ratones deficientes en Axl y Mertk

Los animales fueron tratados mediante infusión continua de isoproterenol durante 14 días y después se sacrificaron. Se recogieron las muestras de tejido y se caracterizaron. Los ratones sufren una hipertrofia cardíaca inducida por el fármaco. Se muestra un ejemplo de cada grupo estudiado (figura 3A). El peso relativo del órgano es mayor en ratones tratados con isoproterenol en los tres grupos estudiados (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los animales tratados con vehículo) (figura 3B).

En los animales KO para Axl se aprecia un mayor tamaño del corazón de manera basal, aunque no es significativo. Después del isoproterenol, los animales KO para Axl presentan un mayor peso relativo del corazón que los animales silvestres (&&, $p < 0,01$).

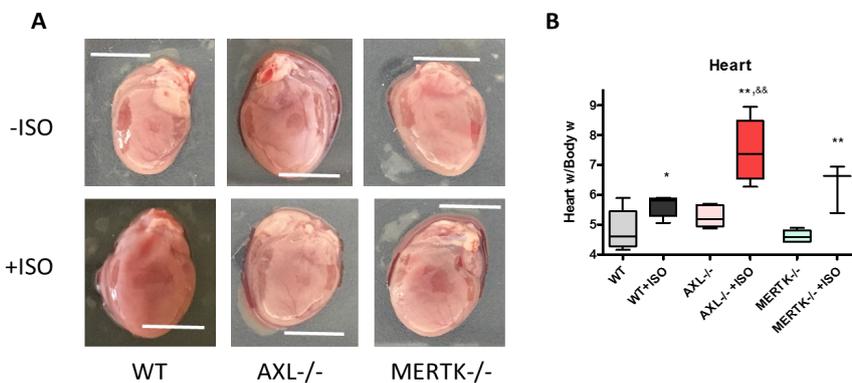


Figura 3

Estudiamos el grado de fibrosis intersticial cardíaca después del isoproterenol con tinciones específicas para colágeno (figura 4). Se incluye un ejemplo de una muestra histológica de cada grupo. Los ratones deficientes en Axl y Mertk presentaron un cierto grado de fibrosis en ausencia de tratamiento en comparación con los ratones control (& $p < 0,05$; &&& $p < 0,001$). Esta área fibrótica aumentó significativamente después del tratamiento con isoproterenol en los ratones control y en los $Mertk^{-/-}$ (* $p < 0,05$ respecto a los animales del mismo genotipo tratados con vehículo).

Sorprendentemente, en los animales KO para Axl se aprecia un área de fibrosis menor.

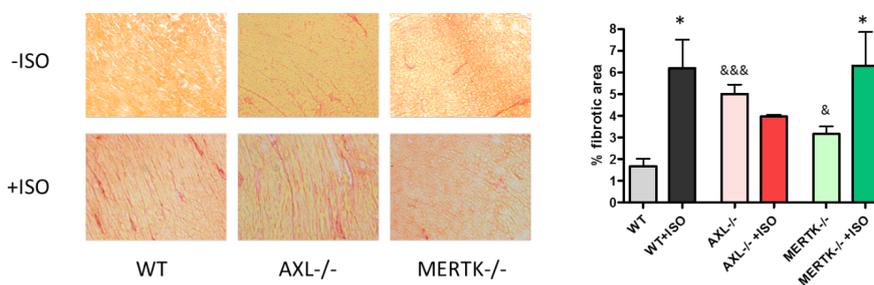


Figura 4

Se determinó la expresión de genes asociados al proceso de fibrosis en animales deficientes en Axl y animales control. Mientras que los niveles del marcador de miofibroblastos α -SMA se mantienen en los ratones control, estos niveles aumentan en los ratones KO para Axl. Sin embargo, la expresión de uno de los componentes de la matriz extracelular fibrótica, el colágeno A1, está claramente incrementada en los ratones silvestres respecto a los deficientes en Axl. Es remarcable la baja expresión y falta de inducción del factor quimioatrayente de macrófagos en los animales deficientes en Axl. La significación se indica por &, $p < 0,05$ respecto al grupo silvestre; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a los animales del mismo genotipo tratados con vehículo (figura 5).

2.4. Resultados del estudio clínico en IAMCEST

Un total de 20 pacientes presentaron remodelado adverso VE (Δ iVTDE $\geq 20\%$). En el análisis multivariado, que incluyó la hipertensión arterial, la FE inicial, la creatinina basal, el cambio en el T1n y los segmentos con obstrucción microvascular, solo los dos últimos fueron predictores de remodelado adverso. Se observó un aumento progresivo en los valores de Axl en los pacientes respecto a los controles (figura 6A). En una

cohorte retrospectiva (n = 227), los valores de Axl fueron predictores independientes de remodelado VI.

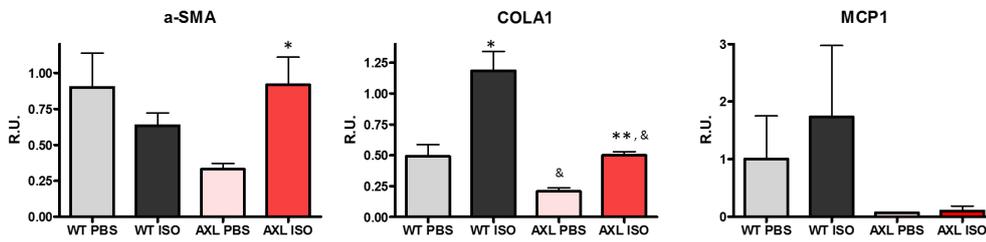


Figura 5

Sin embargo, en la cohorte prospectiva (n = 117), los pacientes con remodelado adverso presentaban globalmente valores más altos solo de Gas6, $p < 0,05$ (figura 6B), pero ninguno de los receptores TAM se correlacionó con los volúmenes VE finales ni con el tamaño del infarto por RMC.

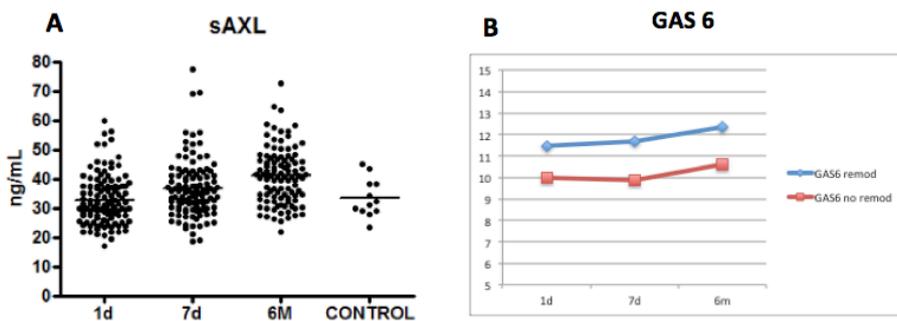


Figura 6

Los valores de Axl se correlacionaron con el volumen extracelular (VEC) en el miocardio remoto no infartado tanto en la fase aguda como a los 6 meses. En cambio, los valores de Mertk se correlacionaron inversamente con VEC a los 6 meses (figura 7).

Finalmente, tanto en la cohorte prospectiva como en la retrospectiva, se observaron unos valores más altos de Axl en suero en los pacientes que presentaban insuficiencia cardíaca durante el ingreso (Killip > 1). En resumen, en los pacientes con IAMCEST, los valores de Axl en suero parecen tener una mayor correlación con los procesos fisiopatológicos relacionados con el remodelado ventricular adverso, como serían la insuficiencia cardíaca y la fibrosis miocárdica intersticial.

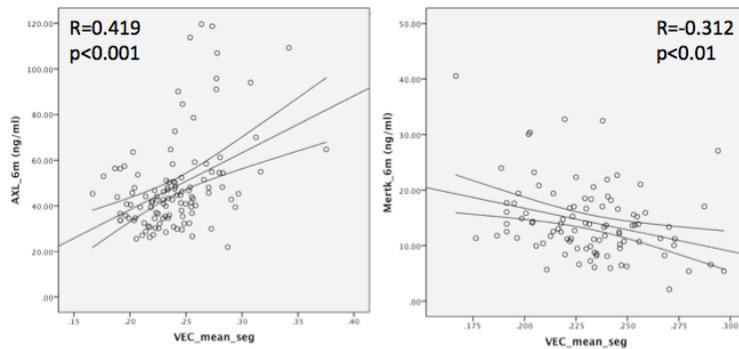


Figura 7

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

En el modelo experimental de infarto, los macrófagos y la modulación de sus receptores fagocíticos Gas6-TAM tienen un papel esencial en la reparación miocárdica. La supresión de estos receptores tiene efectos deletéreos sobre la fibrosis, el remodelado miocárdico y la recuperación de la función sistólica. En el modelo de sobrecarga de presión, la delección de Axl se asocia a un aumento de la hipertrofia, pero no al aumento de la fibrosis intersticial. Sin embargo, en humanos con IAMCEST, los niveles séricos de los componentes del sistema Gas6-TAM no se correlacionaron con el tamaño del infarto, y, en la serie retrospectiva, solo Axl se asoció a remodelado adverso VI. Los niveles de Gas6 y Axl se correlacionan con la expansión de la matriz extracelular en el miocardio remoto en la fase aguda y a los 6 meses. Además, de forma complementaria con lo observado en el modelo de delección de Mertk, que mostró un aumento del tamaño del infarto, en humanos se observó una correlación inversa entre los niveles séricos de Mertk y el aumento de la matriz extracelular en el miocardio remoto no infartado.

Finalmente, este trabajo muestra que el estudio de los cambios observados en el miocardio remoto no infartado mediante la caracterización del T1n y VEC con RMC permite mejorar la predicción de remodelado adverso ventricular, más allá de la cuantificación de la cicatriz del infarto. Estos hallazgos preliminares merecen un estudio mecanístico más detallado en futuros proyectos de investigación, tanto sobre cuál es el momento adecuado tras el infarto para modular la función de los macrófagos como de la relevancia, principalmente de Axl y Mertk, en el desarrollo del remodelado ventricular.

4. Bibliografía científica generada

Sanchez-Diaz M, Nicolás-Ávila JA, Cordero MD, Hidalgo A.

Mitochondrial adaptations of the growing heart.

Trends in Endocrinology and Metabolism 2020 (en prensa).

Adrover J, Aroca-Crevillén A, Crainiciuc G, Ostos F, Rojas-Vega Y, Rubio-Ponce A, Cilloniz C, Bonzón-Kulichenko E, Calvo E, Rico D, Moro MA, Weber C, Lizasoain I, Torres A, Ruiz-Cabello J, Vázquez J, Hidalgo A.

Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation.

Nat. Immunol. 2020.

Caldentey G, García De Frutos P, Garabito M, Berruezo A, Bosch X, San Antonio R, Flores E, Perea RJ, De Caralt TM, Rodríguez J, Ortiz-Pérez JT.

Serum levels of Growth Arrest-Specific 6 (GAS6) Protein and soluble AXL in Patients with ST-segment elevation Myocardial Infarction.

European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care 2019;8(8):708-716.

Hurtado B, Trakala M, Ximénez-Embún P, El-Bakkali A, Sanz-Castillo B, Álvarez-Fernández M, Sánchez-Martínez R, Martínez L, Muñoz J, García de Frutos P, Malumbres M.

Thrombocytopenia-associated mutations in the Ser/Thr kinase MASTL deregulate global phosphorylation and actin cytoskeleton dynamics in platelets.

The Journal of Clinical Investigation (2018) 128:5351-5367.

Brait VH, Miró F, Pérez-de-Puig I, Notario L, Hurtado B, Pedragosa J, Gallizioli M, Jiménez-Altayó F, Arbaizar-Rovirosa M, Otxoa-de-Amezaga A, Monteagudo J, Ferrer-Ferrer M, de la Rosa X, Bonfill-Teixidor E, Salas-Perdomo A, García de Frutos P, Lauzurica P, Planas AM.

CD69 plays a beneficial role in ischemic stroke by dampening endothelial activation.

Circulation Research (2019) 124:279-291.

Tutusaus A, de Gregorio E, Cucarull B, Cristóbal H, Aresté C, Graupera I, Coll M, Colell A, Gausdal G, Lorens JB, García de Frutos P, Morales A, Marí, M.

A functional role of GAS6/TAM in non-alcoholic steatohepatitis progression implicates AXL as therapeutic target.

Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2019;9:349-368.

Nicolás-Ávila JA, Lechuga-Vieco AV, Díaz E, Santiago DJ, Través PG, Rubio A, García-Marqués F, A-González N, Li JL, Quintana JA, González-Guerra A, Crainiciuc G, Guzmán G, Larrazabal J, Herrero E, Alegre-Cebollada J, Lemke G, Borreguero JJ, Reyes G, Castrillo A, Vázquez J, Priori S, Bernal JA, Enríquez JA Hidalgo A.

A network of macrophages supports mitochondrial homeostasis in the heart.

Cell 2019 (en revisión).

Marcos-Garces V, Gavara J, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, Rios-Navarro C, De Dios E, Pérez N, Merenciano H, Gabaldón A, Cànoves J, Racugno P, Gonzalez J, Bonanad C, Minana G, Nuñez J, Moratal D, Chorro FJ, Valente F, Lorenzatti D, Rodríguez-Palomares JF, Ortiz-Pérez JT, Bodí V.

Risk stratification in patients discharged for STEMI. Ejection fraction by echocardiography as the gatekeeper for a selective use of cardiac magnetic resonance.

Journal of the American College of Cardiology Cardiovascular Imaging (en revisión).