



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



PAPER DELS MACRÒFAGS I FIBROBLASTS RESIDENTS A LA REMODELACIÓ MIOCARDÍACA I LA REGENERACIÓ TISSULAR DESPRÉS DE L'INFART DE MIOCARDI: CONTRIBUCIÓ 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. Resum

Malgrat la teràpia de reperfusió i farmacològica, la incidència de la remodelació ventricular esquerra (VE) en l'infart de miocardi amb elevació del segment ST (IAMEST) és alta. Calen noves dianes terapèutiques per prevenir la insuficiència cardíaca i la mort. El macròfag resident i el fibroblast tenen un paper clau en la inflamació i la reparació tissular i interactuen mitjançant senyals paracrins. El sistema Gas6-TAM de lligands i receptors està implicat en la reparació dels teixits, regula l'eliminació de les cèl·lules danyades i modula la funció del fibroblast, però es desconeix quin paper té en el procés de curació d'un infart de miocardi. Nosaltres hem estudiat la modulació dels macròfags residents i fibroblasts pel sistema Gas6-TAM en la remodelació VE en el IAMEST humà i experimental.

El paper dels macròfags residents i la interacció amb els fibroblasts es van caracteritzar experimentalment en models de cardiomiopatia induïda per isoproterenol i d'infart de miocardi en ratolins deficients en macròfags cardíacs i en controls. El paper del sistema Gas6-TAM en la diferenciació de miofibroblasts es va avaluar mitjançant la combinació de mutacions en els gens AXL, Mertk i Gas6 amb ratolins deficients en macròfags residents, analitzats amb tècniques d'imatge avançada i d'histologia per estudiar la remodelació VE. Paral·lelament, en un estudi clínic, vam mesurar els nivells d'AXL, Mertk i Gas6 en el sèrum en una sèrie de malalts ingressats amb un primer IAMEST. La relació amb la remodelació VE i la fibrosi intersticial en el miocardi no infartat es va avaluar per ressonància magnètica cardíaca (RMC), realitzada en el moment de l'ingrés i al cap de 6 mesos.

La nostra hipòtesis era que el sistema Gas6-TAM estaria activat i modularia la funció dels macròfags residents i fibroblasts en la reparació de teixits després d'un infart de miocardi, i així podria esdevenir una diana terapèutica per prevenir la remodelació patològica VE en el IAMEST.

1.1. Objectius

1. Estudiar la contribució específica dels macròfags residents en la remodelació VE després del IAMEST i en el model de sobrecàrrega de pressió induït per isoproterenol.
2. Estudiar el paper de l'eix Gas6-Axl en l'activació de miòcits profibròtics després de

l'infart de miocardi experimental i en el model d'isoproterenol.

3. Determinar l'efecte de la inhibició de la via Axl en la remodelació cardíaca i la fibrosi després d'un infart de miocardi.

4. Determinar els nivells sèrics de Gas6 i les formes solubles dels seus receptors TAM en la fase aguda i 6 mesos després del IAMEST, i comparar-los amb els valors obtinguts en controls sans ajustats per l'edat i pels factors de risc clàssics.

5. Determinar si els nivells sèrics de Gas6 o Axl i Mertk es correlacionen amb la remodelació VE adversa o l'augment de la fibrosi intersticial mitjançant l'RMC.

1.2. Disseny de l'estudi

Estudis experimentals

Utilitzem diverses soques de ratolins mutants: Axl KO, Mertk KO, Gas6 KO i CD169-DTR. Per als animals CD169-DTR, s'havia previst injectar la toxina diftèrica els dies 2, 5 i 7 dies fins a 14 dies (10 ng per gram de pes corporal). S'ha demostrat que aquest tractament suprimeix les cèl·lules positives amb CD169. Els controls DTR negatiu es van injectar amb la mateixa dosi de toxina diftèrica.

Model murí d'infart de miocardi

Es van crear dos models d'isquèmia-reperfusió i d'infart de miocardi per oclusió temporal (45') i permanent de l'artèria descendent anterior respectivament. Es va mesurar la funció cardíaca per ecocardiografia abans del procediment i al cap de 28 dies en els diferents grups. Després de sacrificar els ratolins, vam fer procediments rutinaris de secció i anàlisi histològica. Les seccions histològiques dels cors es van tenyir amb colorant tricròmic de Masson i vermell picrosirius, i es van examinar dues vegades a cegues.

Model d'isoproterenol

Es van fer experiments administrant isoproterenol mitjançant bombes peristàltiques ALZET que alliberen de manera contínua una solució d'isoproterenol en l'espai subcutani de l'animal durant 14 dies. Es va emprar un flux de 0,25 ml/hora d'una solució del fàrmac de 25 mg/kg/dia. Els animals són monitoritzats de manera contínua i se sacrifiquen quan acaba l'experiment el dia 14. Es van recollir les mostres de teixit

pertinents i es van caracteritzar. S'han avaluat diversos paràmetres de l'activació de senyalització TAM, incloses les fosfotirosines Mertk i Axl, la fosforilació AKT i l'activació STAT1 i 3. A més, es van determinar paràmetres d'un fenotip profibròtic, inclosa la TGF-beta, la fibronectina, els col·làgens I i III i l'angiotensina I. Aquestes anàlisis definiran si l'eix Gas6/Mertk controla l'activació de miofibroblasts cardíacs.

Estudi clínic

Hem dut a terme un estudi de casos-controls observacional i prospectiu. Hem inclòs 117 pacients amb un primer IAMEST tractats amb angioplàstia primària. Es va obtenir sèrum en tres moments: al cap de 24 hores, de 7 dies i de 6 mesos després l'infart. La funció cardíaca, la mida de l'infart i la fibrosi intersticial al miocardi remot no infartat es van avaluar mitjançant RMC amb tècniques de cine, mapeig T2 i T1 i realçament tardà. Els nivells dels diferents components del sistema Gas6-TAM es van mesurar en el sèrum mitjançant tècniques d'ELISA.

2. Resultats

2.1. Paper dels macròfags en la remodelació cardíaca després de l'infart de miocardi

Per determinar la contribució dels macròfags cardíacs a la remodelació després d'un infart, hem fet servir la línia CD169DTR, que permet la depleció d'aquests macròfags en el moment desitjat en ratolins adults. La depleció abans de l'infart, va demostrar, tres o set dies després de l'infart, que l'absència de macròfags en moments propers a l'infart causen danys greus al miocardi i una incidència de mort elevada (figures 1A i 1B). Per aquest motiu vam establir un nou sistema per eliminar macròfags 7 dies després de l'infart mitjançant lligadura permanent. Amb aquest model hem mesurat la funció cardíaca per ecografia i la remodelació (fibrosi) 28 dies després de l'infart. Els resultats mostren un efecte clar d'aquesta depleció tardana a la remodelació cardíaca que es reflecteix en un augment de la fibrosi i una reducció en la funció contràctil del miocardi (figures 1C i 1D), amb alteracions clares de la fracció d'ejecció, de la fracció d'escurçament i del volum bategat (figura 1E).

2.2. Paper dels receptors TAM en el control de la remodelació cardíaca després d'un infart

Hem estudiat específicament els receptors Merck i Axl emprant ratolins deficients en aquests receptors. En el model d'isquèmia-reperfusió, els ratolins *Mertk^{-/-}*, que no tenen aquest receptor fagocític en macròfags, registren un increment significatiu i marcat en la mida de l'infart 24 hores després que s'hagi produït, el qual s'acompanya d'un increment notable en la mortalitat precoç (de 3 a 5 dies després de l'infart). El model d'oclusió coronària permanent ens va mostrar, a més, un marcat increment en la fibrosi al cor dels ratolins mutants (figures 1F i 1H), cosa que indica una clara deficiència en la cicatrització normal en absència d'aquest receptor.

El receptor Axl i el seu lligand Gas6 també controlen la fagocitosi i es localitzen en les cèl·lules del sistema immune. En el model d'infart agut amb reperfusió, els dos mutants mostren un increment en l'àrea de miocardi infartat (figura 2A).

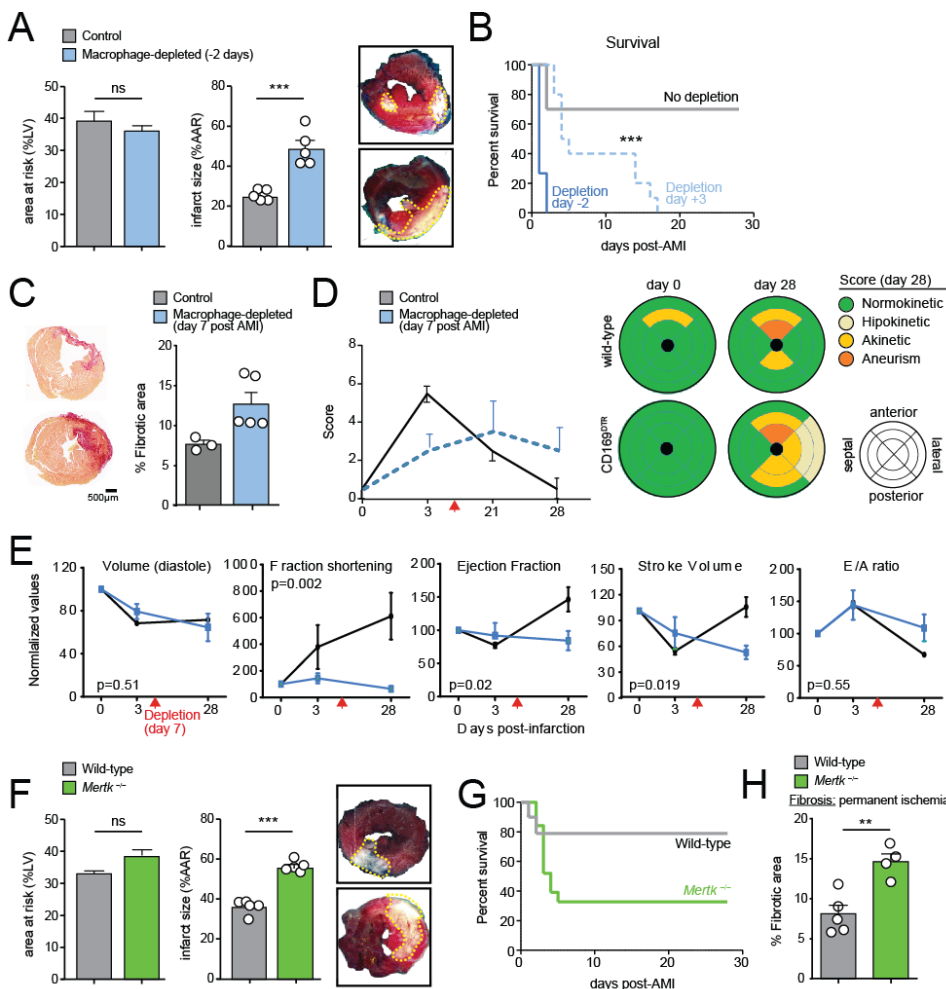


Figura 1

Aquesta observació contrasta amb una reducció en l'àrea de l'infart en condicions d'oclusió permanent de la coronària (figura 2B), la qual cosa indica que el component inflamatori en condicions de reperfusió pot ser determinant en etapes precoces postisquèmiques en absència d'Axl. La reducció en fibrosi, però, no prevé una pèrdua més gran de funció cardíaca, és a dir, de fracció d'ejecció i nombre de segments ventriculars afectats (figura 2C). En resum, aquestes dades suggereixen un paper cardioprotector important dels macròfags residents fagocítics en la fase aguda de l'infart.

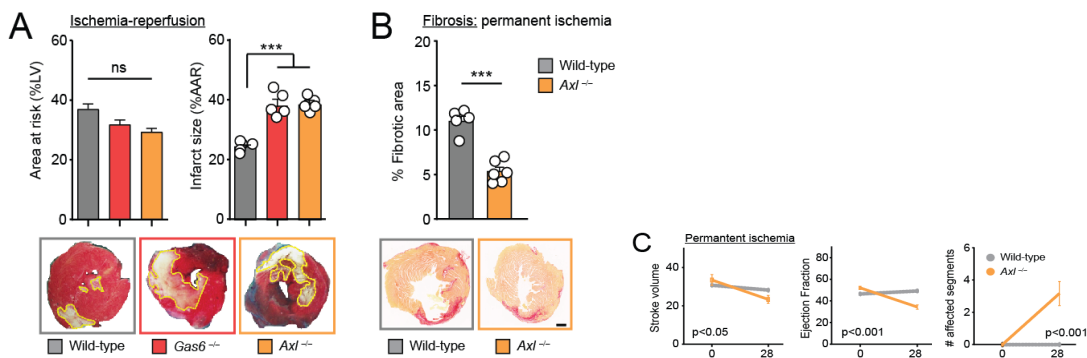


Figura 2

2.3. Efecte de l'isoproterenol en ratolins deficients en Axl i Mertk

Els animals es van tractar mitjançant infusió contínua d'isoproterenol durant 14 dies i després es van sacrificar. Es van recollir les mostres de teixit pertinents i es van caracteritzar (figura 3). Els ratolins pateixen una hipertròfia cardíaca induïda pel fàrmac. Es mostra un exemple de cada grup estudiat (figura 3A). El pes relatiu de l'òrgan és més gran en els animals tractats amb isoproterenol en els tres grups estudiats (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecte als animals tractats amb vehicle) (figura 3B).

En els animals KO per a Axl s'aprecia que la mida del cor és més gran de manera basal, encara que no arriba a ser significativa. Després del tractament amb isoproterenol, el pes relatiu del cor dels animals KO per Axl és més alt que en els animals silvestres (&&, $p < 0,01$).

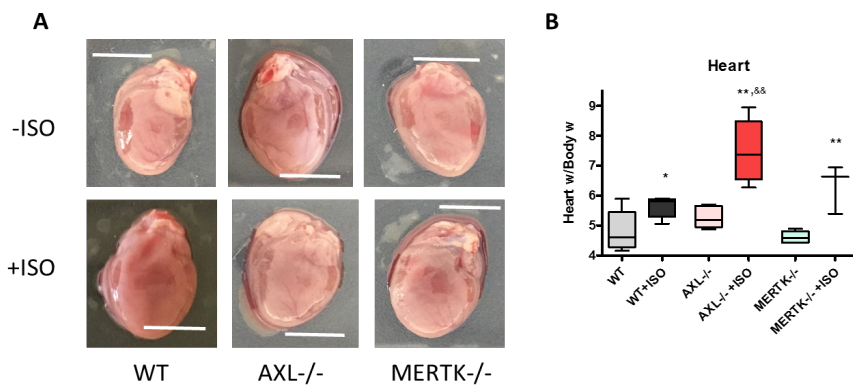


Figura 3

Hem estudiat el grau de fibrosi intersticial cardíaca després del tractament amb isoproterenol amb tincions específiques per col·lagen (figura 4). Es mostra un exemple d'una mostra histològica de cada grup. Els ratolins deficientes en Axl i Mertk van presentar un cert grau de fibrosi en absència de tractament en comparació amb els ratolins control (&, $p < 0,05$; &&&, $p < 0,001$). Aquesta àrea fibròtica va augmentar significativament després del tractament amb isoproterenol en els ratolins control i en els Mertk^{-/-} (*, $p < 0,05$ respecte als animals del mateix genotip tractats amb vehicle). Sorprenentment, en els animals KO per a Axl s'aprecia una àrea de fibrosi més petita.

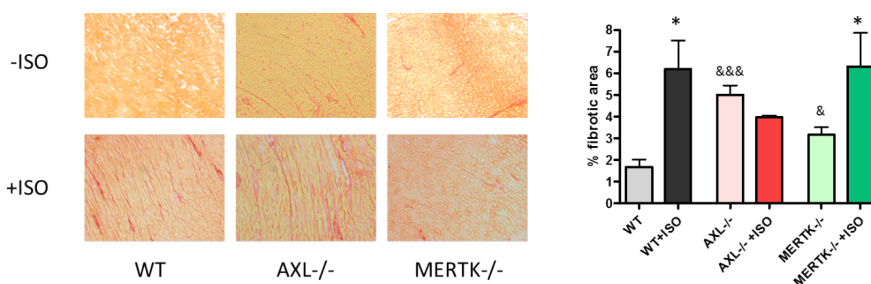


Figura 4

Es va determinar l'expressió de gens associats al procés de fibrosi en animals deficientes en Axl i animals control. Mentre que els nivells del marcador de miofibroblasts α -SMA es mantenen en els ratolins control, aquests nivells augmenten en els ratolins KO per a Axl. No obstant això, l'expressió d'un dels components de la matriu extracel·lular fibròtica, el col·lagen A1, mostra un increment clar en els ratolins silvestres respecte als deficientes en Axl. És remarcable la baixa expressió i falta d'inducció del factor quimioatracent de macròfags en el cas dels animals deficientes en Axl. La significació s'indica per &, $p < 0,05$ respecte al grup silvestre; * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ respecte als animals del mateix genotip tractats amb vehicle (figura 5).

2.4. Resultats de l'estudi clínic en IAMEST

Un total de 20 pacients van presentar remodelació adversa VE (Δ iVTDE \geq 20%). En l'anàlisi multivariada que va incloure la hipertensió arterial, la FE inicial, la creatinina basal, el canvi en el T1n i els segments amb obstrucció microvascular, només els dos últims van ser predictors de remodelació adversa. Es va observar un augment progressiu en els valors d'Axl en els pacients respecte als controls (figura 6A). En una cohort retrospectiva (n = 227) els valors d'Axl van ser predictors independents de remodelatge VI.

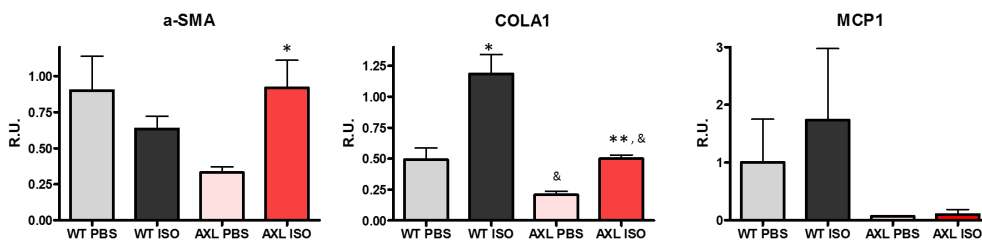


Figura 5

Malgrat això, en la cohort prospectiva (n = 117), els pacients amb remodelació adversa presentaven globalment valors més alts només de Gas6, $p < 0,05$ (figura 6B), però cap dels receptors TAM no es va correlacionar amb els volums VE finals ni amb la grandària de l'infart per RMC.

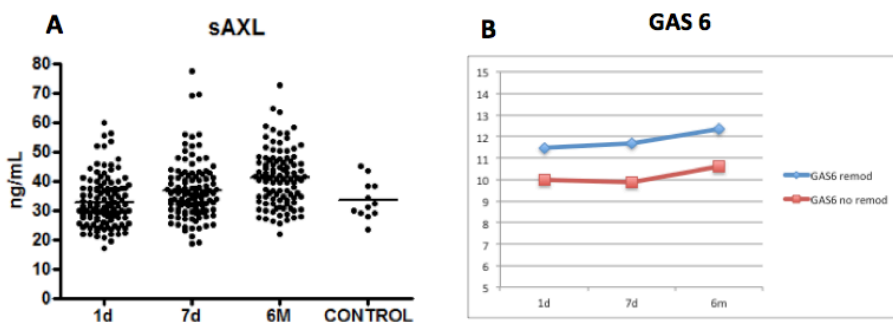


Figura 6

Els valors d'Axl es van correlacionar amb el volum extracel·lular (VEC) en el miocardi remot no infartat tant en la fase aguda com al cap de 6 mesos. En canvi, els valors de Mertk es van correlacionar inversament amb VEC al cap de 6 mesos (figura 7).

Finalment, tant en la cohort prospectiva com en la retrospectiva, es van observar uns valors més alts d'Axl en sèrum en els pacients que presentaven insuficiència cardíaca durant l'ingrés (Killip > 1).

En resum, en els pacients amb IAMEST, els valors d'Axl en sèrum semblen tenir una correlació més alta amb els processos fisiopatològics relacionats amb la remodelació ventricular adversa, com serien la insuficiència cardíaca i la fibrosi miocardiàca intersticial.

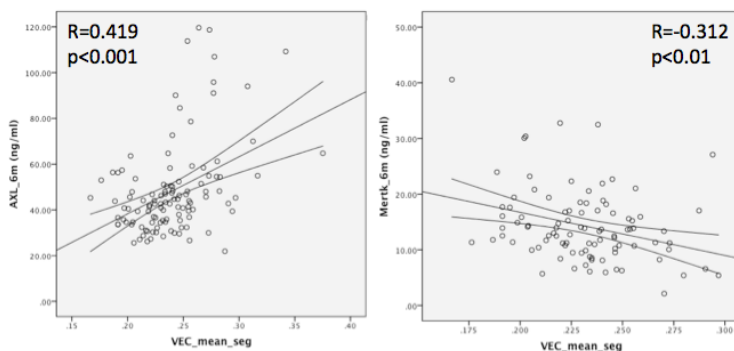


Figura 7

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els resultats en el model experimental d'infart mostren que els macròfags i la modulació dels seus receptors fagocítics Gas6-TAM tenen un paper essencial en la reparació del dany miocardiàc en el IAMEST. La supressió d'aquests receptors té efectes deleteris clars sobre el desenvolupament de fibrosi i remodelació miocardiàca i sobre la recuperació de la funció sistòlica. En el model de sobrecàrrega de pressió, la deleció d'Axl es va associar a un augment de la hipertròfia, però no es va associar a un augment de la fibrosi intersticial. No obstant això, en humans amb IAMEST, els nivells sèrics dels diferents components del sistema Gas6-TAM no es van correlacionar amb la mida de l'infart, i només Axl en la sèrie retrospectiva es van associar a remodelació ventricular adversa. Els nivells sèrics de Gas6 i Axl en la fase aguda es correlacionen amb mesures d'expansió de la matriu extracel·lular en el miocardi remot en la fase aguda i al cap de 6 mesos. A més, de manera complementària amb el que s'ha observat en el model experimental de deleció de Mertk, que va mostrar un augment de

la mida de l'infart, en humans es va observar una correlació inversa entre els nivells sèrics de Mertk i l'augment de la matriu extracel·lular en el miocardi remot no infartat.

Finalment, aquest treball mostra que l'estudi dels canvis observats en el miocardi remot no infartat mitjançant la caracterització del T1n i VEC amb RMC permet millorar la predicció de remodelació ventricular adversa, més enllà de la quantificació de la cicatriu de l'infart. Aquestes troballes, encara que preliminars, mereixen un estudi mecanístic més detallat en futurs projectes de recerca, tant sobre quin és el moment adequat després de l'infart per modular la funció dels macròfags com de la rellevància, principalment d'Axl i Mertk, en el desenvolupament de la remodelació ventricular.

4. Bibliografia 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 premsa).

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 revisió).

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 revisió).