



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper del sistema GAS6-TAM en el remodelat ventricular post infart agut de miocardi

Guillem R. Caldentey Adrover



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESI DOCTORAL

Paper del sistema GAS6-TAM en el remodelat ventricular post infart agut de miocardi

Guillem R. Caldentey Adrover

FACULTAT DE MEDICINA

Tutor: José Tomás Ortiz Pérez

Directors: José Tomás Ortiz Pérez /Xavier Bosch Genover

AGRAÏMENTS:

A la meva família, pel seu suport en aquesta etapa.

FINANÇAMENT

Aquest treball ha estat finançat per:

Ministerio de Economía y Competitividad. Instituto Carlos III, Fondo Investigación Sanitaria

(nº PII5/00531, SAF2015-66515-R i RTC-2015-4184-1)

European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”

Fundació La Marató TV3 (nº 20153030 i 20153031)

Societat Catalana de Cardiologia SCC_ROCHE2015_001 (codi SAP: DN040578) i

Siemens Healthcare 11/425



"Una manera de hacer Europa"



ÍNDEX

ÍNDIX

1.- Introducció	13
1.1. - Fisiopatologia del remodelat	17
1.2. - Antiinflamatoris i infart	19
1.3. - GAS6-TAM	23
1.4. - GAS6-TAM en patologia cardíaca	28
2.- Hipòtesis i objectius	31
3.- Material i mètodes	35
3.1. - Població de l'estudi	37
3.2. - Extracció de les mostres	38
3.3. - Determinació de sAXL i GAS6	39
3.4. - Ressonància magnètica cardíaca	41
3.5. - Dades clíniques	49
3.6. - Seguiment clínic	50
3.7. - Anàlisis estadístics	50
4.- Resultats	53
4.1. - Relació entre GAS6 i sAXL amb factors de risc cardiovascular	55
4.2. - Canvis evolutius a la fase aguda de l'infart i als 6 mesos	58
4.3. - Insuficiència cardíaca	60
4.4. - Paràmetres de funció i remodelat ventricular	63
4.5. - Nombre de vasos malalts	68
4.6. - Estudi de la fibrosi en el miocardi remot mitjançant RM	68
4.7. - Esdeveniments clínics durant el seguiment	76
5.- Discussió	77
5.1. - GAS6-TAM en la isquèmia miocàrdica	79
5.2. - Potencial paper de GAS6 com a marcador de risc cardiovascular	83
5.3. - Insuficiència cardíaca	88
5.4. - Cicatrització i fibrosi	90
6.- Limitacions	95

7.- Aplicabilitat clínica	99
8.- Conclusions	103
9.- Bibliografia	107

ABREVIATURES

ADAMs	Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing proteases
AINES	Antiinflamatoris no esteroides
AKT	Serine/threonine protein kinase AKT
AXL	Receptor AXL (deriva del mot grec “anexelekto”, que significa incontrolat)
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CCR2	Receptor de quimiocina 2
CK-MB	Creatin kinasa-MB
DLP	Dislipèmia
DM	Diabetis mellitus
DTDVE	Diàmetre Telediastòlic Ventricle Esquerre
DTSVE	Diàmetre Telesistòlic Ventricle Esquerre
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FEVE	Fracció d'Ejecció del Ventricle Esquerre
GAS6	Growth Arrest-Specific gene 6
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HTA	Hipertensió arterial
IECAs	Inhibidors Enzim Conversor Angiotensina
iVTDVE	Índex de Volum telediastòlic ventricle esquerre
iVTSVE	Índex de Volum telesistòlic ventricle esquerre
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-10	Interleuquina-10
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases

MerTK	Receptor MerTK
NF-κB	Nuclear factor –κB
NYHA	New York Heart Association
OM	Obstrucció Microvascular
PCR	Proteïna C Reactiva
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
sAXL	AXL soluble
SCAEST	Síndrome Coronària Aguda amb Elevació del Segment ST
T1	Temps de relaxació longitudinal
TAM	Receptors TAM (Tyro3, Axl i Mer)
TNF alfa	Factor de Necrosi Tumoral alfa
TnI	Troponina I
Tyro3	Receptor Tyro3
VEC	Volum Extracel.lular
1,5-3 T	1,5-3 Tesla (força del camp magnètic)

INTRODUCCIÓ

1.- INTRODUCCIÓ

Malgrat que el pronòstic de la síndrome coronària aguda ha millorat considerablement en els últims 30 anys, la cardiopatia isquèmica segueix sent la principal causa de mortalitat en el països occidentals i és la responsable d'un terç de les morts en majors de 35 anys ^{1,2}.

Quan es produeix una oclusió coronària, es posen en marxa una sèrie de canvis a nivell biològic, histològic, estructural i funcional que condicionen el remodelat cardíac i que predisposen als subjectes que la pateixen a desenvolupar disfunció ventricular i insuficiència cardíaca progressiva, el que s'associa a un augment de la mortalitat ³⁻⁵. El remodelat ventricular inclou la dilatació i canvis geomètrics del ventricle esquerre passant d'una morfologia més cònica a més esfèrica, així com la formació d'una cicatriu. Aquests canvis s'inicien ja a la fase precoç com a resposta a una fase inflamatòria, i es desenvoluparien a llarg terme amb la formació posterior d'una cicatriu amb dipòsit de col·lagen. Alguns individus desenvoluparan major remodelat amb majors variacions de volums i geometria ventricular, el que no sempre va associat a infarts més extensos, si no que existeixen diferents graus de resposta inflamatòria que modularien aquest procés ⁶.

El desenvolupament d'insuficiència cardíaca després d'un infart, està íntimament relacionat amb el procés de cicatrització i els canvis en la geometria (dilatació, esfericitat, aprimament mural), funció i estructura cardíaca. Per tant, el remodelat ventricular té implicacions pronòstiques en la cardiopatia isquèmica ^{7,8} i és una important diana terapèutica.

Molts d'aquests canvis estarien regulats per l'activació neuro-humoral amb el sistema nerviós simpàtic i l'eix renina-angiotensina-aldosterona. A dia d'avui les eines

de les que disposem per disminuir aquesta cadena d'esdeveniments serien la revascularització precoç, la regulació neuro-humoral (betabloquejants, inhibidors de l'enzim conversor d'angiotensina, els antagonistes del receptor de angiotensina i els antagonistes de la aldosterona) i la teràpia de resincronització cardíaca en pacients seleccionats⁹.

Malgrat una reperfusió coronària òptima i de la instauració dels tractaments farmacològics recomanats per aconseguir aquesta modulació neuro-hormonal¹⁰, la incidència de remodelat ventricular esquerre post infart agut de miocardi segueix essent elevada, arribant a un 30 %, depenent de la definició de remodelat que s'utilitzi^{11,12}.

Per tant, existeix encara una necessitat clínica per la recerca de tractaments nous i complementaris que puguin parar la progressió cap a la insuficiència cardíaca en els pacients que han sofert un infart recent i seria d'esperar que si s'aconsegueixen modular les vies adequades, es podria millorar el pronòstic de l'infart i disminuir el remodelat ventricular.

1.1- Fisiopatologia del remodelat

La lesió isquèmica del ventriclle esquerre després de l'ínfart agut de miocardi, implica processos a nivell molecular, cel·lular i tissular, així com canvis hemodinàmics substancials que actuen a la vegada de manera negativa, amplificant la resposta inflamatòria.

La oclusió coronària aguda indueix la necrosi dels cardiomiòcits, la qual cosa activa una resposta immunològica innata que desencadena una important reacció inflamatòria amb l'expressió de mediadors pro-inflamatoris com citoquines, interleuquines i metal·loproteases, així com la proliferació i migració de fibroblasts a la zona infartada ¹³. La fase inflamatòria està mediada per citoquines que afavoreixen el reclutament de leucòcits i macròfags. Els debris cel·lulars activen l'inflamasoma, una estructura macromolecular que activa la caspasa-1 i la conversió de pro-interleuquina (IL)-1b a IL-1b madura. La formació i la activació del inflamasoma amplifica la lesió tissular i la resposta inflamatòria local i sistèmica ^{14,15}. Els leucòcits eliminen les cèl·lules necròtiques i alliberen citoquines i factors de creixement. Posteriorment aquests neutròfils entren en apoptosi, conduint a una progressiva desaparició de l'infiltrat. Els monòcits que infiltren la lesió, expressen inicialment un fenotip pro-inflamatori (M1), seguit d'un canvi cap a un fenotip angiogènic i pro-fibròtic (M2) ^{16,17}. L'apoptosi dels neutròfils i el canvi fenotípic dels macròfags són processos clau en la resolució de la inflamació.

A la fase proliferativa, els fibroblasts es diferencien a miofibroblasts en resposta a estímuls mitògens i anti-inflamatoris, adquirint la capacitat de sintetitzar col·lagen, proteïnes de la matriu extracel·lular i proteïnes contràctils ¹⁸, per formar la cicatriu i mantenir la geometria ventricular i prevenir així la formació d'aneurismes. Les cèl·lules

que no són cardiomiòcits, principalment els fibroblasts, suposen el 70% del recompte total de cèl·lules cardíques. Aquesta fase proliferativa, dóna pas posteriorment a una fase de maduració de la cicatriu, on els miòcits necròtics són progressivament substituïts per teixit fibròtic mitjançant un procés actiu on intervenen macròfags, fibroblasts i leucòcits que infiltren el teixit danyat ^{19,20} i la matriu extracel·lular es consolida amb la formació de ponts intra i intermoleculars. Es produeix posteriorment, una desactivació i apoptosi d'aquests fibroblasts i miofibroblasts. Tot aquest procés està regulat per múltiples senyals intra i intercel·lulars.

La inflamació per eliminar miòcits necròtics i la activació fibroblàstica per formar una cicatriu són clau en la reparació de la lesió, però són respostes molt variables entre els individus ²¹. Una resposta inflamatòria prolongada o excessiva, pot tenir conseqüències catastròfiques en l'arquitectura tissular i la funció orgànica, per tant, la reparació dels teixits afectats requereix l'activació adequada de vies inhibidores endògenes que restringeixin i suprimeixin les senyals pro-inflamatòries ²².

Cada vegada hi ha més evidència del paper de la inflamació en la insuficiència cardíaca encara que les vies fisiopatològiques i el paper de les diferents cèl·lules i interleuquines no estan del tot aclarits ²³⁻²⁵. Per exemple, se sap que la interleuquina-6 actua com a reguladora de la resposta immune, suprimint l'activació incontrolada de la cascada inflamatòria i podria ser beneficiosa en la fase crònica en dos aspectes: prevenint la necrosi de les cèl·lules apoptòtiques reduint l'alliberació d'elements pro-inflamatoris i inhibint les cèl·lules pro-inflamatòries, especialment els monòcits i els macròfags ²⁶. Per altra banda, els nivells elevats de IL-6 en la fase aguda de l'infart agut de miocardi, s'associen a més efectes adversos durant el seguiment ²⁷.

1.2- Antiinflamatoris i infart

Malgrat resultats inicialment encoratjadors en models pre-clínic amb tractaments antiinflamatoris en el context de l'infart de miocardi, a dia d'avui no hi ha hagut resultats beneficiosos en estudis clínics randomitzats ²⁸ (*taula 1*).

Una revisió sistemàtica i metaanàlisi del paper dels glucocorticoides en l'infart, no va mostrar beneficis en la supervivència ²⁹, i per tant estan desaconsellats en les guies clíniques donat el seu potencial efecte advers en la retenció de líquids, hiperglucèmia, atròfia muscular a més d'afavorir el remodelat ventricular ³⁰. Pel que fa al paper dels antiinflamatoris no esteroïdes (AINEs), estudis experimentals han mostrat resultats contradictoris, però sembla que retardarien més que disminuirien la necrosi, amb el risc de formació d'aneurismes i ruptura de la paret ventricular ^{31,32}. S'ha estudiat també el potencial benefici d'inhibir diferents integrines, amb anticossos monoclonals contra CD18 o CD11/CD18 ³³, o p-selectina (una molècula d'adhesió leucocitària) ³⁴, també amb resultats negatius. Anticossos contra components del sistema del complement, tampoc han mostrat beneficis definitius en la reducció de l'infart ni en la millora de la supervivència ³⁵⁻³⁷. Bloquejants de la IL-1 han mostrat resultats favorables en models pre-clínic i en estudis fase 2 ^{38,39}. Una publicació recent, va mostrar que la inhibició de IL-1 mitjançant un anticòs monoclonal (Canakinumab 150 mg, injeccions subcutànies trimestrals) en pacients amb antecedent d'infart i elevació de proteïna C reactiva (≥ 2 mg/l), reduïa la recurrència d'esdeveniments cardiovasculars en comparació amb placebo durant un seguiment de 3.7 anys, encara que s'associava a major taxa de infeccions greus ⁴⁰.

La inhibició de la IL-6, la IL-10 o el TNF-alfa també han estat estudiades amb resultats majoritàriament no conclouents ⁴¹⁻⁴⁵. S'ha vist que el bloqueig del receptor de IL-

6 amb l'anticòs monoclonal Tocilizumab en pacients amb artritis reumatoide, s'associa a una menor taxa d'esdeveniments coronaris ⁴⁶.

El paper de la inhibició de les metal·loproteases per disminuir la dilatació i el remodelat ventricular no ha mostrat tampoc resultats definitius a dia d'avui, encara que sembla que podria tenir efectes beneficiosos ⁴⁷⁻⁴⁹. El tractament amb Immunoglobulina G intravenosa, no ha mostrat resultats positius en el remodelat en estudis fase 2 ⁵⁰. S'estan explorant noves vies en estudis experimentals que podrien disminuir la inflamació, el remodelat i la fibrosi postinfart (Junctional adhesion molecule-A, inhibició de TNF-alfa amb nanopartícules de DNA...) ^{51,52} així com noves potencials dianes terapèutiques com ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) ⁵³. Per altra banda, fàrmacs més antics com la colchicina podrien també jugar un paper en la inflamació post-infart ^{54,55}, però no hi ha suficient evidència per utilitzar-los en la pràctica clínica.

L'estudi LATITUDE TIMI 60 va mostrar que el tractament amb Losmapimod via oral (inhibidor selectiu de la p38 MAPK, quinasa que amplifica la cascada inflamatòria estimulant la producció de múltiples citoquines), en pacients amb antecedent d'infart, no reduïa el risc d'esdeveniments isquèmics majors durant un seguiment de 12 setmanes després de la randomització ⁵⁶.

El tractament amb metotrexat, no ha mostrat resultats positius en la reducció del tamany de l'infart, tenint, a més, un efecte perjudicial empitjorant la fracció d'ejecció del ventricle esquerre als 3 mesos de tractament ⁵⁷.

Els receptors de quimiocines (pertanyents a la família de les citoquines, algunes amb propietats pro-inflamatòries i d'altres amb propietats homeostàtiques) s'han proposat també com a potencials dianes terapèutiques en el context de l'infart de miocardi ⁵⁸. S'ha

vist que la inhibició del Receptor de quimiocina 2 (CCR2) disminueix el tamany de les plaques ateroscleròtiques en models animals ⁵⁹ i que sembla tenir un paper important en la inflamació vascular ⁶⁰.

L'estudi de la fisiopatologia dels canvis post-infart i els possibles marcadors associats és una àrea d'interès que té el potencial de millorar el pronòstic dels pacients i la monitorització terapèutica ⁶¹. Actualment, pocs marcadors de remodelació precoç estan disponibles a la pràctica clínica.

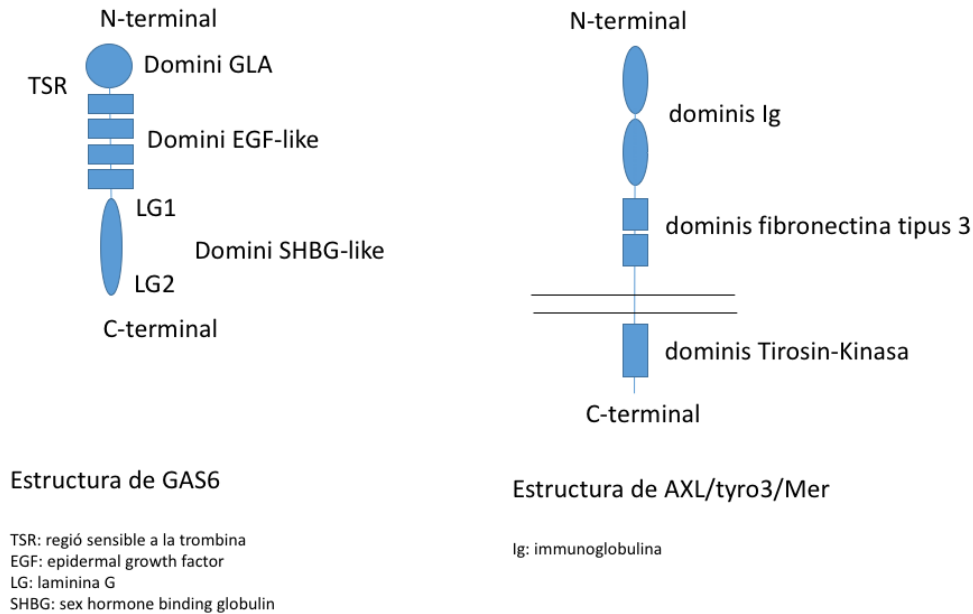
Taula 1. Principals vies antiinflamatòries explorades en l'infart.

Glucocorticoids	AINES	Integrines	Sistema del complement	Citoquines	Metal·loproteases	Inhibidors MAPK	Immunosupressors
<p>Giugliano et al, 2003 (Metaanàlisi)</p> <p>16 estudis,</p> <p>n=4000, diferents fàrmacs: hidrocortisona, dexametasona, prednisona, metilprednisona</p>	<p>Lefer et al, 1979 (ibuprofeno)</p> <p>Romson et al, 1982 (ibuprofeno)</p> <p>Hammermann et al, 1983 (indometacina)</p> <p>Gislason et al, 2006 (Inh COX-2)</p> <p>Timmers et al, 2007 (Inh COX-2)</p>	<p>Baran et al, 2001 (Ac anti CD18)</p> <p>Faxon et al, 2002 (Ac anti CD11/CD18)</p> <p>Tardif et al, 2013 (Ac anti p-selectina)</p>	<p>De Zwaan et al, 2002 (inh C1; Ceter)</p> <p>Mahaffey et al, 2003 (Ac anti C5; pexelizumab)</p> <p>Granger et al, 2003 (Ac anti C5; pexelizumab)</p> <p>Armstrong et al, 2007 (Ac anti C5; pexelizumab)</p>	<p>Abbate et al, 2010 (Inh Receptor IL1; Anakinra)</p> <p>Abbate et al, 2013 (Inh Receptor IL1; Anakinra)</p> <p>Padfield et al, 2013 (inh TNF-alfa, Etanercept)</p> <p>Swerdlow et al, 2012 (Inh IL-6, Tocilizumab)</p> <p>Ridker et al, 2017 (Inh IL-1: Canakinumab)</p>	<p>Hudson et al, 2006 (PG-116800. inh MMP)</p> <p>Cerisano et al, 2013 (Doxicilina)</p>	<p>O'Donoghue et al, 2016 Inhibidor p38 MAPK (Losmapimod)</p>	<p>Moreira et al, 2017. Metotrexat</p>
<p>No efectes adversos en cicatrització però efecte beneficiós no conclouent</p> <p>Desaconsellats en guies clíniques (efectes remodelat)</p>	<p>Efectes no conclouents.</p> <p>Potencial risc de formació d'aneurismes i ruptura ventricular. Augment pressió arterial, disminució perfusió renal, risc hemorràgies digestives</p>	<p>Absència de beneficis clínics ni en el tamany de l'infart</p>	<p>Resultats contradictoris</p>	<p>Efectes discordants en reducció remodelat amb inh Receptor IL1. Reducció neutrofilia amb inh TNF-alfa però augment agregació plaquetària i monocitària</p> <p>Tocilizumab: menor taxa esdeveniments coronaris en pacients amb artritis reumatoide.</p> <p>Canakinumab: reducció recurrència d'esdeveniments cardiovasculars, però major taxa de infeccions greus</p>	<p>No efecte amb PG-116800</p> <p>Disminució del remodelat als 6 m amb doxiciclina</p>	<p>No reducció d'esdeveniments isquèemics majors</p>	<p>No reducció tamany de l'infart. Empitjorament de la fracció d'ejecció.</p>

1.3- GAS6-TAM

El producte del Growth Arrest-Specific gene 6 (GAS6) és una proteïna dependent de la vitamina K que es va clonar i caracteritzar en 1993, i que té una homologia estructural i seqüenciació similar a l'anticoagulant natural Proteïna S (44% de similitud)⁶². Malgrat la presència d'un domini àcid γ -carboxiglutàmic en la seva estructura, no s'ha identificat que tingui cap paper en la coagulació. A diferència de la proteïna S, que és de síntesi hepàtica i que es troba en concentracions abundants en sèrum, les concentracions de GAS6 en plasma són unes mil vegades menors (nanograms/ml) i la seva expressió té lloc principalment al teixit cardíac, ronyons i pulmons, així com a les cèl·lules endotelials⁶³, cèl·lules musculars llises⁶⁴ i moll d'os⁶⁵. Aquesta proteïna actua de lligam d'una sèrie de receptors transmembrana, tirosin-quinasa que inclouen AXL, MerTK i Tyro3, coneguts com receptors TAM, amb propietats immunològiques i oncogèniques^{66,67} (**figura 1**). GAS6 s'uneix als receptors TAM amb diferent afinitat (Axl >>Tyro3 >>MerTK)⁶⁸ i les seves funcions semblen estar limitades a l'activació d'aquests receptors. AXL s'activa únicament via GAS6, mentre que tant Tyro3 com MerTK ho poden fer via proteïna S.

Figura 1. Estructura de GAS6 i els seus receptors TAM



Estudis *in vitro* i *in vivo* en ratolins han mostrat que GAS6, principalment via AXL, amplifica l'activació de les cèl·lules endotelials afavorint la interacció amb les plaquetes, l'extravasació de leucòcits, i la trombosi durant estímuls inflamatoris ⁶⁹. Per altra banda, un dels receptors TAM, concretament Mer Tyrosine Kinase (Mer-Tk), participa en la modulació de la secreció de TNF-alfa atenuant el xoc endotòxic i disminuint la inflamació estèril després d'un dany tissular, en models animals ^{70,71}.

Per tant, GAS6 podria disminuir la inflamació mitjançant l'activació de MerTK (encara que no s'ha vist amb Axl ni Tyro3) el que modula la secreció de citoquines, activant una via antiinflamatòria que involucra PI3K/AKT/GSK3 beta i NF-kappaB ⁷².

L'eix Gas6/Axl augmenta paral·lelament a la progressió de la malaltia hepàtica crònica afavorint l'activació de les cèl·lules estrellades i la fibrosi. Els ratolins Knock-

out per AXL, tenen menys activació d'aquestes cèl·lules i menys fibrosi després d'una lesió hepàtica. Aquestes troballes suggereixen que aquest sistema podria representar una diana terapèutica en maneig de la fibrosi ⁷³, i, demostren que el complex GAS6-TAM juga un paper en la inflamació i cicatrització després d'un dany tissular (*figura 2*).

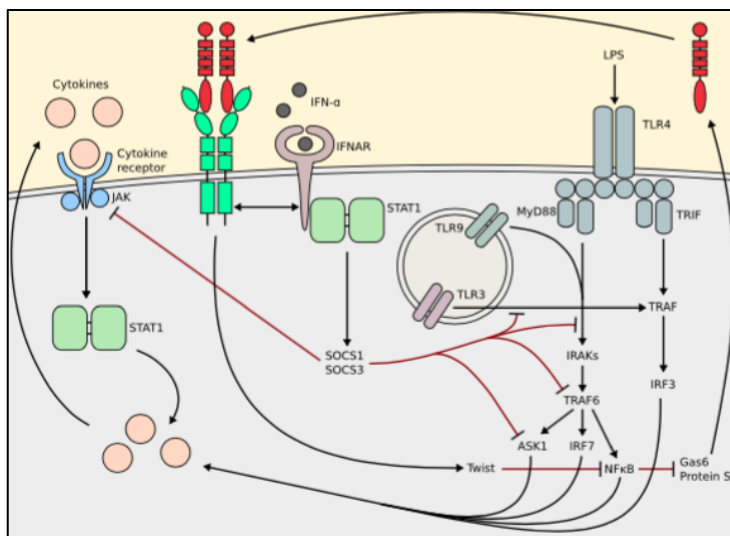
En humans, sembla que les concentracions plasmàtiques de GAS6 es correlacionen de forma positiva amb la severitat de la malaltia en la pancreatitis aguda, estant més elevades en aquells pacients amb disfunció multiorgànica. S'ha hipotetitzat que l'elevació de GAS6 podria reflexar anomalies en la microcirculació i fagocitosi de les cèl·lules mortes ⁷⁴. S'ha vist també que les concentracions plasmàtiques de GAS6 estan elevades en la sepsis i que tenen implicació pronòstica ⁷⁵.

GAS6 i la proteïna S, s'uneixen a la superfície de les cèl·lules apoptòtiques i, al mateix temps, interactuen directament amb receptors TAM expressats en la superfície dels macròfags, afavorint la fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques i els debris. El sistema GAS6-TAM sembla interaccionar i cooperar amb altres xarxes fagocítiques incloent sistemes basats en integrines o receptors scavenger, i podria servir com a integrador d'aquests sistemes ⁷⁶.

L'eliminació de les cèl·lules apoptòtiques (esferocitosi) és un procés clau en la resolució de la inflamació i reparació tissular ⁷⁷. Sembla ser que la fagocitosi d'aquestes cèl·lules estaria determinada principalment per MerTK en condicions basals i per Axl en situacions d'inflamació ⁷⁸. MerTK és un dels principals receptors pro-apoptòtics en la superfície dels fagòcits i s'expressa principalment en els macròfags M2c amb un fenotip antiinflamatori. Les deficiències d'aquest sistema s'han associat a malalties inflamatòries cròniques, aterosclerosi, degeneració retiniana i a malalties autoimmunes (p ex, l'expressió de GAS6 i els receptors TAM està disminuïda en la psoriasi). Per altra banda,

una sobre expressió d'aquestes proteïnes es correlaciona amb un pitjor pronòstic en determinats càncers ⁷⁹⁻⁸³.

Figura 2. Efectes dels receptors TAM en la inflamació (adaptat de van der Meer et al, *Blood* 123, 2460-9 (2014)).



L'interferó alfa (IFN-α) induïx l'expressió dels receptors TAM. La senyalització TAM usurpa la via IFNAR/STAT1 per inhibir la senyalització TLR i JAK via SOCS1 i SOCS3.

L'activació TAM induïx Twist, que suprimeix la transcripció de proteïnes pro inflamàtores dependent de NF-κB. A la vegada, NF-κB inhibeix l'expressió de GAS6 i proteïna S.

(ASK, apoptosis signal-regulating kinase; IRAK, interleukin-1 receptor- associated kinase; IRF, interferon regulatory factor; JAK, Janus kinase; MyD88, myeloid differentiation primary response gene 88; TRAF, TNF receptor-associated factor; TRIF, TIR domain-containing adapter-inducing IFN-β; STAT, Signal Transduction and Activators of Transcription Factors; SOCS Suppressors of Cytokine Signalling)

Els receptors TAM estan expressats amb major o menor intensitat depenent del tipus cel·lular, essent sAXL el que predomina a nivell cardíac. Aquests receptors tenen propietats senyalitzadores en el creixement cel·lular i la inhibició de la apoptosi ^{64,84,85}. Per exemple, estudis in vitro mostren que el tractament de les cèl·lules musculars llises vasculares amb 100 µg/L de GAS6 disminueix de manera significativa el seu nivell d'apoptosi, mitjançant la via AxL-fosfaditilinositol 3 quinasa ⁸⁵. En aquesta mateixa línia,

s'ha vist que Tyro3, Axl i MertK, estan expressats de manera anòmala en múltiples neoplàsies hematològiques i epitelials, i que indueixen la supervivència cel·lular, la resistència a la quimioteràpia i augmenten la motilitat cel·lular. Per tant, la seva inhibició podria estimular la immunitat antitumoral, reduir la supervivència cel·lular i potenciar la resposta a la quimioteràpia disminuint el potencial metastàtic en determinats càncers ⁸⁶.

Per tant, dos processos regulats per TAM que podrien contribuir a la homeòstasi immune disminuint la inflamació en la fase aguda de la lesió tissular són la regulació negativa de la immunitat innata atenuant la transcripció de proteïnes pro inflamatòries i la fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques i els debris cel·lulars. A més llarg termini sembla que podria jugar un paper en la modulació de la inflamació i la cicatrització. Per aquest motiu, és d'esperar que el sistema GAS6-TAM jugui també un paper important en la inflamació i cicatrització miocàrdica després de l'infart, tant en la fase aguda modulant la inflamació com en la fase crònica en la formació de fibrosi.

Els nivells circulants de la part soluble dels receptors TAM poden detectar-se i mesurar-se en sang formant un complex estable amb el seu lligam GAS6, degut a l'efecte proteolític de les Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing proteases (ADAMs) ⁸⁷.

1.4- GAS6-TAM en patologia cardíaca

Fins a dia d'avui, molts pocs estudis s'han centrat en la importància de GAS6-TAM en la patologia cardíaca. S'ha vist que GAS6 sembla actuar com a factor de creixement dels fibroblasts cardíacs en estudis animals, estimulants el creixement i la supervivència dels mateixos en ratolins Knock-out per GAS6. Aquests efectes eren neutralitzats per anticossos anti-GAS6, i no tenien lloc en cèl·lules tractades amb warfarina al ser el producte de GAS6, una proteïna dependent de vitamina K⁸⁸. Per altra banda, MerTk està especialment involucrat en l'esferocitosi de les cèl·lules apoptòtiques i les deficiències d'aquesta proteïna en models animals augmenten la grandària de l'infart, i condueixen a endarrerir la resolució de la inflamació i empitjorar la funció sistòlica⁸⁹.

Estudis en humans han mostrat una relació entre el sistema GAS6-TAM i la insuficiència cardíaca. Un estudi recent va evidenciar que l'expressió proteica de AXL està augmentada significativament (6 vegades) en el miocardi de pacients amb insuficiència cardíaca terminal respecte a un grup control format per donants sans. També es va observar un augment significatiu dels nivells circulants de AXL (sAXL) al sèrum en una sèrie de 192 pacients amb insuficiència cardíaca en comparació amb un grup control de persones sanes. A més, aquest estudi va mostrar que els nivells de sAXL augmentaven progressivament en funció de la severitat clínica de la insuficiència cardíaca (classe funcional segons la NYHA). A part de que es va observar una correlació lleugera entre sAXL i els nivells de BNP, els pacients amb valors alts de sAXL (per sobre del tercer quartil) presentaven una major probabilitat d'esdeveniments cardíacs adversos (principalment mortalitat per causa cardíaca o necessitat de trasplantament, però també d'ingressos per insuficiència cardíaca) en comparació als pacients que només tenien BNP significativament elevats⁹⁰ (**Figura 3**).

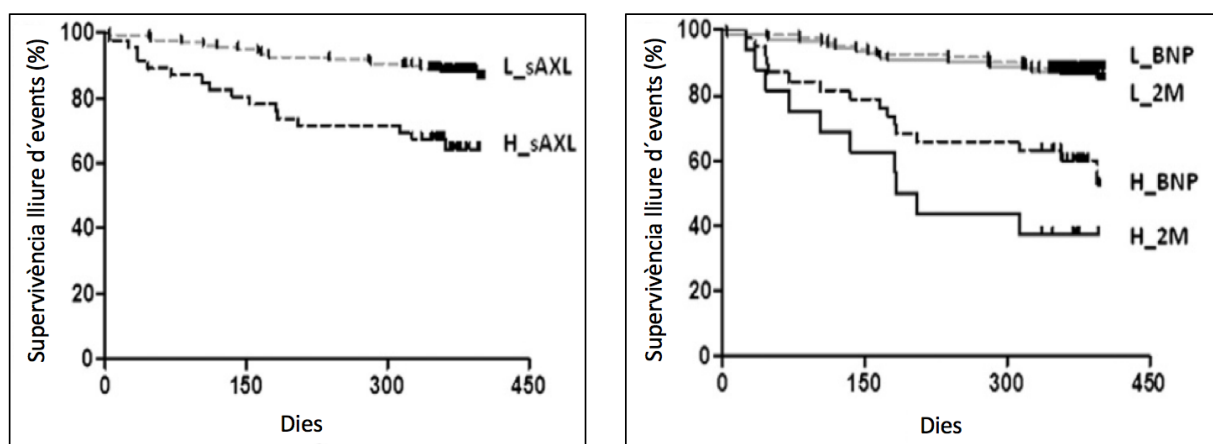


Figura 3. Adaptat de Batlle et al. *Int. J. Cardiol.* 173, 402–9 (2014). Supervivència lliure d'events segons nivells per sobre (H_) o per sota (L_) del tercer quartil de sAXL, BNP o de BNP+sAXL (2M).

En un treball del mateix grup, seguint aquests individus amb insuficiència cardíaca (n=192) durant 3.6 anys, i valorant el valor pronòstic de diferents marcadors, es va veure que els nivells de sAXL -també els de BNP, hs-TnT (troponina T ultrasensible) i CICP (C-terminal propeptide of type I procollagen)- eren indicadors d'esdeveniments adversos. A més es va confirmar que la combinació de BNP i sAXL tenia un valor predictiu superior a l'observat únicament amb BNP. Tant BNP, sAXL i la classe funcional (NYHA) eren factors de risc independents per esdeveniments clínics ⁹¹.

No existeix evidència prèvia del paper que pugui tenir el complex GAS6-TAM més específicament en el context de l'infart agut de miocardi. Un únic estudi publicat en una mostra petita de pacients, va mostrar que els nivells de sAXL estaven augmentats en la fase aguda de l'infart en humans (primeres 24 hores de l'ingrés), però no es va estudiar la seva relació amb la funció o el remodelat ventricular durant el seguiment, ni es van determinar els nivells de GAS6 ⁹².

Com s'ha esmentat prèviament, degut al paper de GAS6-TAM en la modulació de la inflamació i el desenvolupament de fibrosi en el procés de cicatrització, podria tenir un paper clau en el remodelat ventricular post-infart i el desenvolupament de insuficiència cardíaca. No hi ha dades publicades en aquest aspecte en humans.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2.- HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Les dues principals hipòtesis d'aquesta tesi són:

1. Confirmar si els nivells de sAXL, un dels receptors que conformen el sistema TAM, i del seu lligam GAS6 estan augmentats en la fase aguda i en el seguiment a mig termini després d'un SCAEST.
2. Les observacions prèvies mostren un augment en la expressió de AXL en el teixit miocàrdic i en el sèrum que és proporcional a la severitat dels símptomes en els pacients amb insuficiència cardíaca de múltiples etiologies. En la mateixa línia, els nivells de AXL i GAS6 en el sèrum després del SCAEST estarien associats al desenvolupament d'insuficiència cardíaca i remodelat ventricular advers que, almenys parcialment podria estar condicionat per un augment de la fibrosi intersticial del miocardi remot.

Objectius específics:

Hipòtesi 1

- Objectiu 1. Mesurar els nivells sèrics de dos dels components de GAS6-TAM (GAS6 i sAXL) per determinar si estan augmentats en la fase aguda i als 6 mesos post-infart agut de miocardi amb elevació del segment ST comparats amb un grup control.

Hipòtesi 2

- Objectiu 2. Determinar si els nivells sèrics de GAS6 i sAXL es correlacionen amb el desenvolupament d'insuficiència cardíaca avaluada clínicament i mitjançant la determinació del BNP.
- Objectiu 3. Estudiar si els nivells de GAS6 i sAXL permeten predir l'aparició de remodelat ventricular advers, avaluat mitjançant paràmetres de ressonància magnètica cardíaca realitzada durant la primera setmana del SCAEST i als 6 mesos de seguiment, així com l'ocurrència d'esdeveniments clínics durant el seguiment.
- Objectiu 4. Esbrinar si hi ha associació entre l'expansió del volum extracel·lular miocàrdic al miocardi remot no infartat, mitjançant tècniques de mapeig T1 com mesura de la presència de fibrosi intersticial difusa, i el desenvolupament de remodelat advers ventricular de forma genèrica.
- Objectiu 5. Investigar la relació de sAXL i GAS6 després del SCAEST i la progressió de la fibrosi intersticial difusa, com a possible mecanisme involucrat en el remodelat ventricular.

MATERIAL I MÈTODES

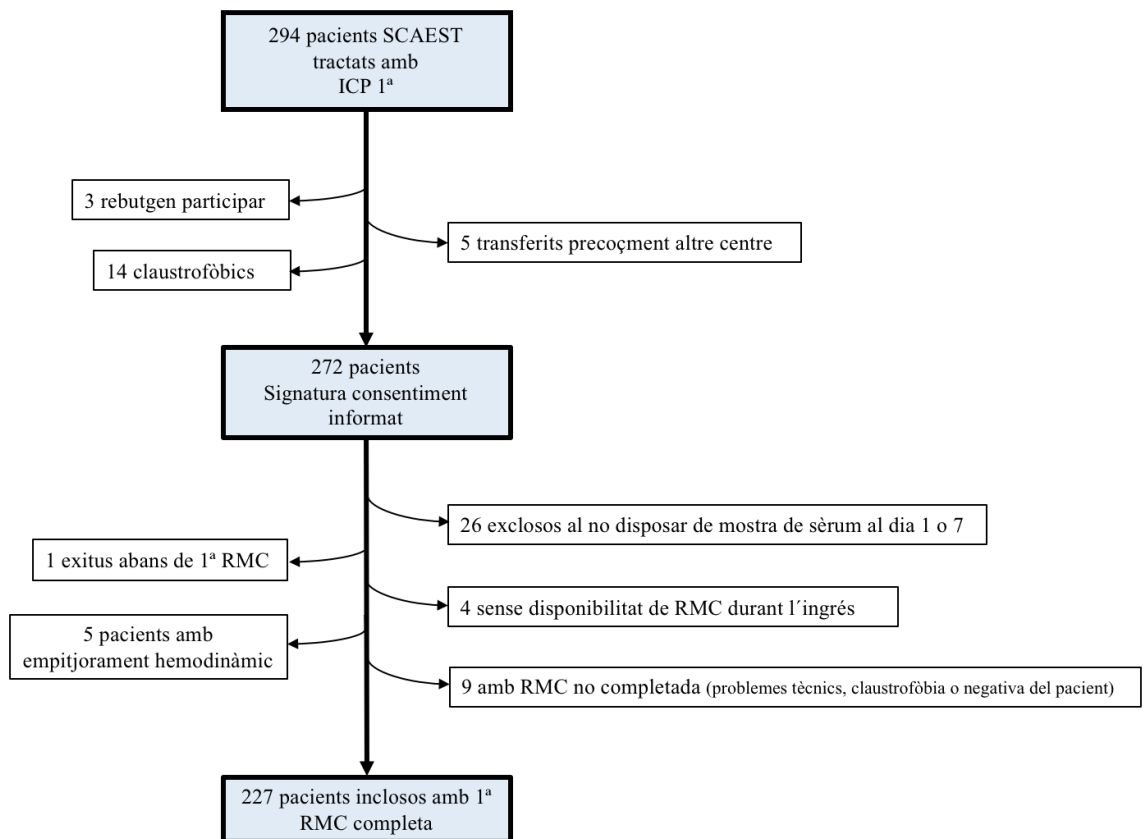
3.- MATERIAL I MÈTODES

3.1- Població de l'estudi

Es van estudiar 227 pacients admesos a la Unitat de Cures Cardíacques Agudes amb un primer SCAEST, sotmesos a angioplàstia primària. Els pacients eren inclosos a l'estudi si es presentaven amb dolor toràcic típic de més de 30 min de duració i tenien elevació del segment ST en al menys 2 derivacions contigües de ≥ 0.2 mV en les derivacions V2-V3 o ≥ 0.1 mV en altres derivacions o sospita d'infart posterior. En tots el casos es va confirmar després de l'angioplàstia l'augment de troponina per sobre del llindar necessari per confirmar el diagnòstic ¹⁰. El tractament amb IECAs (captopril o enalapril a una dosi d'almenys 6.25 mg/8 h o 2.5 mg/12h, respectivament) i beta-bloquejants (bisoprolol o carvedilol a una dosi d'almenys 1,25 mg/12 hs o 3,125 mg/12 hs, respectivament) es va iniciar precoçment (<24 hs) a criteri mèdic i en absència de contraindicacions. A més, els pacients amb fracció d'ejecció del ventricle esquerre (FEVE) estimada per ecocardiografia $\leq 35\%$ varen ser tractats amb espirolactona o eplerenona (25 mg/24 hs). La determinació de troponina sèrica va ser mesurada durant 48 hores, cada 6h durant les primeres 12 hores i cada 12 hores posteriorment. A més, es van mesurar els nivells sèrics de peptid natriurètic (BNP), dins les primeres 48 hores de l'ingrés. Els individus amb inestabilitat hemodinàmica o alguna contraindicació per sotmetre's a una ressonància cardíaca amb gadolini com els pacients amb insuficiència renal amb filtrat glomerular < 30 ml/min, no es van incloure en el estudi. Per altra banda, els pacients amb malalties fibròtiques concomitants, com cirrosi hepàtica, fibrosis pulmonar, o qualsevol malaltia inflamatòria o autoimmune crònica, tanmateix com els pacient amb neoplàsies actives van ser exclosos. Un total de 294 pacients es van

contemplar per al protocol, dels quals 67 van ser exclosos per alguna de les raons esmentades (*figura 4*).

Figura 4. Diagrama amb la mostra inicial contemplada per l'estudi i les raons d'exclusió.



3.2- Extracció de les mostres

Una mostra de sang es va extreure de cada participant en el 1er dia post-infart, un altre al 7è dia post-infart i una tercera mostra als 6 mesos. Com a control es van utilitzar mostres de 20 individus sans, ajustats per sexe, edat i factors de risc cardiovascular clàssics amb la població del estudi. Els controls van ser obtinguts d'una consulta externa

de cardiologia. En tots els controls es va descartar, mitjançant entrevista dirigida, la realització d'un electrocardiograma i una exploració física completa, l'existència de patologia cardíaca prèvia.

Una vegada extretes, les mostres es van posar en gel i es van centrifugar a 1800 RCF g (Relative Centrifugal Force) durant 10 min a 4° C. Es va recollir el sobrenedant i es va conservar en alíquotes a -80 ° C fins a la seva anàlisi.

3.3- Determinació de sAXL i GAS6

Per tal de determinar les concentracions de sAXL i GAS6 es va utilitzar un mètode ELISA ⁹³.

sAXL

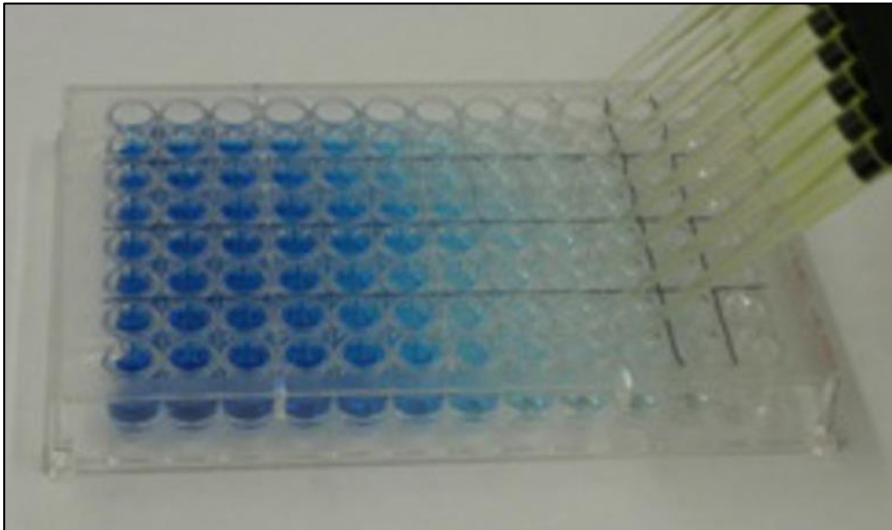
- Es van utilitzar plaques de múltiples pous (96 pous) (**figura 5**), recobrint-los amb l'anticòs de captura AF154 (R & D Systems) a una concentració de 2,0 g / ml en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mm, pH 7,2). Les plaques es segellaven i es deixaven durant la nit a temperatura ambient. Posteriorment es rentaven tres vegades amb tampó de rentat (PBS amb 0,05% de Tween 20) i després es bloquejaven durant 1 h amb PBS que conté 1% de BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma). Les mostres de sèrum es diluïen 40 vegades en PBS. Es feia una corba estàndard per dilució en sèrie d'una proteïna sAXL purificada produïda mitjançant l'expressió recombinant de la part extracel·lular de AXL (R & D Systems). Les concentracions es donen com ng/ml. S'utilitzava un control negatiu sense mostra de plasma i mostres de plasma d'un control sa per a la realització de la recta patró.

Després de l'addició de la mostra, les plaques es rentaven tres vegades amb tampó de rentat (PBS amb 0,05% de Tween 20). Llavors, s'afegien 100 µl de la BAF154, diluïda en PBS que conté 1% de BSA a una concentració de 50 ng/ml i s'incubaven 2h a temperatura ambient. Els passos d'aspiració/rentat es repetien i s'afegien 100 µl de la dilució de treball de estreptavidina-HRP (Sigma) a cada pouet. La placa es cobria i s'incubava durant 20 min a temperatura ambient. Els passos d'aspiració / rentat es repetien i s'afegia una solució de tetrametil-benzidina (Sigma). La reacció s'aturava amb àcid sulfúric a una concentració d'1 M. L'absorbància dels pouets es determinava amb un lector de plaques automàtic a 450 nm.

GAS6

Per la determinació de GAS6, es va repetir la mateixa tècnica per a cada mostra, utilitzant com a anticòs de captura AF885 i com a anticòs de detecció BAF885, també obtinguts de R&D Systems. Les mostres es diluïen 40 vegades i es repetien els passos de ELISA utilitzant la mateixa seqüència que la descrita prèviament ⁹³.

Figura 5. Model de placa de 96 pouets per ELISA, utilitzada per a la mesura de GAS6 i sAXL.



3.4- Ressonància magnètica cardíaca

Un estudi amb ressonància magnètica cardíaca es va fer a cada pacient durant l'ingrés i als 6 mesos de l'esdeveniment coronari. Es va utilitzar un aparell de 1.5 T o 3T (SIEMENS, Erlangen, Germany), o Signa CV HDX-t, (General Electric, Wisconsin, EEUU), equipat amb un software cardíac. La funció ventricular esquerra es va determinar utilitzant una seqüència de cine convencional SSFP (steady-state free-precession cine) en talls seqüencials de 10 mm sense gap entre la base i l'apex, per aconseguir una cobertura completa del ventricle esquerre. Les imatges de realç tardà es van adquirir de 10 a 15 minuts després de l'administració intravenosa de gadodiamida-DTPA (Omniscan®, Amersham Health, Madrid) o Gadobutrol (Gadovist®, Bayer Hispania, Barcelona, Spain) a una dosi de 0.2 mmol/Kg utilitzant una seqüència segmentada de eco-gradient d'inversió-recuperació (GEIR o Turbo-FLASH). El temps d'inversió es va ajustar per anular el miocardi normal, típicament entre 180 i 320 ms. El tamany de la matriu es va

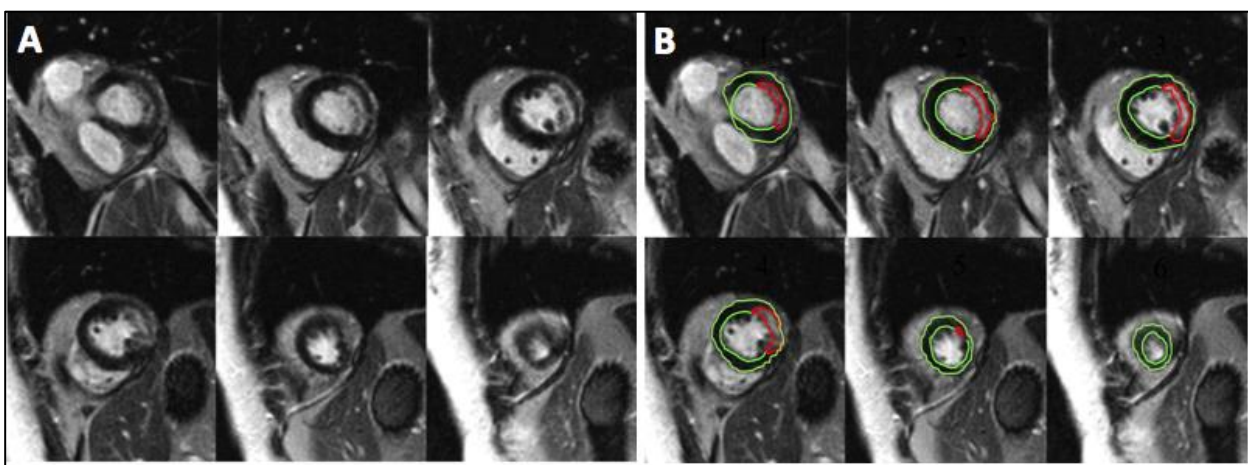
establir a 256 i el camp mig de visió a 360 mm, resultant en un tamany de voxel de 1.4 per 1.4 per 10 mm i un volum del voxel de 11,8 mm³. Els paràmetres típics d'imatge utilitzats foren els següents: temps de repetició de 800 ms; Temps d'eco 2 ms; angle d'inclinació de 20°; Amplària de banda 140 Hz/px; 35-40 línies de l'espai K emplenades cada dos batecs. Adquisició en paral·lel amb factor de processament GRAPPA x 2. Els estudis de funció basal i de seguiment per a cada subjecte van ser comparats simultàniament, amb especial atenció als talls basals per assegurar la comparabilitat dels estudis.

Els contorns endocàrdics i epicàrdics es van traçar manualment en talls seqüencials en eix curt en les seqüències de cine per tal de determinar els diàmetres telesistòlic (DTSVE) i telediastòlic (DTDVE) del ventricle esquerre i la FEVE utilitzant el software Argus ® (SIEMENS, Erlangen, Germany). Per mesurar la grandària de l'infart, es va utilitzar una eina de segmentació de desenvolupament propi (TCTK®) en l'entorn de la plataforma MATLAB (The MathWorks, Natick, Massachusetts) ⁹⁴. Inicialment, els contorns endocàrdics i epicàrdics es van traçar manualment en l'eix curt amb contrast. Un observador experimentat va traçar el miocardi hiperintens, i aquelles àrees es van processar amb un algoritme per definir el miocardi infartat d'acord amb el criteri de la meitat de la màxima intensitat de píxel. Breument, un histograma de les intensitats de píxel es va crear per la totalitat de la regió d'interès. Posteriorment, el software identifica la màxima intensitat de píxel. L'extensió final de l'infart es defineix automàticament com aquells píxels amb una intensitat de senyal superior al 50% del màxim a la regió inicial. Les àrees infartades es van sumar i posteriorment es van dividir pel total de la paret ventricular esquerra per calcular el tamany de l'infart com a percentatge de la totalitat del ventricle esquerre (*figura 6*).

La obstrucció microvascular (OM), es va definir com a qualsevol àrea de hipointensitat en el realç tardà, envoltada per una zona de hiperintensitat, i es va incloure també en el tamany de l'infart. Un índex d'obstrucció microvascular es va definir sumant tots els segments amb OM, d'acord amb el model recomanat de 17 segments.

El remodelat ventricular, es va definir com un augment del 20% en el volum telediastòlic del VE (VTDVE) entre la ressonància durant l'ingrés i la realitzada als 6 mesos ¹¹.

Figura 6. Mètode pel càlcul del tamany de l'infart. A: imatge de ressonància cardíaca en l'eix curt on es veu captació de contrast en zona anterolateral. B: Traçat dels contorns epicàrdic i endocàrdic i de la zona hiperintensa (necròtica) per calcular el percentatge de ventricle infartat.



Càlcul del volum extracel·lular

El temps de relaxació T1 és una qualitat dels teixits que depèn de la rapidesa en que els seus protons reequilibren els spins després de ser excitats amb un pols de radiofreqüència. Depèn, entre altres coses, del contingut de molècules d'aigua en la seva

composició. El T1 natiu és una mesura inherent a cada teixit. El càlcul del valor de T1 natiu no requereix la utilització de contrast paramagnètic i això aporta un avantatge diagnòstic en pacients amb contraindicacions per l'ús de gadolini. Per altra banda, el seu valor pot variar segons l'equip utilitzat, la seqüència i el camp magnètic, i a més està sota la influència de la freqüència cardíaca, edat i el sexe ⁹⁵. El valor de T1 natiu del miocardi augmenta amb la fibrosi, l'edema i la amiloïdosi i es redueix en altres circumstàncies com l'acumulació de lípids o el dipòsits de ferro ⁹⁶. Un mapa de T1 seria una imatge paramètrica a on la intensitat de senyal de cada voxel és directament proporcional al temps T1.

La majoria de contrastos a base de gadolini són composts extracel·lulars, és a dir que es distribueixen entre els compartiments intravascular i intersticial, però no a l'espai intracel·lular en situacions d'indemnitat de la membrana cel·lular. Per tant, el T1 postcontrast augmentat reflexarà l'increment de l'espai intracel·lular (en el cas de l'infart agut per pèrdua de la integritat de la membrana cel·lular) o una expansió de l'espai intersticial (indicador indirecte de la fibrosi intersticial). Les zones fibròtiques o on hi ha expansió de l'espai intersticial, tindran una major acumulació de contrast secundari a l'increment del volum de distribució i pel fet afegit que aquestes àrees presenten una cinètica de rentat de gadolini més retardada, i per tant exhibeixen un temps de relaxació més curt. No obstant, el T1 postcontrast també té limitacions i ha perdut popularitat ja que és dependent del temps transcorregut després de l'administració de gadolini, la dosi, la funció renal i l'aclariment de contrast, la freqüència cardíaca o de l'hematòcrit ⁹⁷. Per aquest motiu, el que actualment té més interès és el càlcul del volum extracel·lular (VEC) comparant els mapes de T1 natiu i el post contrast. El VEC és un paràmetre que representa la fracció d'espai ocupada per la matriu extracel·lular en un volum de teixit (volum del píxel). Es pot calcular coneixent el canvi en el valor de T1 en la sang i en el miocardi

abans i passats uns 15 minuts de l'administració de contrast a dosi de 0,15-0,2 mmol/kg. Assumint que la constant de difusió del gadolini entre la sang i el miocardi és més ràpida que l'eliminació renal, s'ha vist que després del bolus d'aquesta quantitat de gadolini s'aconsegueix un equilibri dinàmic entre tots dos compartiments que es manté dels 15 als 50 minuts després de la injecció ^{98,99}. Coneixent el valor de hematòcrit es pot calcular el volum de distribució del gadolini en la sang (1- hematòcrit) i fàcilment es pot calcular el VEC del miocardi d'acord a la següent fórmula,

$$VEC \text{ miocardi} = (1 - \text{hematòcrit}) \times R1\text{miocardi} / R1\text{sang},$$

On R1miocardi és (1/T1miocardi precontrast - 1/T1miocardi poscontrast) i R1sang és (1/T1sang precontrast - 1/T1sang poscontrast).

A la fase aguda de l'infart el VEC estaria determinat per la suma de l'espai intracel·lular, la matriu intersticial i l'espai intravascular i, com al T1 postcontrast, se'l considera un indicador indirecte de la fibrosi intersticial, validat histològicament, però menys sensible als factors de confusió ^{100,101}. Alguns autors han proposat que el càlcul del VEC en la fase aguda en una zona infartada, podria donar una mesura més acurada de la grandària de l'infart que la captació tardana de gadolini ¹⁰². En la mateixa línia, la determinació del VEC en la zona isquèmica a la fase aguda (2 dies post infart) ha mostrat utilitat pronòstica, essent els valors de VEC < 0.5, predictors de millora de la motilitat segmentària als 3 mesos ¹⁰³. Aquests avantatges que tindria el càlcul del VEC en la fase aguda del SCAEST serien atribuïbles a la capacitat d'aquest paràmetre per distingir entre el miocardi necròtic, que evolucionarà a teixit cicatricial no funcional i el dany miocàrdic predominantment per edema amb capacitats per la recuperació funcional.

El VEC representa la fracció de volum de miocardi que no està ocupat per cèl·lules, que es correlaciona amb la fracció de volum de col·lagen. El VEC dels individus sans oscil·la entre 24-28% i és independent de l'equip de ressonància utilitzat (*taula 2*).

Taula 2. Temps de T1 natiu i VEC en persones sanes, en estudis en seqüència MOLLI en diferents induccions magnètiques.

ESTUDI	EQUIP DE RMC	T1 natiu (ms)	VEC (%)
Dabir et al (2014)	1,5 T (n 30)	950 ± 21	25 ± 4
	3 T (n 32)	1052 ± 23	26 ± 4
Luetkens et al. (2016)	1,5 T (n 50)	967 ± 28	27,7 ± 5,8
Kellman et al. (2015)	1,5 T (n 62)	965 ± 35	25,4 ± 2,5
Puntmann et al. (2013)	3 T (n 30)	1070 ± 55	27 ± 9

Pel càlcul dels mapes de T1, es trasllada mitjançant un co-registre de les imatges píxel a píxel, el temps de relaxació (mesurat en milisegons) i s'aplica una escala de colors per facilitar l'anàlisi visual. Les zones on s'acumula contrast (per exemple, per fibrosi focal o difusa) tindran un temps de relaxació més curt que el miocardi normal ¹⁰⁴.

Per determinar el T1 natiu i el VEC es van analitzar 3 regions d'interès, lluny de la zona infartada (zona de realç tardà de gadolini), evitant incloure grassa epicàrdica i cavitat ventricular. Es van usar seqüències MOLLI (Modified Look-Locker inversion recovery), que permeten l'adquisició d'imatges en una sola apnea i en la mateixa fase del cicle cardíac ¹⁰⁵.

Es va determinar el T1 basal i 20-25 minuts després de l'administració de contrast (bolus de 0,2 mmol/kg) pel càlcul del VEC. Es va fer la mitja de les tres determinacions

per millorar la fiabilitat i reproductibilitat. Les regions d'interès es van seleccionar als segments basals i mig ventricular, intentant les menors variacions possibles de localització tant intra-individu com inter- individu, ja que sembla que els valors de T1 poden variar segons la regió miocàrdica (Maceira et al. SEC 2015; Abstract 4007-4 - Valores de referencia globales y segmentarios de mapeo de T1 con secuencias molli y shmoli en cardiorresonancia magnética de 1.5T para uso clínico).

Des de gener 2014, quan vam tenir disponibles les seqüències MOLLI per l'adquisició de les imatges i un cop s'havia validat l'adquisició dels mapes de T1 als 15 minuts després de l'administració de gadolini com a tècnica per al càlcul de VEC⁹⁸, es va iniciar la mesura sistemàtica en els nostres pacients. Des de llavors, s'ha realitzat la determinació de VEC en el miocardi remot als 6 mesos del SCAEST en un total de 51 pacients. D'entre ells, els últims 33 pacients inclosos disposen a més del càlcul de VEC en el miocardi no infartat en la fase aguda (**figura 7**).

Figura 7. Seqüència per al càlcul del VEC en dos pacients, on s'evidencia el realç tardà de gadolini (A) en un infart antero-septal (fig. 7.1) i un infart inferior (fig. 7.2). Es calculen els valors de T1 pre i post administració de contrast a nivell basal ventricular (B) i a nivell mig ventricular (C), en zones allunyades de l'infart. Es calcula també el valor de T1 de la sang. Posteriorment, amb la fórmula “ $(1 - \text{hematòcrit}) \times R1_{\text{miocardi}} / R1_{\text{sang}}$ ” s'obté el VEC del miocardi.

Fig. 7.1

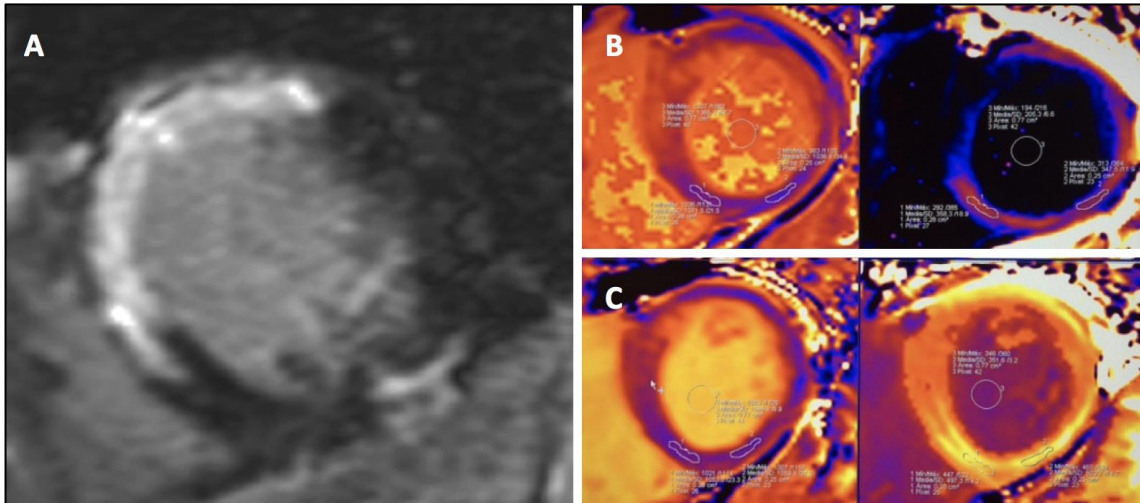
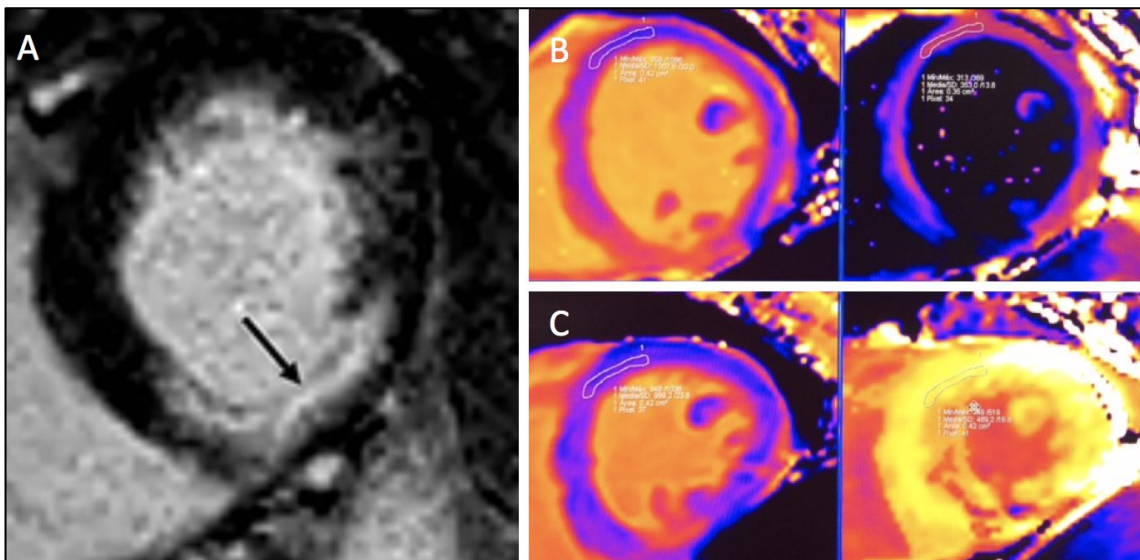


Fig. 7.2



3.5- Dades clíniques

De cada participant es van registrar dades demogràfiques (edat, sexe), clíniques (factors de risc cardiovascular, freqüència cardíaca a l'ingrés, pressió arterial sistòlica i diastòlica, localització de l'infart, número de vasos afectats, presència de calcificació coronària, tractament al alta) fent especial esment als signes de congestió durant l'ingrés, utilitzant la classificació de Killip (*taula 3*). Es van determinar a cada pacient marcadors analítics com el nivell de troponina I, creatin kinasa-MB, BNP, creatinina màxima i hemoglobina glicosilada. Es van determinar també marcadors inflamatoris com la proteïna C reactiva (PCR), recompte de monòcits, neutròfils i galectina-3 (proteïna relacionada amb inflamació i fibrosi i possiblement amb el remodelat ventricular ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸).

Taula 3. Classificació de Killip en funció dels signes d'insuficiència cardíaca en pacients amb infart de miocardi. Descrita en 1967 per Killip i Kimball.

Classe I	No evidència d'insuficiència cardíaca
Classe II	Troballes compatibles amb insuficiència cardíaca lleugera-moderada (3r soroll, crepitants < 1/2 inferior, elevació pressió venosa central)
Classe III	Edema pulmonar
Classe IV	Xoc cardiogènic definit com pressió arterial sistòlica < 90 mmHg (i/o necessitat de fàrmacs inotrops) i signes d'hipoperfusió (oligúria, cianosi)

3.6- Seguiment clínic

Els pacients es van seguir durant una mitja de 79 ± 49 mesos, mitjançant contacte telefònic i consulta de la història clínica informatitzada per determinar mortalitat total i cardiovascular, infarts, noves revascularitzacions, necessitat de trasplantament cardíac o ingressos per insuficiència cardíaca.

3.7- Anàlisis estadístics

Les variables contínues estan expressades com mitja \pm desviacions estàndard i les categòriques com percentatges. El test de Shapiro-Wilk va confirmar que tant els nivells de sAXL com de GAS6 no seguien una distribució normal en cap dels moments d'extracció. Per tant, els canvis individuals es van mesurar utilitzant un test de Wilcoxon per dades aparellades i les diferències entre grups, mitjançant el test de U de Mann-Whitney per mostres independents. Les correlacions entre els valors de sAXL i de GAS6 i els paràmetres quantitius derivats de l'estudi amb ressonància o anàlisis sanguinis, es van fer mitjançant tests de Rho de Spearman. La influència del grau de Killip i els canvis de sAXL i GAS6 es van avaluar mitjançant el test de ANOVA.

En els 51 pacients dels que es disposava de VEC als 6 mesos de seguiment, es va fer una categorització binària de la variable VEC ($\geq 28,5\%$ vs $< 28,5\%$), d'acord a un estudi prèviament publicat, que va mostrar la utilitat d'aquest valor de tall per la predicció de la mortalitat cardiovascular a curt termini ¹⁰⁹. Les diferències en la distribució dels valors de BNP, tamany de l'infart i dels valors de GAS6 i sAXL entre ambdós grups es van determinar amb el test U-Mann Withney. Per tal de fer els anàlisis estadístics es va

utilitzar el software Stata 14.2 per Windows i SPSS IBM v.20 per sistemes OS. Es van considerar significatives les diferències amb valors de $p < 0.05$.

RESULTATS

4.- RESULTATS

L'edat mitja dels malalts era de 59 ± 12 anys, amb un predomini d'homes (84%). La localització de l'infart era anterior en un 43% dels casos i la majoria (81%) no tenia signes de congestió (Killip I). Respecte al grup control, no hi havia diferències significatives en relació a edat, sexe ni principals factors de risc clàssics. Hi havia únicament una major proporció d'individus amb dislipèmia i una tendència a major proporció de diabètics en el grup control (*taula 4*).

Taula 4. Característiques dels pacients inclosos en el protocol i dels controls.

	Controls (n=20)	Pacients amb SCAEST (n=227)	Valor de p
Mitja \pm DE edat (anys)	58 \pm 11	59 \pm 12	0.753
Sexe (% homes)	70 %	84 %	0.121
Tabaquisme actual	45 %	65 %	0.079
Hipertensió	60 %	41 %	0.083
Diabetes mellitus	35 %	18 %	0.058
Dislipèmia	70 %	37 %	0.004

4.1- Relació entre GAS6 i sAXL amb els factors de risc cardiovascular

Estudiant els valors de GAS6 i sAXL en funció de la presència dels factors de risc cardiovascular clàssics, es va evidenciar que els pacients hipertensos tenien majors nivells de GAS6 en el primer dia (21.4 ± 5.8 vs 19.1 ± 5.4 ng/ml; $p=0.003$) i en el dia 7 de l'esdeveniment agut (20.9 ± 6.3 vs 18.6 ± 5.8 ng/ml ; $p=0.012$), encara que la diferència als 6 mesos no era significativa. Els pacients hipertensos presentaven també uns majors

nivells de sAXL en el dia 1 (48.0 ± 11.4 vs 43.6 ± 10.6 ng/ml, $p=0.003$), i la TAS a l'ingrés es correlacionava amb els nivells de Gas6 a la setmana.

Pel que fa a la diabetis mellitus, els pacients diabètics, presentaven majors nivells de sAXL en el dia 1 (49.7 ± 9.7 vs 44.5 ± 11.3 ng/ml $p=0.005$) i dia 7 (54.5 ± 11.3 vs 49.7 ± 11.1 ng/ml; $p=0.020$). Es va veure també una correlació positiva dèbil entre la HbA1C amb GAS6 al primer dia. La presència de tabaquisme actiu s'associava a una disminució dels nivells de sAXL en el dia 1 (44.2 ± 10.2 vs 47.5 ± 12.3 ng/ml; $p=0.032$) i en el dia 7 (49.4 ± 10.6 vs 52.8 ± 12.1 ng/ml; $p=0.044$). Els valors de sAXL ni de GAS6 no foren significativament diferents en funció de la presència de dislipèmia o història familiar de cardiopatia isquèmica precoç (< 55 anys en homes i < 65 anys en dones) (*taula 5*).

Taula 5. Nivells de GAS6 i sAXL en funció dels factors de risc cardiovascular.

	HTA			DLP			DM			TABAC			H ^a FAM		
	SÍ	NO	p	SÍ	NO	p	SÍ	NO	p	SÍ	NO	p	SÍ	NO	p
GAS6 1d	21.4	19.1	0.0034	19.9	20.1	0.8128	21.0	19.8	0.2807	19.6	20.7	0.1767	19.2	20.4	0.1648
GAS6 7d	20.9	18.6	0.0125	18.9	19.9	0.3258	19.5	19.5	0.9543	19.1	20.4	0.1841	19.3	19.7	0.7411
GAS6 6m	21.7	21.7	0.9837	21.9	21.6	0.7488	21.5	21.7	0.8350	21.3	22.3	0.3428	21.9	21.6	0.7774
sAXL 1d	48.0	43.6	0.0037	44.4	46.2	0.2311	49.7	44.5	0.0055	44,2	47.5	0.0326	43.4	46.5	0.0684
sAXL 7d	52.3	49.3	0.0634	50.1	50.1	0.6327	54.5	49.7	0.0206	49.4	52.8	0.0443	50.7	50.6	0.9067
sAXL 6m	57.1	55.8	0.5714	55.7	56.9	0.5705	55.8	56.2	0.7933	55.2	58.4	0.1376	56.2	56.5	0.8838

Tenint en compte només els controls sans ($n=20$) i comparant els nivells de GAS6 i sAXL en aquest població en funció de hipertensió, diabetis i tabaquisme, es manté únicament una diferència estadísticament significativa en els nivells de sAXL en funció

de la hipertensió (nivells més alts en hipertensos) (*taula 6*). S'ha de tenir en compte el reduït tamany de la mostra, amb la qual cosa, és difícil trobar diferències estadísticament significatives en aquest grup.

Taula 6. Controls

	HTA			DM			TABAC		
	SÍ (n=12)	NO (n=8)	p	SÍ (n= 7)	NO (n=13)	p	SÍ (n=9)	NO (n=11)	p
GAS6	22.6 ± 4.1	21.9 ± 4.8	0.7581	22.7 ± 4.2	22.1 ± 4.5	0.7706	23.6 ± 3.4	21.2 ± 4.8	0.176
sAXL	52.2 ± 6.7	43.9 ± 9.8	0.0370	47.4 ± 12.2	49.6 ± 6.9	0.6111	46.9 ± 9.1	50.4 ± 8.8	0.184

Les diferències en els nivells de Gas6 en el primer i setè dia, en funció de la hipertensió en els pacients infartats, es mantenen després d'ajustar amb regressió lineal múltiple, per la presència o no d'insuficiència cardíaca (coef b 2.38, IC 0.79-3.96, p=0.004 pel dia 1; coef b 2.33, IC 0.50-4.15; p=0.013 pel dia 7). El fet de ser hipertens augmentaria en 2.38 i 2.33 ng/ml els nivells mitjos de gas6 al primer i setè dia respectivament. Amb els nivells de sAXL en el primer dia passaria el mateix (coef b 3.97, IC 0.90-7.04; p=0.012), és a dir que el fet de ser hipertens s'associa a un augment en 3.97 ng/ml els nivells de sAXL en el dia 1 (*taula 7*).

Taula 7. Relació entre els nivells de GAS6 en el dia 1 i dia 7 i sAXL en el dia 1 en funció de hipertensió, ajustat per la presència d'insuficiència cardíaca.

Variable	Coefficient B	Int. confiança	Valor de p
GAS6 1d	2.38	0.79-3.96	0.004
GAS6 7d	2.33	0.50-4.15	0.013
sAXL 1d	3.97	0.90-7.4	0.012

4.2- Canvis evolutius a la fase aguda de l'infart i als 6 mesos

No es van evidenciar diferències estadísticament significatives en els nivells de sAXL entre els pacients i els controls en la fase aguda (1^{er} i 7^è dia). Per altra banda, es va objectivar un augment significatiu en els nivells de sAXL durant la fase aguda en els pacients amb SCAEST (45.0 ± 11.3 ng/ml en el 1er dia i 50.8 ± 11.5 ng/ml en el 7è dia, p<0.001). Als 6 mesos els nivells seguien augmentant, i eren significativament més alts que en el grup control (57.2 ± 14.2 vs 48.8 ± 8.9 ng/ml, p=0.011). Per contra, no es van evidenciar canvis significatius en els nivells de GAS6 durant la fase aguda en els pacients (20.4 ± 5.8 ng/ml en el 1er dia, 19.9 ± 5.7 ng/ml en el 7è dia, p=0.794), malgrat que ambdues mesures eren significativament menors que en el grup control (22.3 ± 4.3 ng/ml, p=0.039 i p=0.015 respectivament). No obstant, als 6 mesos, els nivells de GAS6 van augmentar a 21.6 ± 5.7 ng/ml des del dia 7, p=0.001 (*Figura 8 i Taula 8*).

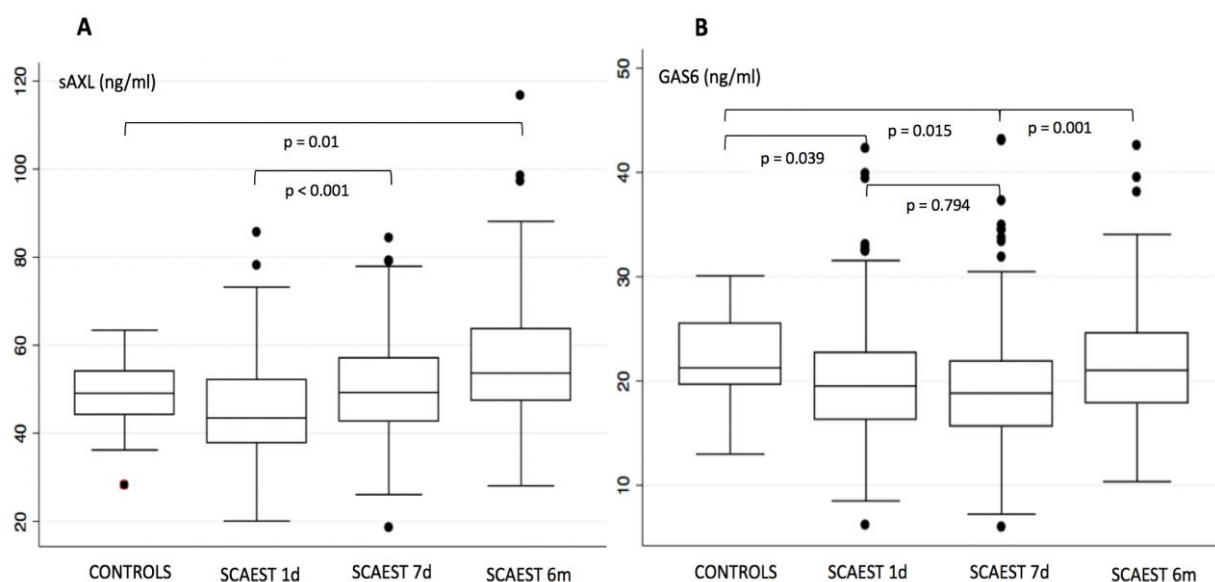


Figura 8. A: els nivells de sAXL augmenten progressivament al llarg de tot el seguiment. Als 6 mesos són significativament majors que en el grup control. **B:** Els nivells de GAS6 són significativament menors en els pacients que en els controls en la fase aguda, i augmenten a partir del 7è dia.

Taula 8. Valors de sAXL i GAS6 en els diferents moments post- infart, expressats com mitja \pm desviació estàndard i rang interquartílic (RIQ= p75-p25). Els valors de p corresponen a les diferències en comparació als controls.

	sAXL (ng/ml)			GAS6 (ng/ml)		
	Dia 1	Dia 7	6 mesos	Dia 1	Dia 7	6 mesos
PACIENTS	45.0 \pm 11.3 RIQ: 51.5- 37.0 p= 0.145	50.8 \pm 11.5 RIQ: 57.2- 42.5 p=0.458	57.2 \pm 14.2 RIQ: 64.8- 47.6 p= 0.011	20.4 \pm 5.8 RIQ: 22.7- 16.3 p= 0.039	19.9 \pm 5.7 RIQ: 57.2 - 42.5 p= 0.015	21.6 \pm 5.7 RIQ: 24.5- 17.8 p=0.659
CONTROLS	48.8 \pm 8.9		RIQ: 54.1- 44.2	22.3 \pm 4.3		RIQ: 25.5- 19.7

Les diferències en els nivells de sAXL entre els controls i els pacients amb SCAEST als 6 mesos, es mantenen si exclouem de l'anàlisi aquells pacients amb signes d'insuficiència cardíaca (48.9 \pm 8.9 vs 56.2 \pm 13.6 ng/ml; p=0.021)

4.3- Insuficiència cardíaca

La majoria de pacients (n=185, 81%), no va desenvolupar signes d'insuficiència cardíaca durant l'ingrés. Un total de 33 individus (14.3%) va presentar congestió lleu (Killip II) i una minoria van ser classificats com Killip III o IV (2 i 7 pacients respectivament).

Donat l'escàs nombre de pacients amb Killip > II (n=9 ; 4%), es va transformar la classificació Killip en variable dicotòmica com absència (Killip I) o presència de congestió (Killip > I). Els pacients que varen desenvolupar insuficiència cardíaca durant l'ingrés (Killip > I, n=42) tenien més freqüentment infarts anteriors, majors nivells de BNP i troponina així com pitjor funció ventricular esquerra, majors volums ventriculars i major ocurrència de remodelat advers durant el seguiment. Els nivells de sAXL dels pacients amb insuficiència cardíaca eren majors al primer dia (48.9 ± 11.9 vs 44.0 ± 10.8 ng /mL; $p=0.047$) i als 6 mesos (63.3 ± 15.4 vs 55.9 ± 13.7 ng /mL; $p=0.011$) en comparació amb els pacients en Killip 1 (*figura 9*). Utilitzant el test de ANOVA per mesures repetides, no es va trobar interacció entre la presència de Killip > I i l'augment progressiu de sAXL en els pacients amb infart. Per altra banda, no es van trobar diferències estadísticament significatives en els valors de GAS6 entre el dos grups en cap moment de l'extracció (*figura 10*). Els nivells de proteïna C reactiva van resultar també majors en el pacients amb insuficiència cardíaca en el primer dia (113.0 ± 107.2 vs. 76.7 ± 175.4 mg/l, $p=0.004$) i en el dia 7 (91.0 ± 110.5 vs. 64.0 ± 161.8 mg/l, $p=0.033$). El recompte de monòcits va ser també major en els pacients amb insuficiència cardíaca en el dia 7 ($1.596 \pm 2.243 \times 10^9/l$ vs. $0.627 \pm 0.597 \times 10^9/l$, $p=0.009$) (*taula 9*).

Taula 9. Valors de les principals variables estudiades en funció de la presència o absència d'insuficiència cardíaca (1d= primer dia; 7d= setè dia; 6m= 6 mesos; Mono= monòcits)

	Killip 1 n=185 (81 %)	Killip > 1 n=42 (19%)	p
Edat (anys)	59 ± 11	58 ± 14	0.571
Sexe (% homes)	83	86	0.676
GAS6 1d (ng/ml)	19.7 ± 5.4	21.2 ± 6.7	0.146
GAS6 7d (ng/ml)	19.6 ± 6.1	19.4 ± 6.1	0.861
GAS6 6m (ng/ml)	21.6 ± 5.7	22.3 ± 7.3	0.602
sAXL 1d (ng/ml)	44.0 ± 10.7	48.9 ± 11.9	0.047
sAXL 7d (ng/ml)	50.3 ± 11.9	53.2 ± 9.2	0.201
sAXL 6m (ng/ml)	55.9 ± 13.7	63.3 ± 15.4	0.011
PCR 1d (ng/ml)	76.7 ± 175.4	113.0 ± 107.2	0.004
PCR 7d (ng/ml)	64.0 ± 161.8	91.0 ± 110.5	0.033
PCR 6 m (ng/ml)	8.3 ± 10.0	14.0 ± 20.0	0.123
Mono 1d (x10 ⁹ /l)	0.60 ± 0.53	0.54 ± 0.22	0.927
Mono 7 d (x10 ⁹ /l)	0.63 ± 0.60	1.57 ± 2.24	0.010
Mono 6 m (x10 ⁹ /l)	0.48 ± 0.30	0.44 ± 0.27	0.717
BNP (pg/ml)	153 ± 127	246 ± 151	< 0.001
TnI (ng/ml)	113 ± 124	283 ± 337	< 0.001
DM (%)	15	29	0.159
Hipertensió (%)	40	43	0.704
Dislipèmia (%)	35	48	0.138
Tabaquisme (%)	64	67	0.757
FEVE a l'ingrés (%)	49 ± 9	41 ± 11	0.004
FEVE als 6 mesos (%)	53 ± 8	49 ± 12	0.106
VTDVE a l'ingrés (ml)	155 ± 36	171 ± 49	0.049
VTDVE als 6 mesos (ml)	159 ± 38	183 ± 65	0.051
Infart cara anterior (%)	38	68	<0.001
Remodelat advers VE (%)	13	35	0.010
Obstrucció microvasc. (%)	37	51	0.11

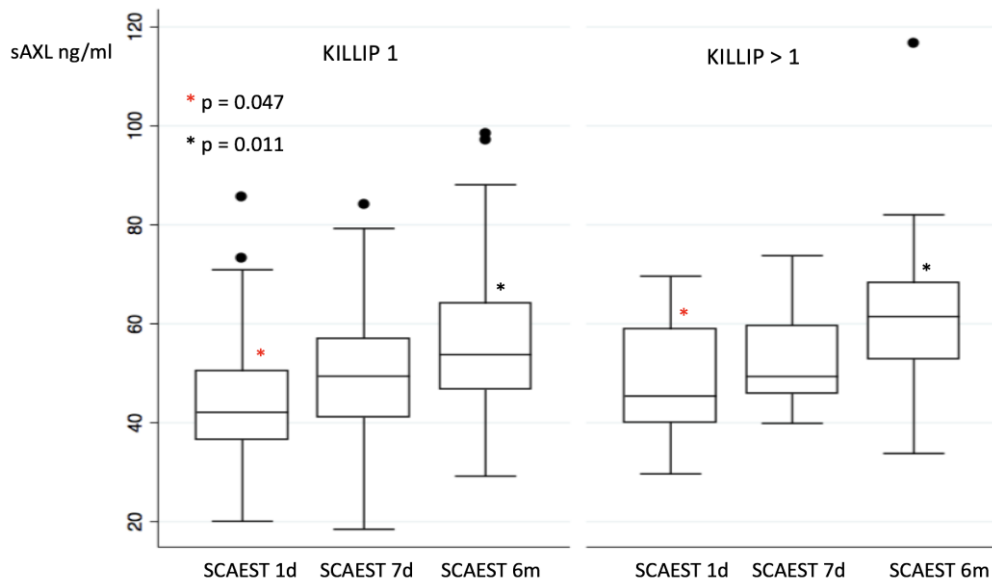


Figura 9. Els nivells de sAXL van ser significativament majors en els pacients amb insuficiència cardíaca tant al dia 1 com al sisè mes post SCA. Malgrat els nivells al 7è dia eren lleugerament majors en els pacients amb Killip >1, les diferències no van resultar estadísticament significatives.

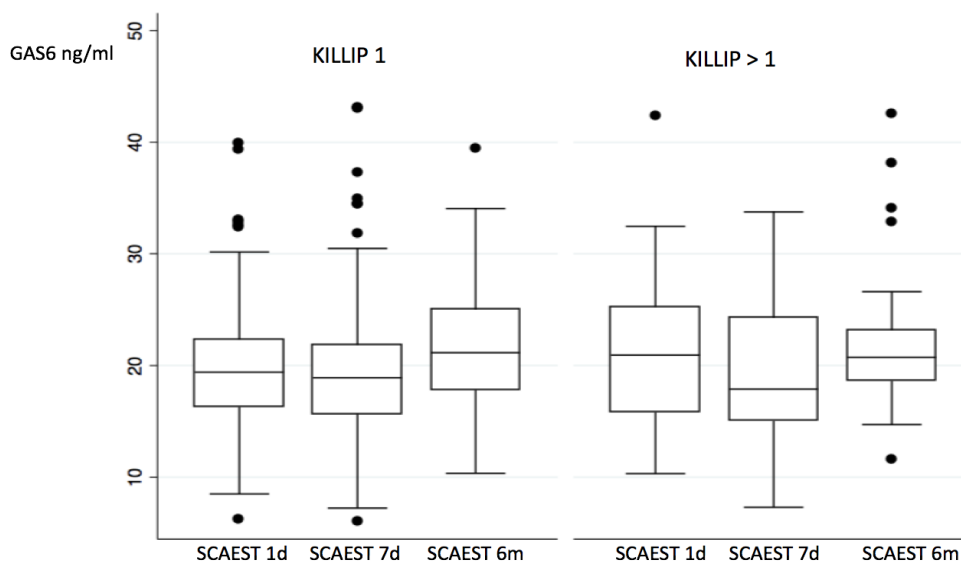


Figura 10. Els nivells de GAS6 no varen resultar diferents en cap moment de l'extracció entre el pacients amb o sense insuficiència cardíaca ($p > 0.05$ per a totes les comparacions)

4.4- Paràmetres de funció i remodelat ventricular

No es va trobar correlació entre els nivells de GAS6 i sAXL en cap dels punts de mesura amb altres paràmetres de funció ventricular com la FEVE tant en el moment de l'ingrés com als 6 mesos o els volums ventriculars indexats. GAS6 i sAXL no es van correlacionar tampoc amb els nivells de BNP durant l'ingrés o la massa de l'infart mesurada per ressonància.

No obstant, es va evidenciar una correlació positiva dèbil, però significativa entre sAXL en el dia 1 i el canvi en l'índex del volum telesistòlic del ventricle esquerre (iVTSVE) i l'índex del volum telediastòlic del ventricle esquerre (iVTDVE) entre la RMC basal i el seguiment ($r=0.183$, $p=0.029$ i $r=0.171$, $p=0.033$ respectivament). Aquestes correlacions van romandre significatives entre sAXL als 6 mesos i el canvi de iVTSVE ($r=0.165$, $p=0.029$) i va millorar lleugerament pel canvi del iVTDVE ($r=0.238$, $p=0.009$). Malgrat que es va evidenciar una moderada correlació entre BNP i el tamany de l'infart amb la FEVE i els volums ventriculars indexats basalment i en el seguiment, cap dels dos es va correlacionar amb els canvis en els volums indexats.

Els nivells de PCR van presentar una correlació positiva dèbil amb el BNP, la massa infartada i el iVTSVE, així com una correlació inversa amb la FEVE. Als sis mesos, els nivells de BNP es correlacionaven encara amb iVTSVE i la FEVE.

El recompte de monòcits no es va correlacionar amb la massa infartada, FEVE o BNP, però els monòcits en el dia 1 es van correlacionar amb els volums ventriculars inicials i en el seguiment. Ni la PCR ni el recompte de monòcits van mostrar correlació entre els canvis dels volums indexats en el temps.

Es va completar l'estudi amb les dues ressonàncies previstes en un total de 197 pacients (82% del total). D'ells, 29 (16%) van presentar remodelat ventricular durant el seguiment. Aquests pacients presentaven majors nivells de sAXL en el dia 1 (47.4 ± 8.4 vs. 44.5 ± 11.8 ng/ml, $p=0.046$), dia 7 (55.9 ± 9.6 vs. 50.2 ± 11.9 ng/ml, $p=0.018$) i als sis mesos (60.9 ± 11.0 vs. 56.4 ± 14.8 ng/ml, $p=0.093$) respectivament (**figura 11**). També presentaven major grandària de l'infart (22.1 ± 15.8 vs. 16.3 ± 11.0 % massa VE, $p=0.043$). Per altra banda no es van veure diferències entre els nivells de GAS6 entre els pacients amb o sense remodelat ventricular (21.7 ± 7.9 vs. 19.8 ± 5.4 ng/ml, $p=0.170$ al dia 1; 20.6 ± 6.7 vs. 19.4 ± 5.8 ng/ml, $p=0.417$ al dia 7 i 21.6 ± 4.5 vs. 21.9 ± 6.2 ng/ml, $p=0.746$ als 6 mesos). Tampoc no es van trobar diferències entre els nivells de PCR i el recompte de monòcits entre els pacients amb o sense remodelat advers (**taula 10**).

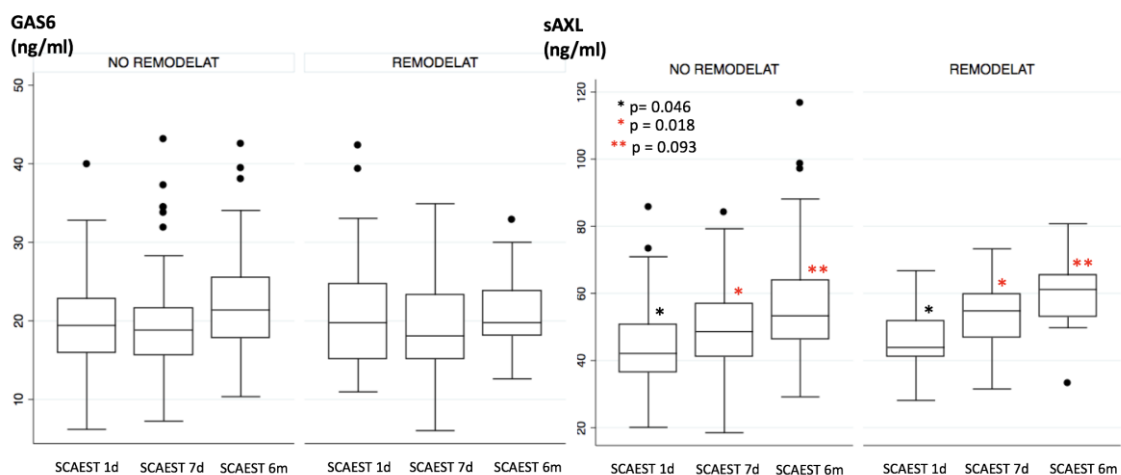


Figura 11. Nivells de GAS6 i sAXL en funció de la presència o absència de remodelat ventricular. (Comparació dels nivells de sAXL en el primer dia (*), setè dia (*) i als 6 mesos (**)) en funció de presència o absència de remodelat)

Taula 10. Valors de les principals variables estudiades en funció de la presència o absència de remodelat ventricular. (1d= primer dia; 7d= setè dia; 6m= 6 mesos; Mono= monòcits)

	NO REMODELAT ADVERS	REMODELAT ADVERS	p
Edat (anys)	59 ± 11	58 ± 12	0.734
FC a l'ingrés (bpm)	74 ± 19	77 ± 17	0.481
TAS a l'ingrés (mmHg)	133 ± 30	128 ± 28	0.478
TAD a l'ingrés (mmHg)	80 ± 19	79 ± 16	0.887
Temps per reperfusió (min)	288 ± 315	217 ± 168	0.280
GAS6 1d (ng/ml)	19.4 ± 5.4	21.9 ± 8.3	0.170
GAS6 7d (ng/ml)	19.7 ± 5.9	20.8 ± 6.9	0.417
GAS6 6m (ng/ml)	21.8 ± 6.3	22.3 ± 4.7	0.746
sAXL 1d (ng/ml)	44.0 ± 11.3	47.8 ± 8.8	0.046
sAXL 7d (ng/ml)	50.8 ± 12.2	56.1 ± 9.7	0.018
sAXL 6m (ng/ml)	57.1 ± 15.6	60.7 ± 11.4	0.093
PCR 1d (ng/ml)	87.8 ± 185.9	76.8 ± 117.0	0.781
PCR 7d (ng/ml)	75.7 ± 173.6	52.8 ± 103.7	0.535
PCR 6m (ng/ml)	8.8 ± 12.8	10.2 ± 10.9	0.681
Mono 1d (x10 ⁹ /l)	0.59 ± 0.55	0.60 ± 0.26	0.924
Mono 7d (x10 ⁹ /l)	0.79 ± 0.98	1.19 ± 2.09	0.201
Mono 6m (x10 ⁹ /l)	0.47 ± 0.30	0.50 ± 0.26	0.740
Tamany infart (%LV)	16.2 ± 11.1	23.4 ± 15.9	0.043
BNP (pg/ml)	146 ± 114	140 ± 107	0.859
TnI (ng/ml)	108.3 ± 87.9	218.2 ± 288.0	0.077
Nº segments Obst microv.	0.96 ± 1.51	1.52 ± 2.27	0.270
FEVE a l'ingrés (%)	49 ± 8	44 ± 13	0.054
FEVE als 6 mesos (%)	54 ± 7	46 ± 14	0.008
iVTDVE a l'ingrés (ml)	83.6 ± 15.2	77.5 ± 21.3	0.192
iVTDVE als 6 mesos (ml)	80.9 ± 15.4	105.0 ± 29.6	0.001
iVTSVE a l'ingrés (ml)	43.1 ± 12.5	45.2 ± 20.3	0.634
iVTSVE als 6 mesos (ml)	37.7 ± 11.7	60.3 ± 31.4	0.002

Els pacients que van presentar insuficiència cardíaca durant la hospitalització, van presentar més remodelat ventricular en el seguiment (34.5% vs. 12.8%, $p=0.010$). En un anàlisi multivariat de regressió logística incloent grandària de l'infart, classificació de Killip durant l'ingrés i sAXL al 7è dia, les dues últimes variables, eren predictors de

remodelat ventricular advers.

Variable	Wald	Valor de p	OR (Expo-B)	OR 95% IC
Tamany infart (% VE)	2.837	0.092	1.031	0.995 - 1.069
sAXL 7è dia (ng/ml)	4.554	0.033	1.043	1.003 - 1.085
Classificació Killip	4.743	0.029	2.240	1.084 - 4.630

Les següents taules (**taula 11 i 12**) mostren les correlacions entre GAS6 i sAXL en els diferents moments de l'extracció amb altres variables quantitatives estudiades (r= coeficient de correlació de Pearson; p= nivell de significació estadística; Mono= monòcits; ad= admissió; 6m=6 mesos; pc=percentatge de canvi)

Taula 11.

	GAS6 1d		GAS6 7d		GAS6 6m	
	r	p	r	p	r	p
BNP	0.08	0.42	0.02	0.83	-0.06	0.55
TnI	0.14	0.0416	0.13	0.08	0.13	0.10
CK-MB	0.13	0.07	0.10	0.23	0.19	0.0251
PCR	0.21	0.008	-0.02	0.86	0.10	0.27
Mono	-0.10	0.22	0.04	0.66	-0.11	0.48
Creat max	0.14	0.0474	0.17	0.0290	-0.06	0.44
TAS	0.08	0.31	0.21	0.0072	0.03	0.71
TAD	0.08	0.29	0.14	0.07	-0.05	0.57
FC	0.14	0.06	0.07	0.36	-0.04	0.62
HbA1C	0.16	0.0301	0.13	0.11	0.01	0.97
FEVE ad	-0.12	0.19	-0.06	0.42	0.07	0.39
FEVE 6m	-0.15	0.06	-0.03	0.67	-0.01	0.85
iVTDVE ad	-0.04	0.78	-0.13	0.09	-0.01	0.95
iVTDVE 6m	-0.04	0.62	-0.12	0.13	0.002	0.98
iVTSVE ad	0.02	0.80	-0.04	0.61	0.01	0.88
iVTSVE 6m	0.09	0.26	-0.06	0.46	0.01	0.88
iVTDVE pc	0.06	0.45	0.02	0.79	-0.05	0.55
iVTSVE pc	0.10	0.24	-0.02	0.79	0.02	0.83
Infart (%)	0.10	0.19	0.05	0.54	0.03	0.69

Taula 12.

	sAXL 1d		sAXL 7d		sAXL 6m	
	r	p	r	p	r	p
BNP	-0.03	0.75	-0.003	0.98	-0.05	0.63
TnI	0.10	0.14	-0.03	0.66	-0.007	0.93
CK-MB	-0.09	0.21	-0.06	0.42	-0.03	0.72
PCR	0.10	0.21	0.04	0.59	-0.06	0.53
Mono	-0.01	0.92	0.05	0.55	-0.22	0.14
Creat max	0.15	0.0296	0.20	0.0086	0.22	0.0075
TAS	-0.05	0.47	0.02	0.80	-0.04	0.62
TAD	-0.01	0.85	0.03	0.67	0.06	0.45
FC	0.07	0.34	-0.003	0.97	0.07	0.38
HbA1C	0.14	0.06	0.12	0.15	-0.03	0.69
FEVE ad	-0.07	0.38	0.01	0.86	0.10	0.22
FEVE 6m	-0.11	0.17	-0.05	0.52	0.09	0.26
iVTDVE ad	-0.05	0.52	-0.13	0.09	-0.12	0.16
iVTDVE 6m	0.07	0.37	0.02	0.78	0.03	0.69
iVTSVE ad	0.02	0.80	-0.07	0.37	-0.12	0.16
iVTSVE 6m	0.09	0.26	0.04	0.60	-0.02	0.84
iVTDVE pc	0.17	0.033	0.15	0.06	0.24	0.004
iVTSVE pc	0.18	0.023	0.14	0.08	0.17	0.049
Infart (%)	0.03	0.73	-0.02	0.85	-0.03	0.69

Es va evidenciar una correlació positiva molt dèbil entre el nivell de troponina I amb GAS6 al primer dia. La creatinina màxima, es va correlacionar també de forma positiva i estadísticament significativa, encara que dèbil, tant amb els nivells de GAS6 en la fase aguda (1er i 7è dia) i sAXL en qualsevol moment de l'extracció.

4.5- Nombre de vasos malalts

No es van detectar diferències significatives en els nivells de GAS6 i sAXL en cap moment de l'extracció, segons el nombre de vasos malalts (1, 2 ò 3) utilitzant el test de ANOVA. Tampoc no es van evidenciar diferències, dicotomitant la variable a afectació d'un vas o >1 vas.

4.6- Estudi de la fibrosi en el miocardi remot mitjançant RM

Canvis dinàmics del VEC i relació amb el remodelat ventricular esquerre

Es va evidenciar un augment sistemàtic del VEC entre l'estudi basal i el seguiment en la majoria dels pacients (**figura 12**). El VEC mig va passar de $23,92 \pm 2,99\%$ en l'estudi basal a $25,59 \pm 2,67\%$ als 6 mesos de seguiment, $p < 0.001$ en l'anàlisi aparellat.

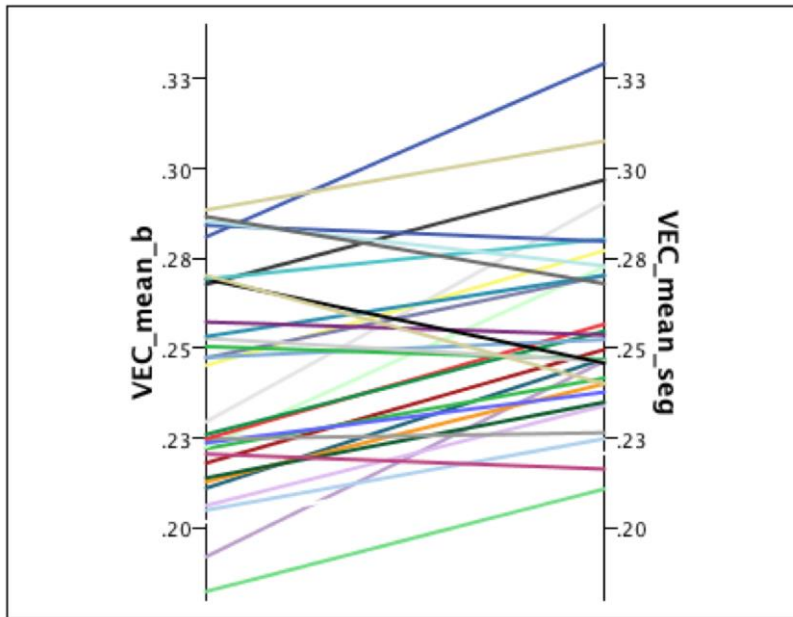


Figura 12. Canvis individuals observats en el VEC mig entre l'estudi basal i l'estudi de seguiment, expressats com a fracció de 1.

L'augment va ser molt similar i consistent en les tres regions d'interès analitzades en el miocardi remot (**figura 13**).

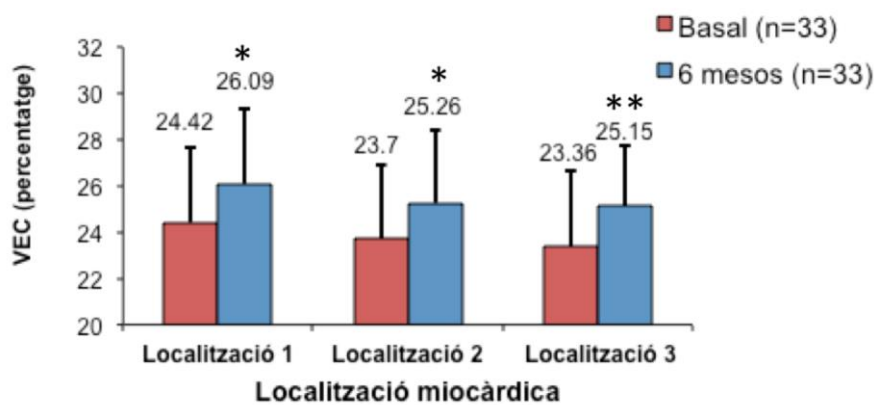


Figura 13. Diagrama de barres amb els valors mitjos i desviació estàndard en les tres regions d'interès seleccionades del miocardi remot no infartat.

El VEC mig en el miocardi remot als 6 mesos de l'infart (n=51) es va correlacionar dèbilment encara que amb significació estadística amb el iVTDVE (r=0.356, p=0.015) i el iVTSVE (r=0.368, p=0.008) (**figura 14**).

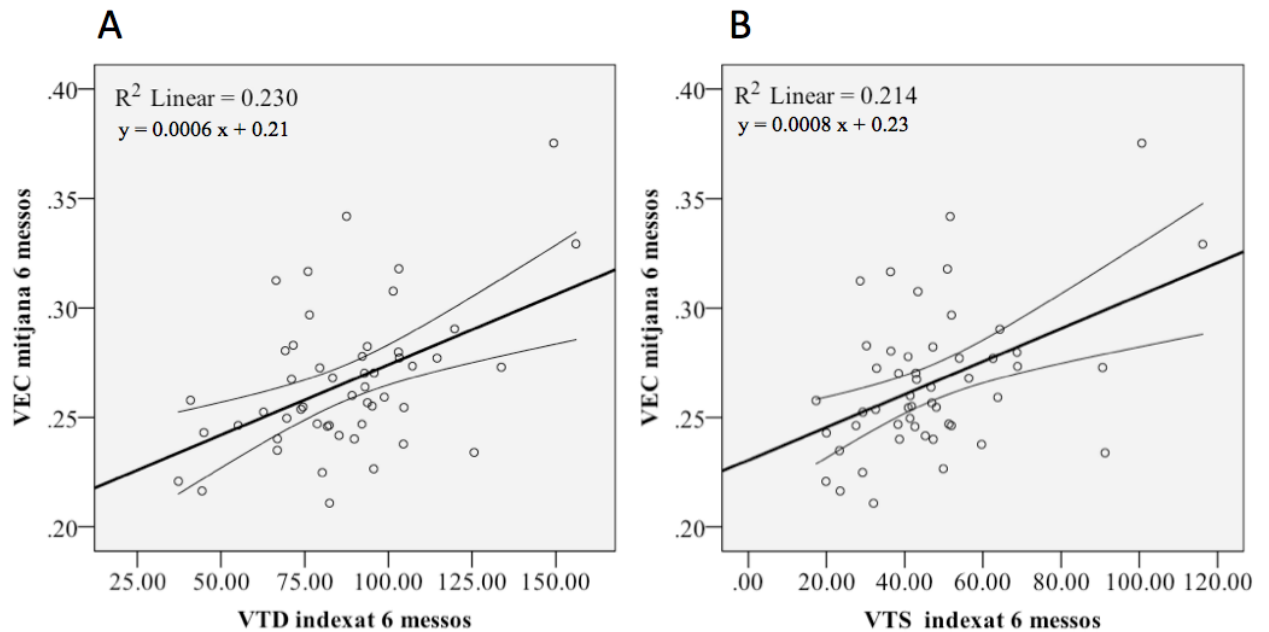


Figura 14. Diagrames de punts que mostren una correlació lleugera però estadísticament significativa entre el VEC en el miocardi remot amb els volums telediastòlics (A) i telesistòlics indexats (B).

En canvi, el VEC no es va associar a la FEVE en l'estudi de seguiment (r=-0.157, p=NS), la qual està principalment determinada per l'extensió de la massa infartada, com s'evidencia per la bona correlació existent entre ambdues variables (**figura 15**).

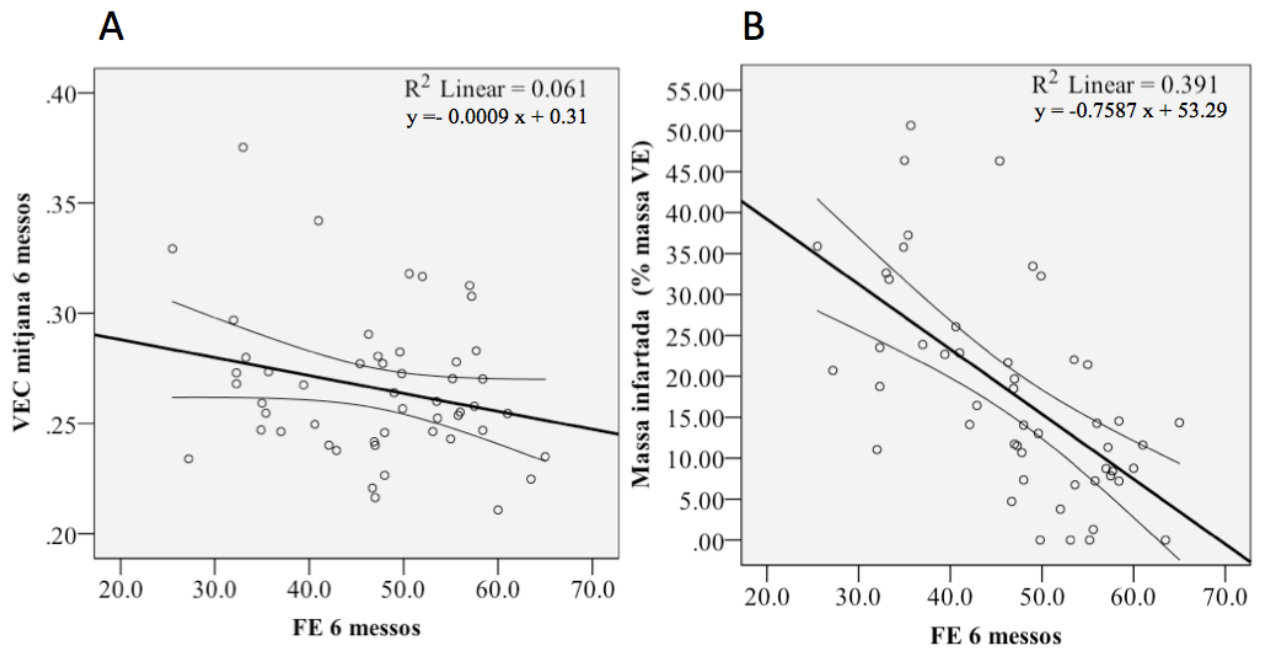


Figura 15. Diagrames de punts que mostren l'absència de correlació entre el VEC i la FE en el seguiment (A) i una bona correlació amb la massa infartada expressada com a percentatge de la massa del VE (B).

Malgrat que en els 33 pacients amb els dos estudis, la massa d'infart en grams en l'estudi basal i en l'estudi de seguiment no es va correlacionar directament amb el VEC basal i de seguiment respectivament ($p=NS$), la massa d'infart en l'estudi basal sí es va correlacionar amb el canvi en el VEC (Δ VEC) en valors absoluts ($r=0.359$, $p=0.045$) així com en percentatge de canvi respecte al VEC inicial ($r=0.346$, $p=0.049$), el que suggereix que l'extensió de la seqüela de l'infart exerceix una influència en l'expansió de la matriu extracel·lular en el miocardi remot (**figura 16**).

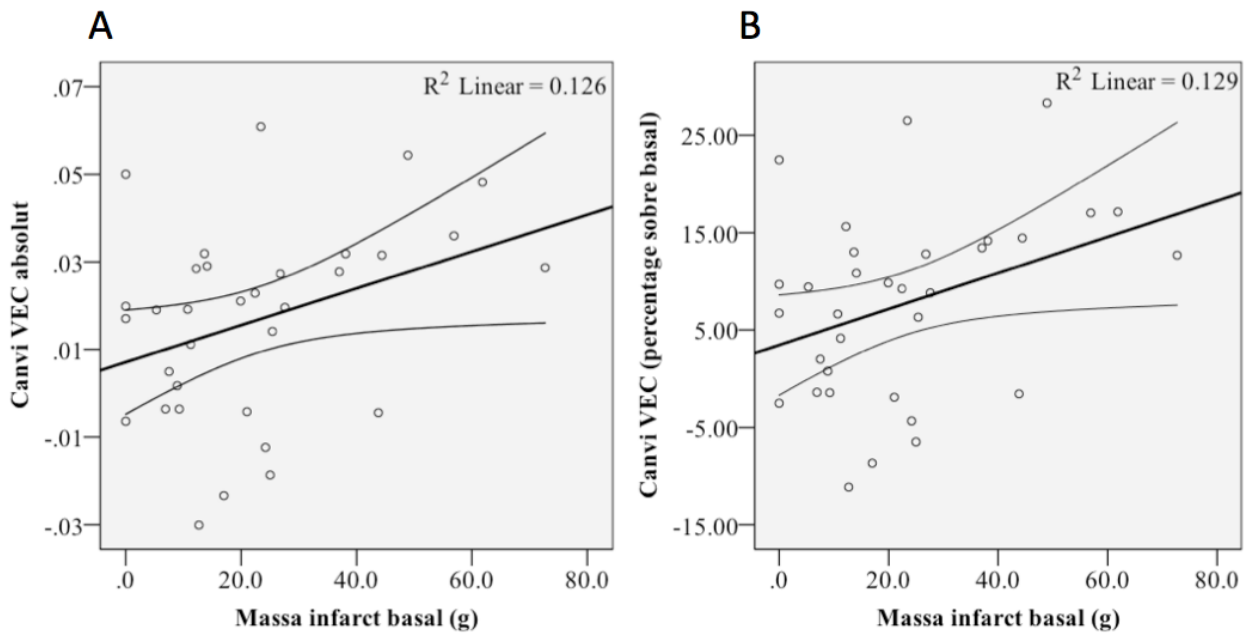


Figura 16. Diagrames de punts que mostren una correlació entre el canvi de VEC (A, valor absolut i B, percentatge de canvi respecte al valor basal) i la massa de l'infart en grams en l'estudi basal.

Per altra banda, els canvis observats en VEC no es correlacionen amb els canvis en iVTDVE ni iVTSVE. El nivell inicial de BNP també es va correlacionar de manera significativa amb el VEC al seguiment (r 0.317; $p=0.023$) (**taula 13**).

Taula 13.

	VEC basal		VEC seguiment		Δ VEC (%)	
	r	p	r	p	r	p
iVTDVE ad	0.361	0.028	0.288	0.043	0.030	0.868
iVTSVE ad	0.280	0.093	0.311	0.028	0.240	0.179
iVTDVE 6m	0.213	0.226	0.356	0.010	0.348	0.047
iVTSVE 6m	0.265	0.130	0.368	0.008	0.203	0.258
Δ VTDVE (%)	0.000	0.999	0.109	0.452	0.254	0.153
Δ VTSVE (%)	0.180	0.309	0.158	0.273	-0.070	0.698
FEVE ad	0.265	0.130	-0.157	0.276	-0.364	0.037
FEVE 6m	-0.137	0.440	-0.157	0.270	-0.110	0.542
Δ FE (%)	-0.187	0.289	-0.081	0.578	0.278	0.117
BNP ad	0.323	0.051	0.317	0.023	0.219	0.220

Relació entre VEC, GAS6 i sAXL

Es va observar una correlació moderada i significativa entre els valors de VEC en l'estudi de RM inicial amb els valors de sAXL en el dia 1 ($r=0.501$, $p=0.003$) i dia 7 ($r=0.574$, $p<0.001$). Als 6 mesos va millorar lleugerament la correlació entre el VEC i sAXL als 6 mesos ($r=0.591$, $p<0.001$) (**figura 17**). No es va observar correlació significativa entre els valors de GAS6 i VEC en cap moment.

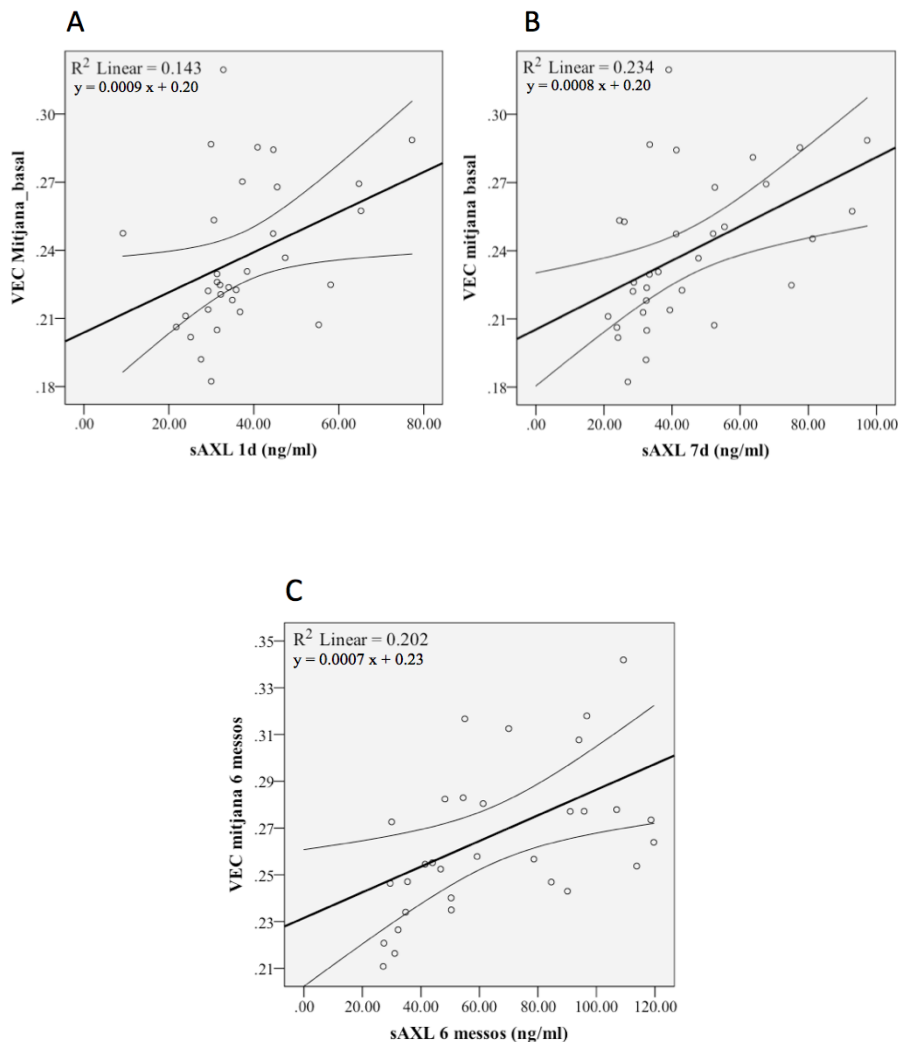
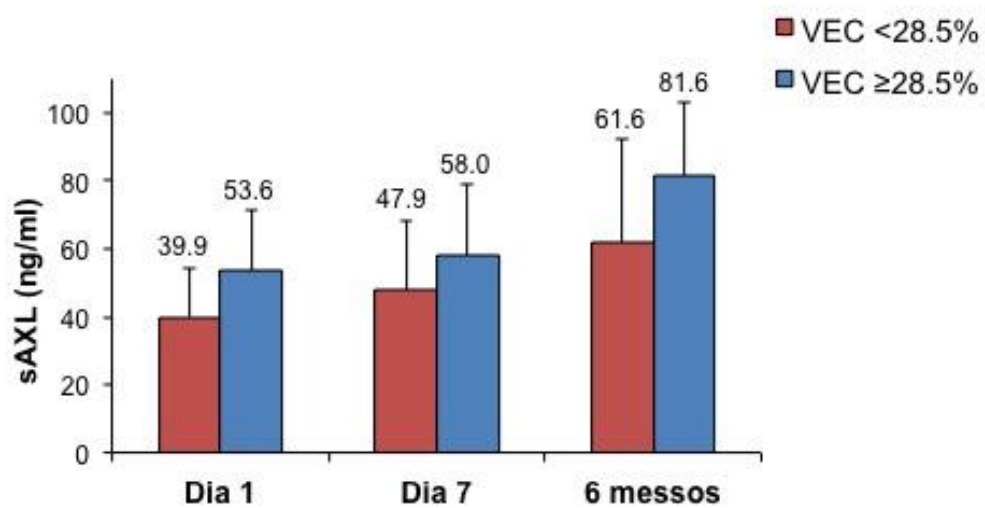


Figura 17. Gràfics que mostren una correlació moderada entre VEC en la RM basal i els nivells sèrics de AXL al primer dia (A) i al setè dia (B). La correlació entre el VEC i sAXL es mantenia als 6 mesos (C).

Als 6 mesos de seguiment, 9 pacients dels 51 presentaven un VEC $\geq 28.5\%$. Aquests 9 individus tenien uns nivells de BNP superiors (340.2 ± 312.5 vs 141.2 ± 106.4 , $p=0.001$) però no es van observar diferències en el tamany de l'infart ($23.4 \pm 19.4\%$ vs $23.0 \pm 18.9\%$, $p=NS$). Els pacients amb VEC al seguiment $\geq 28.5\%$ mostraren sistemàticament nivells més elevats de sAXL en totes les determinacions, essent estadísticament significatius en el primer dia post infart (**Figura 18 i taula 14**).

Figura 18. *Diagrama de barres amb els valors mitjos i desviació estàndard de sAXL segons la presència de un valor de VEC $\geq 28.5\%$ a l'estudi de seguiment.*



Taula 14.

	VEC \geq 28.5	VEC $<$ 28.5	p
GAS6 1d (ng/ml)	14.2 \pm 4.0	14.1 \pm 5.3	0.968
GAS6 7d (ng/ml)	13.8 \pm 2.8	14.2 \pm 5.2	0.827
GAS6 6m (ng/ml)	15.3 \pm 2.7	17.0 \pm 6.8	0.553
sAXL 1d (ng/ml)	53.6 \pm 17.9	39.9 \pm 14.1	0.029
sAXL 7d (ng/ml)	58.0 \pm 21.2	47.9 \pm 20.1	0.186
sAXL 6m (ng/ml)	81.6 \pm 21.3	61.6 \pm 31.0	0.147

Els nivells de galectina-3 als 7 dies es van correlacionar amb els nivells de sAXL al dia 1 i al dia 7 ($r=0.258$; $p=0.018$ i $r=0.224$; $p=0.034$, respectivament) i amb el VEC en el seguiment ($r=0.529$; $p=0.009$).

No es va evidenciar correlació significativa entre els nivells de GAS6 i el càlcul de VEC (**taula 15**).

Taula 15.

	VEC basal		VEC seguiment		ΔVEC (%)	
	r	p	r	p	r	p
GAS6 1d	0.125	0.495	0.066	0.671	-0.034	0.864
GAS6 7d	0.291	0.100	0.162	0.283	-0.004	0.984
GAS6 6m	-0.046	0.855	-0.220	0.227	-0.167	0.523
sAXL 1d	0.501	0.003	0.582	< 0.001	-0.285	0.141
sAXL 7d	0.574	<0.001	0.487	0.001	-0.247	0.196
sAXL 6m	0.633	0.005	0.591	<0.001	-0.127	0.626
Galectina 7d	0.632	0.252	0.529	0.009	0.791	0.111

4.7- Esdeveniments clínics durant el seguiment

El seguiment es va completar en tots els pacients durant 79 ± 49 mesos. Durant aquest període 16 pacients (7%) van morir (11 per causa cardíaca i 5 de causa no cardíaca). Un total de 6 pacients van ser reingressats per insuficiència cardíaca i 11 per un nou infart de miocardi. Tretze individus (5.7%) van morir per causa cardíaca o van ser readmesos per insuficiència cardíaca.

En els pacients que van presentar esdeveniments clínics (mortalitat o reingressos per insuficiència cardíaca o IAM) ni els nivells de sAXL al dia 1 (49.8 ± 15.1 vs. 44.7 ± 11.0 ng/ml), dia 7 (51.9 ± 8.8 vs. 50.8 ± 11.5 ng/ml) ni als 6 mesos (56.2 ± 8.0 vs. 57.2 ± 14.4 ng/ml) ni els nivells de GAS6 al dia 1 (22.4 ± 5.9 vs. 19.9 ± 5.6 ng/ml), dia 7 (19.1 ± 9.4 vs. 19.5 ± 5.9 ng/ml) i sis mesos (13.9 ± 6.0 vs. 21.8 ± 5.9 ng/ml) van ser significativament diferents que en la resta de pacients.

DISCUSSIÓ

5.- DISCUSSIÓ

La reparació cardíaca és un procés actiu on la inflamació i la esferocitosi de cèl·lules apoptòtiques són factors clau. Com s'ha comentat prèviament, els receptors TAM intervenen en aquest procés. L'augment progressiu dels valors de sAXL en els pacients amb IAMEST en aquest treball suggereixen que l'activació del sistema GAS6-TAM es produeix en el moment de l'infart agut i es manté activada durant tot el procés de cicatrització. A més, aquest augment en els nivells de sAXL és més pronunciat en pacients que presenten signes d'insuficiència cardíaca, sense que hi hagi correlació amb els nivells de peptid natriurètic atrial, marcadors de necrosi miocàrdica ni els paràmetres de disfunció ventricular esquerra. Els valors de sAXL són més alts en pacients que desenvolupen remodelat advers, encara que les diferències només van resultar significatives en la mesura del 1er i 7è dia. Els valors de sAXL en qualsevol moment de mesura es van correlacionar també amb la fibrosi miocàrdica difusa, determinada pel càlcul de VEC en els segments miocàrdics no infartats. Donats els resultats obtinguts, és raonable pensar que el sistema GAS6-TAM intervingui en processos de reparació miocàrdica a llarg termini. La seva contribució seria independent de l'activació del sistema de peptids natriurètics auriculars, més relacionats amb l'extensió de la necrosi miocàrdica i la seqüela funcional.

5.1- GAS6-TAM en la isquèmia miocàrdica

El paper de GAS6-TAM en la cardiopatia isquèmica i la síndrome coronària aguda, és encara a dia d'avui controvertit.

sAXL.

En un estudi previ amb un nombre reduït de malalts (34 pacients amb síndrome coronària aguda, tant angina inestable com IAMSEST) es van evidenciar majors valors de sAXL en la fase aguda respecte a 24 voluntaris sans ⁹². En canvi, en el nostre projecte, amb un major nombre de pacients, no vam trobar diferències significatives en els nivells de sAXL en pacients amb SCAEST durant la fase aguda, en comparació amb els controls. A més de les diferències en el nombre de pacients i les seves característiques, existeixen algunes raons que poden explicar les diferències observades entre el nostre estudi i el de Liu X et al. En l'estudi de Liu X les mostres van ser extretes en les primeres 24 hores de l'ingrés, abans que s'iniciés el tractament amb anticoagulants i antiagregants, mentre que en el nostre estudi la primera mostra va ser presa una mica més tard, després de la instauració d'aquests tractaments. Se sap que els antiagregants i anticoagulants redueixen els nivells de GAS6 en sèrum i per tant podrien afectar als nivells de sAXL mesurats ^{110,111}.

Amb determinacions seriades en el temps, nosaltres hem pogut constatar l'augment progressiu dels nivells de sAXL fins als 6 mesos, la qual cosa confereix coherència a la hipòtesi que els components del sistema Gas6-TAM participen en la fisiopatologia del remodelat ventricular després de l'infart. El mecanisme exacte d'aquest increment observat en el nostre estudi no es pot esbrinar amb els nostres resultats. AXL s'expressa en diferents tipus cel·lulars que participen en la inflamació i en la placa d'ateroma, com les cèl·lules endotelials, les cèl·lules musculars llises de la paret vascular i els macròfags. No obstant, l'augment en els nivells de AXL circulant, pot ser conseqüència també de l'efecte de les proteases ADAM10 i ADAM17 en el miocardi necròtic, com s'ha vist en el ventricle esquerre en un model d'infart en ratolins ¹¹².

GAS6.

Un estudi previ amb una sèrie de 90 pacients no va mostrar associació entre GAS6 i cap grau de malaltia coronària, en pacients sotmesos a coronariografia per diferents motius (síndrome coronària aguda, angina estable o coronariografia preoperatòria per malaltia valvular). No es va evidenciar tampoc relació amb el nombre de vasos malalts, l'elevació de troponines, els canvis electrocardiogràfics, ni el tractament previ amb estatines. En aquest estudi no es van estudiar els nivells de sAXL ¹¹³. Per altra banda, Lee et al van trobar menors nivells de GAS6 plasmàtic i sAXL en 19 pacients sotmesos a cirurgia de by-pass coronari comparat amb 20 controls. Els nivells de GAS6 plasmàtic es correlacionaven de manera positiva amb l'expressió de GAS6 i AXL a nivell tissular a l'aorta i de forma negativa amb la glucèmia amb dejú, marcadors de disfunció endotelial i la mortalitat operatòria ¹¹⁴. Jiang i col·laboradors varen estudiar els nivells de GAS6 en 80 pacients amb malaltia coronària i a 40 controls sans ajustats per edat i sexe. La població de l'estudi consistia en 24 pacients (30 %) amb angina estable, 48 pacients (60 %) amb angina inestable i només 8 pacients (10 %) amb infart agut de miocardi. Les concentracions de GAS6 eren significativament menors en els pacients que en el grup control. A més, es va evidenciar un possible paper protector del polimorfisme GAS6 c.834+7G>A que estava associat a un menor risc cardiovascular ¹¹⁵. En el present treball, i en concordança amb els dos últims estudis esmentats, es van evidenciar menors nivells de GAS6, en els pacients amb SCAEST en comparació amb el grup control. GAS6 s'acobla amb sAXL per formar un complex estable lligam-receptor. En condicions normals, hi ha un excés de sAXL sobre GAS6, per tant tot el GAS6 està enganxat a sAXL, prevenint l'activació dels receptors TAM ¹¹⁶. En conseqüència, qualsevol condició que causi un augment de AXL neutralitzaria, teòricament, la concentració lliure de GAS6, el que indicaria que els nivells circulants de GAS6 no serien actius, si no molècules

inhibides i funcionalment inactives. En línia, amb aquesta hipòtesi, vam observar que els nivells de GAS6 continuaven disminuint durant l'admissió (encara que la diferència no va resultar estadísticament significativa), amb una relació inversa amb els nivells de sAXL.

A més, els nivells de GAS6 no es van associar a la grandària de l'infart i tampoc amb els paràmetres de disfunció ventricular o canvis en els volums ventriculars, suggerint una manca d'efecte dels nivells circulants de GAS6 amb el remodelat ventricular. Si l'expressió local de GAS6 en el miocardi afectat podria tenir un paper en aquest aspecte, no es pot esbrinar amb els nostres resultats, i necessita ser explorat en estudis experimentals.

Com en l'estudi de Lee i col·laboradors, no hem trobat una clara correlació entre els nivells de GAS6 i els valors de troponina (únicament una correlació positiva dèbil en el primer dia de l'infart).

En cap dels estudis previs, s'han estudiat els nivells de GAS6 fora de la fase aguda de l'infart. En el nostre cas, hem evidenciat un augment significatiu dels nivells de GAS6 als 6 mesos després de l'esdeveniment, en comparació amb la fase aguda. Aquest augment fa els valors de GAS6 als 6 mesos, equiparable a la població control.

5.2. - Potencial paper de GAS6 com a marcador de risc cardiovascular

Una hipòtesi per explicar els nivells baixos de GAS6 circulant en els pacients amb esdeveniments cardiovasculars durant la fase aguda, seria que el mateix fet de tenir un GAS6 baix suposés un major risc cardiovascular.

De manera similar al nostre treball, s'han associat nivells baixos de GAS6 a esdeveniments cerebrovasculars, i alguns polimorfismes de GAS6 sembla que juguen un paper protector en la patologia cerebrovascular ^{117,118}. Per altra banda, s'ha vist que la utilització de GAS6 recombinant després de la oclusió de l'artèria cerebral mitja en models animals, redueix la inflamació i els dèficits neurològics ¹¹⁹. S'han associat també les baixes taxes d'esdeveniments trombòtics en els injerts d'artèria mamària interna en pacients sotmesos a cirurgia de revascularització coronària, a la alta expressió local de GAS6 i AXL ¹²⁰.

El complex GAS6-TAM té un paper en la hemostàsia vascular, la calcificació i l'aterosclerosi ¹²¹⁻¹²⁴. Se sap que l'apoptosi és un dels processos que regula la calcificació de les cèl·lules musculars llises i que GAS6 podria retrassar la senescència vascular regulant l'apoptosi i la inflamació ^{125,126}. A més, l'apoptosi sembla particularment involucrada en la erosió de la placa d'ateroma, i podria participar en la abrasió de l'endoteli i la denudació de la placa ¹²⁷.

La lipoproteïna aterogènica, LDL oxidada, indueix la producció de GAS6 en les cèl·lules vasculars, el que juga un paper en la formació de la cèl·lula escumosa ¹²⁸. GAS6 està sobreexpressat en la paret de l'endoteli de les plaques d'ateroma carotídies en humans ¹²⁹ sobretot en les plaques complicades ¹³⁰, i l'estimulació de les cèl·lules musculars llises amb GAS6 recombinant disminueix l'expressió de gens proinflamatoris

com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF-alfa) i la mol·lècula d'adhesió intracel·lular (ICAM-1) ^{125,131}. Aquests fets anirien també a favor del paper protector de GAS6 en humans.

Sembla que l'addició de AXL i GAS6 recombinant a cultius de perícits vasculars, inhibeix la diferenciació osteogènica d'aquestes cèl·lules i que la via GAS6-AXL estaria involucrada en la modulació i enlentiment de la senescència cel·lular en les cèl·lules musculars llises vasculars ¹³².

Estudis animals han mostrat que GAS6 promou la supervivència i la migració de les cèl·lules musculars vasculars i que estaria sobreexpressada, juntament amb el seu receptor AXL, en la neoïntima arterial després d'induir-se una lesió mitjançant un baló ¹³³. S'ha vist també que GAS6 amplifica l'activació de les cèl·lules endotelials, i potencia les interaccions entre aquestes cèl·lules, les plaquetes i els leucòcits durant la inflamació ⁶⁹. Els ratolins Knock-out per GAS6 semblen estar protegits contra els esdeveniments trombòtics, tant a nivell venós com arterial, en resposta a estímuls trombògens ¹³⁴. Pel que fa al paper antiinflamatori de GAS6, com ja s'ha esmentat, els resultats in vitro de cèl·lules humanes, han mostrat que té un paper modulador de la inflamació inhibint l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials sanes, però que en un moment donat, pot deplecionar-se quan és superat per un estímul pro-inflamatori que posa en marxa la maquinària pro-adhesiva de les cèl·lules endotelials ¹³⁵. Sembla que GAS6 seria necessari tant per iniciar la inflamació, com per modular-la posteriorment.

Per tant, una hipòtesi seria que GAS6 actua com un factor protector en humans, en part disminuint el fenotip proinflamatori de les cèl·lules musculars llises. El fet que GAS6 estigui sobreexpressat en plaques d'ateroma podria no ser detectable en sèrum.

El GAS6 plasmàtic podria originar-se en part, de l'endoteli apoptòtic, i un augment detectable en els nivells circulants, podria requerir una afectació més sistèmica com per exemple en la sepsis, on els nivells plasmàtics poden augmentar fins >100 ng/ml i tenen correlació amb el grau de la severitat de la malaltia. A més, s'ha vist una correlació entre els nivells de GAS6 i els de trombomodulina soluble (un marcador de dany endotelial) en aquest contexte ¹³⁶.

Un estudi en 189 pacients amb isquèmia crítica de membres inferiors, i en comparació a 204 controls, va demostrar que els nivells de GAS6 i sAXL estaven augmentats en els malalts, estant correlacionats amb els valors de proteïna C reactiva, interleuquina-6, TNF i neopterinina. A més els nivells, es correlacionaven amb la mortalitat a 3 anys ¹²¹. El fet que GAS6 està elevat en aquests pacients, també podria anar en concordança amb la gran quantitat d'endoteli afectat, com en el cas de la sepsis. S'alliberaria en sang una quantitat notable de GAS plasmàtic. En el cas de l'infart, l'alliberació pel dany endotelial, podria tenir lloc a nivell més local, i per tant, no ser mesurable en sèrum, o bé que GAS6 quedi ràpidament neutralitzat per l'excés de sAXL.

Alguns grups han proposat que els beneficis de les estatines en les cèl·lules musculars llises i el seu efecte anticalcificació podria estar relacionat amb la restauració de la via GAS6-AXL ^{132,137,138}. De fet, l'augment significatiu dels nivells de GAS6 plasmàtics en la nostra població durant el seguiment, arribant a valors comparables als dels controls sans, podrien també estar relacionats amb el tractament amb estatines, ja que un 83% d'individus van ser donats d'alta amb aquest tractament.

La nostra interpretació és que la hipoactivitat del sistema GAS6-TAM, produeix una major inflamació vascular que podria desencadenar esdeveniments aguts. El motiu pel qual aquest sistema està infra-expressat en aquests pacients no està aclarit, però han

sorgit diversos estudis que indiquen que podria tenir-hi una influència, la presència de factors de risc cardiovascular. Per exemple, s'ha vist que els nivells de GAS6 són significativament menors en pacients amb debut de diabetis mellitus tipus 2, i s'han associat amb nivells de glucosa, inflamació i marcadors de disfunció endotelial, hipotetitzant-se que els efectes inflamatoris de la glucosa poden ser en part mediat per nivells baixos de GAS6 i reducció de la senyalització TAM. No es van mesurar els nivells de sAXL ¹³⁹. Altres estudis han mostrat també menors nivells de GAS6 en relació a la resistència a la insulina, intolerància a la glucosa i inflamació en el contexte de diabetis tipus 2 i obesitat ¹⁴⁰.

També, nivells plasmàtics baixos de GAS6 s'han associat a factors de risc convencional en una subpoblació de 40 pacients amb psoriasi i 20 controls sans. Mentre que els nivells de GAS6 no diferenciaven entre la població malalta i els sans, sí que es van veure nivells més baixos de GAS6 en pacients fumadors i en aquells pacients amb almenys un factor de risc cardiovascular agafats com a conjunt ¹⁴¹.

En el nostre treball no vam detectar diferències en els nivells de GAS6 segons la presència o no de diabetis, encara que sí presentaven majors nivells de sAXL en el dia 1er i 7è. S'ha de dir que la proporció de diabètics en el nostre treball no és alta (19%). Contràriament, la presència de tabaquisme actiu disminuïa significativament el nivells de sAXL en el dia 1 i 7. En els fumadors, els valors de GAS6 durant l'ingrés també eren més baixos, encara que les diferències no van ser estadísticament significatives. La presència de dislipèmia o història familiar de cardiopatia isquèmica precoç no modificava els valors de sAXL ni de GAS6.

En el present treball, vam detectar majors valors de GAS6 i sAXL en el primer dia i majors nivells de GAS6 també al setè dia en pacients hipertensos i es van mantenir les diferències després d'ajustar els resultats per la presència d'insuficiència cardíaca.

El fet de trobar majors nivells de GAS6 i sAXL en pacients hipertensos es podria explicar. La hipertensió s'associa a hipertròfia ventricular. Un estudi en ratolins, va mostrar que l'expressió de GAS6 augmentava en resposta a una inducció de sobrecàrrega de pressió amb un banding aòrtic. Per altra banda ratolins knock-out per GAS6 presentaven menor hipertròfia, fibrosi i disfunció sistòlica comparat amb els wild-type. En aquest mateix estudi es va trobar major expressió local de GAS6 en el miocardi de miocardiopatia dilatada en humans, en cors hipertròfics de ratolins i en miòcits estimulats amb angiotensina II. Per tant, aquesta sobreexpressió de GAS6 promouria la fibrosi i la hipertròfia¹⁴². Comparant els controls entre sí, només van romandre significatives les diferències en sAXL en hipertensos, que presentaven nivells més elevats.

5.3.- Insuficiència cardíaca

La insuficiència cardíaca i la inflamació estan estretament interconnectades, i es potencien una a l'altra ¹⁴³.

Batlle et al ⁹⁰, varen trobar nivells 6 vegades majors d'expressió proteica de AXL, en el miocardi de 15 pacients amb insuficiència cardíaca terminal comparat amb 11 controls de cors de donants. A més, van evidenciar també majors nivells de AXL circulant en una cohort de 192 pacients amb insuficiència cardíaca avançada (de diferents etiologies) en comparació amb 67 controls. Els nivells de sAXL tenien implicacions pronòstiques a més de BNP per predir la mortalitat global, ingressos per insuficiència cardíaca o transplantament cardíac. Com en el nostre treball, no es va trobar correlació entre sAXL i BNP. En un estudi més recent ⁹¹, es va veure que sAXL, però no els nivells de troponina, afegia un major valor predictiu per esdeveniments adversos que BNP sol, en pacients amb insuficiència cardíaca. En concordança amb aquests dos estudis esmentats, no vam detectar una correlació entre els nivells de sAXL amb el tamany de l'infart o BNP, però els nivells de sAXL al primer i 7è dia van resultar ser predictors independents de remodelat ventricular advers. Per altra banda, hem trobat majors nivells de sAXL en aquells pacients que presentaven signes d'insuficiència cardíaca (Killip ≥ 2) en comparació amb els infarts Killip I, essent les diferències significatives en el primer dia i en el sisè mes postinfart. Cal dir, que l'escàs nombre de pacients amb insuficiència cardíaca a la nostra població, sobretot insuficiència cardíaca greu o xoc cardiogènic (Killip 3 i 4 només representen un 4% dels pacients), podria influir en el resultat i inclús podria explicar la falta de significació als 7 dies. Cal esmentar, però, que l'elevació de sAXL no s'explica només per la insuficiència cardíaca, ja que eliminant de l'anàlisi els pacients amb signes de congestió, i comparant els nivells de sAXL entre els infarts i els controls, les diferències segueixen sent significatives als 6 mesos. Contràriament a les

publicacions prèvies esmentades, no vam evidenciar un valor predictiu d'esdeveniments adversos durant el seguiment en funció dels nivells de sAXL, si bé el nombre d'esdeveniments va ser escàs.

Els pèptids natriurètics atrials s'alliberen en la fase aguda de la lesió miocàrdica com a resposta a la necrosi cel·lular, l'estirament de les fibres cardíques i la sobrecàrrega de pressió intracavitària. És un fet conegut que el BNP és un bon predictor de remodelat advers després de l'infart ^{144,145}. El mateix passa amb l'alliberament de marcadors de necrosi miocàrdica que s'alliberen en la fase de necrosi cel·lular. Aquests marcadors en sèrum estan directament relacionats amb l'extensió del dany miocàrdic en la fase aguda. En canvi, el sistema GAS6-TAM podria tenir més relació amb la inflamació i els processos reparatius que ocorren en fases posteriors, el que podria explicar el perquè no hem trobat relació entre sAXL i BNP o TnI.

Tenint en compte aquest fet, sAXL podria representar un nou jugador en la fisiopatologia de la insuficiència cardíaca i la cicatrització, que actuaria de manera independent al BNP. La manca de correlació entre sAXL i la resta de paràmetres de disfunció ventricular, cosa que no passa amb BNP i troponina, anirien a favor d'aquesta hipòtesi.

5.4.-Cicatrització i fibrosi

El sistema GAS6-TAM sembla fonamental en regular la cicatrització i la fibrosi després del dany tissular. S'ha evidenciat que GAS6 és un important factor de creixement per als fibroblasts i els seus nivells, juntament amb els de sAXL, augmenten de forma paral·lela a la progressió de la fibrosi en la malaltia hepàtica crònica ^{146,147}. Per altra banda, la menor expressió de MERTK s'ha relacionat també amb menor grau de fibrosi en l'esteatosi hepàtica ¹⁴⁷.

No està clar si la funció de GAS6-AXL després de la lesió miocàrdica té conseqüències negatives o si és un mecanisme de compensació. No obstant, estudis en animals han demostrat un deteriorament en el procés de cicatrització i una major progressió a IC en ratolins knock-out per Mer-TK ¹⁴⁸.

En el nostre projecte, hem mesurat la fibrosi difusa (lluny de la zona infartada) de forma indirecta, mitjançant el càlcul del VEC per ressonància. Existeix controvèrsia sobre el desenvolupament de fibrosi remota (en zones allunyades de la zona necròtica) després d'un infart de miocardi. La fibrosi remota ha estat documentada mitjançant estudis anatomopatològics, en infarts extensos no reperfosos ¹⁴⁹, i s'ha associat a un augment de la rigidesa miocàrdica i al desenvolupament d'insuficiència cardíaca ¹⁵⁰. Per altra banda, un treball experimental i clínic realitzat recentment en infarts reperfosos, no va mostrar evidència de fibrosi remota, ni en els estudis moleculars ni per ressonància. En aquest estudi es va utilitzar un model porcí (n=10) sotmesos a oclusió de l'arteria descendent anterior durant 90 minuts, i no es van veure diferències en la fibrosi remota en les diferents tincions microscòpiques respecte a controls (n=5) ni tampoc en l'expressió local de gens profibròtics, ni una setmana (n=5) ni un mes (n=5) post infart. Es van estudiar també mostres de necròpsia en 8 pacients amb antecedent d'infart antic

(> 6 mesos) sense evidenciar tampoc fibrosi remota. A més, es van estudiar per ressonància 14 pacients amb infart antic (> 6 mesos) reperfós, sense trobar diferències de VEC en els segments remots en comparació amb 9 controls. Els resultats d'aquest estudi translacional qüestionen el desenvolupament de fibrosi en el miocardi remot després d'un infart, però no es va fer determinació seqüencial de VEC en les mateixos segments en un mateix individu ¹⁵¹.

Els resultats dels estudis amb determinacions de VEC seqüencials al miocardi remot en pacients post-infart són bastant consistents amb petites variacions. En general, la majoria dels estudis han mostrat una relació directa i proporcional entre l'increment en el valor del VEC en el miocardi remot i l'increment en els volums ventriculars o l'empitjorament segmentari de la funció sistòlica. Un estudi recent (n=50) va mostrar que els segments no infartats, presentaven un augment subtil del VEC als 3 mesos de l'esdeveniment agut, i que aquells segments que presentaven deteriorament de la funció contràctil, eren aquells amb major increment de VEC ¹⁵². L'associació entre el VEC en els segments remots i el remodelat ventricular definit com augment de >20 % del DTDVE també ha estat establerta als 5 ± 2 mesos de seguiment en un altre treball ¹⁵³. Contràriament, un estudi en 42 individus amb infart tractats amb ICP, va mostrar que els valors de T1 natiu en els segments no infartats disminuïen als tres mesos de seguiment, de la mateixa manera que ho feia el valor de VEC en els pacients sense dilatació del VE. En els pacients que desenvolupaven dilatació ventricular (definida com un augment de VTDVE >15%) , els valors de VEC romanien similars i eren significativament majors que aquells sense dilatació ¹⁵⁴. Hi ha diferències metodològiques rellevants entre els estudis que poden explicar aquestes discrepàncies. En aquest últim treball es va definir el miocardi remot com aquell que no presentava realç tardà, amb el que és possible que

aquells segments amb edema, que també mostren augment basal del VEC, s'hagin inclòs a l'àrea remota, explicant l'absència de canvis en el seguiment.

Fins i tot en subjectes amb cardiopatia isquèmica estable, s'ha demostrat en un estudi recent observacional (n=665) que aquells individus amb valors més alts de T1 nadiu i VEC en el miocardi no infartat van presentar majors taxes de mortalitat durant un seguiment mitjà de 17 mesos ¹⁵⁵.

En la nostra sèrie de malalts, durant els 6 mesos de seguiment hem evidenciat un augment sistemàtic, encara que de poca magnitud, del VEC entre l'estudi basal i el seguiment en la majoria dels casos.

El VEC basal va presentar una correlació positiva amb el VTD indexat inicial, i el VEC al seguiment, tant amb els volums telediastòlic i telesistòlic indexats basals com als 6 mesos. L'increment de VEC als 6 mesos respecte a l'estudi inicial, es va correlacionar de manera positiva amb el DTDVE en l'estudi de seguiment. Carberry et al, varen mostrar una correlació positiva entre l'increment del VEC i el Δ del volum telediastòlic als 6 mesos en pacients amb SCAEST, a més d'evidenciar una correlació negativa entre l'increment de VEC i el canvi en la fracció d'ejecció ¹⁵⁶. En el nostre projecte, vam evidenciar una correlació negativa entre el Δ VEC i la FE a l'ingrés. Malgrat això, en la nostra sèrie l'increment observat del VEC no es va correlacionar amb els canvis en els volums ventriculars, que sí van estar clarament correlacionats amb la grandària inicial de l'infart per RMC. Les nostres dades suggereixen que la severitat de la seqüela induïda pel SCAEST és un factor més important que els canvis secundaris induïts posteriorment en el miocardi remot per al desenvolupament de remodelat advers ventricular esquerre. Cal esmentar que els canvis de VEC són molt subtils (increment mig de VEC de 1.67% en la nostra població) i que els pacients que tenien les dues

determinacions de VEC (basal i seguiment) eren escassos (n =33) pel que es fa difícil trobar diferències estadísticament significatives.

Una troballa interessant del nostre estudi va ser la correlació entre els nivells de AXL en la fase aguda (dies 1 i 7) i els valors de VEC remot en la RMC basal, que es manté en el seguiment. Podem especular que el sistema GAS6-TAM, involucrat en la resposta inflamatòria i reparativa post-infart, pot induir canvis en el miocardi remot ja evidents en una fase precoç. Seria més plausible pensar que el sistema GAS6-TAM participaria en la resposta reparativa a l'àrea infartada, potser de manera no proporcional a la grandària de l'infart en vista de l'absència de correlació en el nostre estudi entre GAS6 o sAXL i grandària de l'infart. En aquest sentit, els canvis aguts i crònics observats en el VEC remot estarien més en relació amb l'augment de l'estrès de la paret miocàrdica, com han suggerit altres autors ^{157,158}. A favor d'aquesta possibilitat està la correlació positiva en el nostre estudi entre la grandària de l'infart en el realç tardà de la RMC inicial i l'increment en els valors de VEC durant el seguiment.

En un estudi previ del nostre grup, on es van estudiar fins a 26 marcadors bioquímics i 4 hematològics possiblement relacionats amb el recanvi de la matriu extracel·lular cardíaca i l'homeòstasi, es va demostrar que els nivells sèrics de galectina 3 en la fase aguda del SCAEST van ser l'únic marcador precoç de l'augment del VEC remot als 6 mesos ¹⁵⁹. A nivell experimental, s'ha demostrat que l'expressió de galectina 3 en el miocardi de cors hipertròfics marca i es colocalitza en els macròfags cardíacs activats. El tractament amb galectina 3 recombinant indueix proliferació fibroblàstica i producció de col·lagen ¹⁶⁰. La galectina 3 és essencial per a l'activació i proliferació dels miofibroblastes induïda pel TGF-Beta, així com per a la producció de la matriu extracel·lular ¹⁶¹. A més, la galectina 3 té una expressió augmentada en la fase aguda de

l'infart en ratolí ¹⁶², i la disrupció genètica o la inhibició farmacològica de la galectina 3 inhibeix la fibrosi cardíaca i la disfunció ventricular esquerra en models experimentals de remodelat ventricular ¹⁶³. A nivell clínic, la galectina 3 s'ha correlacionat de manera significativa amb alguns biomarcadors involucrats en el recanvi de la matriu extracel·lular durant la fase inicial en pacients amb SCAEST i també en pacients amb insuficiència cardíaca ¹⁰⁶. De fet, aquest marcador és un reconegut predictor independent de remodelat advers ventricular i de mortalitat en la insuficiència cardíaca aguda o crònica ^{164,165} i en les guies ACC/AHA d'insuficiència cardíaca es proposa com un marcador útil en l'estratificació del risc d'hospitalització o mort ¹⁶⁶. És interessant la troballa en el nostre estudi d'una correlació positiva encara que feble entre la galectina 3 i sAXL, la qual cosa recolza la participació de tots dos sistemes en l'homeòstasi de la funció dels macròfags i dels miofibroblasts cardíacs. Els mecanismes exactes que expliquin la relació existent entre sAXL i el VEC mereixen una recerca específica i dirigida.

LIMITACIONES

6.- LIMITACIONS

En el nostre treball, el seguiment per ressonància va ser de 6 mesos, el que probablement pugui ser insuficient per trobar grans canvis en els volums ventriculars i en el remodelat, que podria haver estat subestimat. Per altra banda, els pacients amb infarts més extensos i amb classificació de Killip més alta, són probablement els que facin més remodelat. La població estudiada presenta una proporció de pacients en Killip >2 molt petita el que també pot atenuar els efectes trobats. A més els pacient inestables i en insuficiència cardíaca, sovint no es poden fer una ressonància cardíaca (situació hemodinàmica, intolerància al decúbit...). Seria necessari estudiar aquesta població més malalta per extreure conclusions més sòlides.

GAS6 i AXL es varen mesurar utilitzant una tècnica de ELISA, i no tenim informació de l'expressió local d'aquestes proteïnes a nivell dels teixits afectats. No es pot assegurar si l'augment de sAXL observat, és la causa o la conseqüència del remodelat advers. Per aclarir aquest aspecte, es requereixen estudis histològics d'experimentació.

Per l'estudi de VEC, disposem de pocs pacients (n=33) en que els estudis basal i de seguiment es fessin amb un protocol adequat (mesura de T1 basal i ≥ 15 minuts post administració de contrast), pel que es fa difícil també trobar diferències estadísticament significatives. Es necessitarien més estudis histològics i experimentals per acabar d'esbrinar el paper dels diferents components d'aquest sistema en la inflamació, reparació tissular i cicatrització després d'un infart de miocardi.

APLICABILITAT CLÍNICA

7.- APLICABILITAT CLÍNICA

Els resultats del nostre treball aporten noves dades sobre la fisiopatologia del remodelat post infart, mostrant que la via GAS6-TAM juga un paper en la inflamació i reparació miocàrdica.

El fet que els nivells de AXL circulant en la fase aguda de l'infart es correlacionin amb el remodelat advers durant el seguiment i amb la fibrosi miocàrdica difusa, fan plantejar que la detecció precoç d'aquesta proteïna pugui ser útil com a marcador pronòstic. Al ser un marcador independent de la determinació de BNP o el tamany de l'infart, ajudaria a identificar aquells potencials casos on valdria la pena intensificar la supressió del sistema renina-angiotensina-aldosterona o del sistema simpàtic durant els mesos posteriors a l'esdeveniment coronari. El fet que els nivells de sAXL siguin més alts en pacients amb insuficiència cardíaca, confirma l'important paper que juga aquest sistema en la inflamació crònica i el seu potencial valor pronòstic.

Per altra banda la mesura de GAS6 plasmàtic sembla estar relacionada amb un major risc d'esdeveniments aguts, el que fa suposar també que podria ser utilitzat com un marcador de risc, podent-se intensificar el control dels factors de risc cardiovascular i el tractament amb estatines en aquells pacients amb nivells més baixos.

CONCLUSIONS

8.- CONCLUSIONS

1. Els nivells de AXL circulants augmenten de manera progressiva després de la SCAEST, i són més alts als 6 mesos que els valors basals trobats en un grup control.
2. La presència d'insuficiència cardíaca durant la fase aguda de la SCAEST s'associa a nivells més alts de sAXL, que es mantenen durant el seguiment.
3. AXL és un predictor de remodelat ventricular advers, independent d'altres predictors coneguts com BNP o grandària de l'infart.
4. Els nivells plasmàtics de GAS6 són menors en la fase aguda de l'infart comparat amb els controls, reflectint probablement un major risc d'esdeveniments cardiovasculars.
5. Els nivells plasmàtics de sAXL en qualsevol moment de l'extracció es correlacionen amb l'expansió de la matriu extracel·lular (augment del VEC) tant en l'estudi basal com en l'estudi de seguiment.
6. El sistema GAS6-TAM podria intervenir en una nova via molecular relacionada amb la inflamació tissular i la insuficiència cardíaca.

BIBLIOGRAFIA

9.- BIBLIOGRAFIA

1. Moran, A. E. *et al.* Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation* **129**, 1483–92 (2014).
2. Sanchis-Gomar, F., Perez-Quilis, C., Leischik, R. & Lucia, A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann. Transl. Med.* **4**, 256–256 (2016).
3. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–82 (2000).
4. Roger, V. L. *et al.* Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* **292**, 344–50 (2004).
5. Gajarsa, J. J. & Kloner, R. A. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail. Rev.* **16**, 13–21 (2011).
6. Westman, P. C. *et al.* Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 2050–2060 (2016).
7. Kramer, D. G. *et al.* Quantitative Evaluation of Drug or Device Effects on Ventricular Remodeling as Predictors of Therapeutic Effects on Mortality in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**, 392–406 (2010).
8. McKay, R. G. *et al.* Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* **74**, 693–702 (1986).
9. Bhatt, A. S., Ambrosy, A. P. & Velazquez, E. J. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. *Curr. Cardiol. Rep.* **19**, 71 (2017).
10. Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* **33**, 2569–619 (2012).
11. Bolognese, L. *et al.* Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation* **106**, 2351–7 (2002).
12. Flachskampf, F. A. *et al.* Cardiac imaging after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **32**, 272–283 (2011).
13. Shinde, A. V. & Frangogiannis, N. G. Mechanisms of Fibroblast Activation in the Remodeling Myocardium. *Curr. Pathobiol. Rep.* **5**, 145–152 (2017).
14. Mezzaroma, E. *et al.* The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19725–19730 (2011).
15. Van Tassell, B. W., Toldo, S., Mezzaroma, E. & Abbate, A. Targeting Interleukin-1 in Heart Disease. *Circulation* **128**, 1910–1923 (2013).
16. Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**, 24–35 (2013).
17. Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ. Res.* **112**, 1624–33 (2013).
18. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A.

- Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–63 (2002).
19. Frangogiannis, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 255–65 (2014).
 20. Shinde, A. V & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **70**, 74–82 (2014).
 21. Altara, R. *et al.* Temporal cardiac remodeling post-myocardial infarction: dynamics and prognostic implications in personalized medicine. *Heart Fail. Rev.* (2015). doi:10.1007/s10741-015-9513-8
 22. Maskrey, B. H., Megson, I. L., Whitfield, P. D. & Rossi, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: A focus on cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1001–1006 (2011).
 23. Wrigley, B. J., Lip, G. Y. H. & Shantsila, E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **13**, 1161–1171 (2011).
 24. Lindner, D. *et al.* Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure. *Basic Res. Cardiol.* **109**, 428 (2014).
 25. Nahrendorf, M., Pittet, M. J. & Swirski, F. K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* **121**, 2437–45 (2010).
 26. Huang, M., Yang, D., Xiang, M. & Wang, J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail. Rev.* **20**, 25–38 (2015).
 27. Fanola, C. L. *et al.* Interleukin-6 and the Risk of Adverse Outcomes in Patients After an Acute Coronary Syndrome: Observations From the SOLID-TIMI 52 (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52) Trial. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e005637 (2017).
 28. Seropian, I. M., Toldo, S., Van Tassel, B. W. & Abbate, A. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1593–603 (2014).
 29. Giugliano, G. R., Giugliano, R. P., Gibson, C. M. & Kuntz, R. E. Meta-analysis of corticosteroid treatment in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **91**, 1055–9 (2003).
 30. Pivonello, R. *et al.* in *Frontiers of hormone research* **46**, 54–65 (2016).
 31. Michael Gibson, C. *et al.* Association of non-steroidal anti-inflammatory drugs with outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with fibrinolytic therapy: an ExTRACT-TIMI 25 analysis. *J. Thromb. Thrombolysis* **27**, 11–17 (2009).
 32. Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161–72 (1990).
 33. Faxon, D. P. *et al.* The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 1199–204 (2002).
 34. Alfonso, F. & Angiolillo, D. J. Targeting p-selectin during coronary interventions: the elusive link between inflammation and platelets to prevent myocardial damage. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 2056–9 (2013).
 35. Mahaffey, K. W. *et al.* Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the

- COMplement inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial. *Circulation* **108**, 1176–83 (2003).
36. Granger, C. B. *et al.* Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. *Circulation* **108**, 1184–90 (2003).
 37. APEX AMI Investigators *et al.* Pexelizumab for Acute ST-Elevation Myocardial Infarction in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *JAMA* **297**, 43 (2007).
 38. Abbate, A. *et al.* Interleukin-1 blockade with anakinra to prevent adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot study). *Am. J. Cardiol.* **105**, 1371–1377.e1 (2010).
 39. Abbate, A. *et al.* Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCU-ART2) pilot study]. *Am. J. Cardiol.* **111**, 1394–400 (2013).
 40. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
 41. Fuchs, M. *et al.* Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J.* **17**, 2118–20 (2003).
 42. Kobara, M. *et al.* Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc. Res.* **87**, 424–30 (2010).
 43. Yang, Z., Zingarelli, B. & Szabó, C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **101**, 1019–26 (2000).
 44. Krishnamurthy, P. *et al.* IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ. Res.* **104**, e9-18 (2009).
 45. Padfield, G. J. *et al.* Cardiovascular effects of tumour necrosis factor α antagonism in patients with acute myocardial infarction: a first in human study. *Heart* **99**, 1330–5 (2013).
 46. Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6R MR) Consortium *et al.* The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet (London, England)* **379**, 1214–24 (2012).
 47. Hudson, M. P. *et al.* Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, 15–20 (2006).
 48. Cerisano, G. *et al.* Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial. *Eur. Heart J.* **35**, 184–191 (2014).
 49. Cerisano, G. *et al.* Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor after reperfused ST-elevation myocardial infarction treated with doxycycline. Insights from the TIPTOP trial. *Int. J. Cardiol.* **197**, 147–153 (2015).
 50. Gullestad, L. *et al.* Intravenous immunoglobulin does not reduce left ventricular remodeling in patients with myocardial dysfunction during hospitalization after

- acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **168**, 212–218 (2013).
51. Liu, M.-L. *et al.* Anti-Inflammatory Peptides From Cardiac Progenitors Ameliorate Dysfunction After Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e001101–e001101 (2014).
 52. Somasuntharam, I. *et al.* Knockdown of TNF- α by DNAzyme gold nanoparticles as an anti-inflammatory therapy for myocardial infarction. *Biomaterials* **83**, 12–22 (2016).
 53. Salvador, A. M. *et al.* Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulates Left Ventricular Leukocyte Infiltration, Cardiac Remodeling, and Function in Pressure Overload–Induced Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, e003126 (2016).
 54. Deftereos, S. *et al.* Anti-Inflammatory Treatment With Colchicine in Acute Myocardial Infarction Clinical Perspective. *Circulation* **132**, 1395–1403 (2015).
 55. Fujisue, K. *et al.* Colchicine Improves Survival, Left Ventricular Remodeling, and Chronic Cardiac Function After Acute Myocardial Infarction. *Circ. J.* **81**, 1174–1182 (2017).
 56. O’Donoghue, M. L. *et al.* Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **315**, 1591–9 (2016).
 57. Moreira, D. M., Lueneberg, M. E., da Silva, R. L., Fattah, T. & Gottschall, C. A. M. Methotrexate Therapy in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **22**, 538–545 (2017).
 58. Hao, H. *et al.* Loss of Endothelial CXCR7 Impairs Vascular Homeostasis and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Clinical Perspective. *Circulation* **135**, 1253–1264 (2017).
 59. Bot, I. *et al.* A novel CCR2 antagonist inhibits atherogenesis in apoE deficient mice by achieving high receptor occupancy. *Sci. Rep.* **7**, 52 (2017).
 60. Ohshima, K. *et al.* Inhibition of MCP-1/CCR2 signaling pathway is involved in synergistic inhibitory effects of irbesartan with rosuvastatin on vascular remodeling. *J. Am. Soc. Hypertens.* **6**, 375–384 (2012).
 61. Manhenke, C. *et al.* The relationship between markers of extracellular cardiac matrix turnover: infarct healing and left ventricular remodelling following primary PCI in patients with first-time STEMI. *Eur. Heart J.* **35**, 395–402 (2014).
 62. van der Meer, J. H. M., van der Poll, T. & van ’t Veer, C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood* **123**, 2460–9 (2014).
 63. Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4976–85 (1993).
 64. Nakano, T. *et al.* Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J. Biol. Chem.* **270**, 5702–5 (1995).
 65. Avanzi, G. C. *et al.* GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp. Hematol.* **25**, 1219–26 (1997).
 66. Lemke, G. & Rothlin, C. V. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 327–36 (2008).
 67. Rothlin, C. V., Carrera-Silva, E. A., Bosurgi, L. & Ghosh, S. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 355–91 (2015).
 68. Nagata, K. *et al.* Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*

- 271**, 30022–7 (1996).
69. Tjwa, M. *et al.* Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood* **111**, 4096–105 (2008).
 70. Camenisch, T. D., Koller, B. H., Earp, H. S. & Matsushima, G. K. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Immunol.* **162**, 3498–503 (1999).
 71. Choi, J.-Y. *et al.* Mer signaling increases the abundance of the transcription factor LXR to promote the resolution of acute sterile inflammation. *Sci. Signal.* **8**, ra21 (2015).
 72. Alciato, F., Sainaghi, P. P., Sola, D., Castello, L. & Avanzi, G. C. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 869–875 (2010).
 73. Bárcena, C. *et al.* Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J. Hepatol.* **63**, 670–678 (2015).
 74. Uehara, S., Handa, H., Gotoh, K., Tomita, H. & Sennshuu, M. Plasma concentrations of growth arrest-specific protein 6 and protein S in patients with acute pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 1567–73 (2009).
 75. Stalder, G. *et al.* Study of Early Elevated Gas6 Plasma Level as a Predictor of Mortality in a Prospective Cohort of Patients with Sepsis. *PLoS One* **11**, e0163542 (2016).
 76. Lemke, G. & Burstyn-Cohen, T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1209**, 23–9 (2010).
 77. Vandivier, R. W., Henson, P. M. & Douglas, I. S. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* **129**, 1673–82 (2006).
 78. Zagórska, A., Través, P. G., Lew, E. D., Dransfield, I. & Lemke, G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat. Immunol.* **15**, 920–928 (2014).
 79. Nguyen, K.-Q., Tsou, W.-I., Kotenko, S. & Birge, R. B. TAM receptors in apoptotic cell clearance, autoimmunity, and cancer. *Autoimmunity* **46**, 294–7 (2013).
 80. Szász, A. *et al.* The expression of TAM receptors and their ligand Gas6 is downregulated in psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* **71**, 215–6 (2013).
 81. Zizzo, G., Guerrieri, J., Dittman, L. M., Merrill, J. T. & Cohen, P. L. Circulating levels of soluble MER in lupus reflect M2c activation of monocytes/macrophages, autoantibody specificities and disease activity. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R212 (2013).
 82. Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. & Cohen, P. L. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J. Immunol.* **189**, 3508–20 (2012).
 83. Thorp, E. & Tabas, I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1089–95 (2009).
 84. Goruppi, S., Ruaro, E. & Schneider, C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **12**, 471–80 (1996).
 85. Melaragno, M. G. *et al.* Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 881–7 (2004).
 86. Graham, D. K., DeRyckere, D., Davies, K. D. & Earp, H. S. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 769–85 (2014).

87. Ekman, C., Stenhoff, J. & Dahlbäck, B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 838–44 (2010).
88. Stenhoff, J., Dahlbäck, B. & Hafizi, S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 871–878 (2004).
89. Wan, E. *et al.* Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ. Res.* **113**, 1004–12 (2013).
90. Batlle, M. *et al.* AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* **173**, 402–9 (2014).
91. Batlle, M. *et al.* Use of serum levels of high sensitivity troponin T, galectin-3 and C-terminal propeptide of type I procollagen at long term follow-up in heart failure patients with reduced ejection fraction: Comparison with soluble AXL and BNP. *Int. J. Cardiol.* **225**, 113–119 (2016).
92. Liu, Y.-W. *et al.* Elevated serum levels of soluble Axl in acute coronary syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **349**, 124–9 (2015).
93. Alciato, F. *et al.* Development and Validation of an ELISA Method for Detection of Growth Arrest Specific 6 (GAS6) Protein in Human Plasma. *J. Immunoass. Immunochem.* **29**, 167–180 (2008).
94. Andreu, D. *et al.* 3D delayed-enhanced magnetic resonance sequences improve conducting channel delineation prior to ventricular tachycardia ablation. *Europace* **17**, 938–45 (2015).
95. Perea, R. J. *et al.* T1 mapping: characterisation of myocardial interstitial space. *Insights Imaging* **6**, 189–202 (2015).
96. Moon, J. C. *et al.* Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **15**, 92 (2013).
97. Mewton, N., Liu, C. Y., Croisille, P., Bluemke, D. & Lima, J. A. C. Assessment of Myocardial Fibrosis With Cardiovascular Magnetic Resonance. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 891–903 (2011).
98. Schelbert, E. B. *et al.* Myocardial extravascular extracellular volume fraction measurement by gadolinium cardiovascular magnetic resonance in humans: Slow infusion versus bolus. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* (2011). doi:10.1186/1532-429X-13-16
99. Lee, J. J. *et al.* Myocardial T1 and extracellular volume fraction mapping at 3 tesla. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* (2011). doi:10.1186/1532-429X-13-75
100. Schelbert, E. B. & Messroghli, D. R. State of the Art: Clinical Applications of Cardiac T1 Mapping. *Radiology* **278**, 658–76 (2016).
101. Fontana, M. *et al.* Comparison of T1 mapping techniques for ECV quantification. Histological validation and reproducibility of ShMOLLI versus multibreath-hold T1 quantification equilibrium contrast CMR. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **14**, 88 (2012).
102. Garg, P. *et al.* Acute Infarct Extracellular Volume Mapping to Quantify Myocardial Area at Risk and Chronic Infarct Size on Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging. *Circ. Cardiovasc. Imaging* (2017). doi:10.1161/CIRCIMAGING.117.006182
103. Kidambi, A. *et al.* Myocardial Extracellular Volume Estimation by CMR Predicts Functional Recovery Following Acute MI. *JACC. Cardiovasc. Imaging* (2016). doi:10.1016/j.jcmg.2016.06.015

104. Perea Palazón, R. J. *et al.* Parametric techniques for characterizing myocardial tissue by magnetic resonance imaging (part 1): T1 mapping. *Radiologia* **58**, 164–77 (2016).
105. Messroghli, D. R. *et al.* Modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) for high-resolution T1 mapping of the heart. *Magn. Reson. Med.* **52**, 141–6 (2004).
106. Weir, R. A. P. *et al.* Galectin-3 and Cardiac Function in Survivors of Acute Myocardial Infarction. *Circ. Hear. Fail.* **6**, 492–498 (2013).
107. Lin, Y.-H. *et al.* The relationship between serum galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in heart failure patients. *Clin. Chim. Acta* **409**, 96–99 (2009).
108. Sharma, U. C. *et al.* Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* **110**, 3121–8 (2004).
109. Wong, T. C. *et al.* Association between extracellular matrix expansion quantified by cardiovascular magnetic resonance and short-term mortality. *Circulation* **126**, 1206–16 (2012).
110. Balogh, I., Hafizi, S., Stenhoff, J., Hansson, K. & Dahlbäck, B. Analysis of Gas6 in Human Platelets and Plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1280–1286 (2005).
111. Zöller, B., García de Frutos, P. & Dahlbäck, B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* **85**, 3524–31 (1995).
112. Stanton, L. W. *et al.* Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ. Res.* **86**, 939–45 (2000).
113. Borgel, D. *et al.* Plasma Gas6 levels and coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* **101**, 215–6 (2009).
114. Lee, C.-H. *et al.* Plasma concentrations predict aortic expression of growth-arrest-specific protein 6 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *PLoS One* **8**, e79452 (2013).
115. Jiang, L., Liu, C. Y., Yang, Q. F., Wang, P. & Zhang, W. Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 738–43 (2009).
116. EKMAN, C., STENHOFF, J. & DAHLBÄCK, B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 838–844 (2010).
117. Muñoz, X. *et al.* Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke. *Thromb. Haemost.* **98**, 406–412 (2007).
118. Muñoz, X. *et al.* Human Vitamin K-Dependent GAS6: Gene Structure, Allelic Variation, and Association with Stroke. *Hum. Mutat.* **23**, 506–512 (2004).
119. Wu, G., McBride, D. W. & Zhang, J. H. Axl activation attenuates neuroinflammation by inhibiting the TLR/TRAF/NF- κ B pathway after MCAO in rats. *Neurobiol. Dis.* **110**, 59–67 (2018).
120. Lee, C.-H. *et al.* Expression of growth arrest-specific protein 6 and Axl molecules in the left internal mammary artery of patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J. Clin. Pathol.* **67**, 506–511 (2014).
121. Ekman, C., Gottsäter, A., Lindblad, B. & Dahlbäck, B. Plasma concentrations of Gas6 and soluble Axl correlate with disease and predict mortality in patients with critical limb ischemia. *Clin. Biochem.* **43**, 873–876 (2010).
122. Ekman, C., Site, D. F., Gottsäter, A., Lindblad, B. & Dahlbäck, B. Plasma

- concentrations of growth arrest specific protein 6 and the soluble form of its tyrosine kinase receptor Axl as markers of large abdominal aortic aneurysms. *Clin. Biochem.* **43**, 110–114 (2010).
123. Fernández-Fernández, L., Bellido-Martín, L. & García de Frutos, P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb. Haemost.* **100**, 604–10 (2008).
 124. Laurance, S., Lemarié, C. A. & Blostein, M. D. Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Adv. Nutr.* **3**, 196–203 (2012).
 125. Jin, C. *et al.* Gas6 delays senescence in vascular smooth muscle cells through the PI3K/ Akt/FoxO signaling pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 1151–66 (2015).
 126. Korshunov, V. A., Mohan, A. M., Georger, M. A. & Berk, B. C. Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ. Res.* **98**, 1446–1452 (2006).
 127. Durand, E. In Vivo Induction of Endothelial Apoptosis Leads to Vessel Thrombosis and Endothelial Denudation: A Clue to the Understanding of the Mechanisms of Thrombotic Plaque Erosion. *Circulation* **109**, 2503–2506 (2004).
 128. Murao, K. *et al.* A product of growth arrest-specific gene 6 modulates scavenger receptor expression in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **459**, 363–6 (1999).
 129. Clauser, S. *et al.* Increased secretion of gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb. Haemost.* **107**, 140–149 (2012).
 130. Melaragno, M. G., Fridell, Y. W. & Berk, B. C. The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 250–3 (1999).
 131. Chen, Y. *et al.* Testosterone delays vascular smooth muscle cell senescence and inhibits collagen synthesis via the Gas6/Axl signaling pathway. *Age (Omaha)*. **38**, 60 (2016).
 132. Collett, G. *et al.* Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ. Res.* **92**, 1123–9 (2003).
 133. Melaragno, M. G. *et al.* Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ. Res.* **83**, 697–704 (1998).
 134. Angelillo-Scherrer, A. *et al.* Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat. Med.* **7**, 215–21 (2001).
 135. Avanzi, G. C. *et al.* GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* **91**, 2334–2340 (1998).
 136. Borgel, D. *et al.* Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* **34**, 219–22 (2006).
 137. Son, B. K. *et al.* Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ. Res.* **98**, 1024–1031 (2006).
 138. Son, B.-K., Akishita, M., Iijima, K., Eto, M. & Ouchi, Y. Mechanism of pi-induced vascular calcification. *J. Atheroscler. Thromb.* **15**, 63–8 (2008).
 139. Hung, Y. J., Lee, C. H., Chu, N. F. & Shieh, Y. S. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care* **33**, 1840–1844 (2010).
 140. Dihingia, A., Kalita, J. & Manna, P. Implication of a novel Gla-containing protein, Gas6 in the pathogenesis of insulin resistance, impaired glucose homeostasis, and inflammation: A review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **128**, 74–82 (2017).
 141. Sunbul, M. *et al.* Growth arrest-specific 6 and cardiometabolic risk factors in patients with psoriasis. *Cardiovasc. Ther.* **33**, 56–61 (2015).

142. Zhao, Y.-F. *et al.* Growth Arrest-Specific 6 Exacerbates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy. *Hypertension* **67**, 118–29 (2016).
143. Van Linthout, S. & Tschöpe, C. Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr. Heart Fail. Rep.* **14**, 251–265 (2017).
144. Yasue, H. *et al.* Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* **90**, 195–203 (1994).
145. Garcia-Alvarez, A. *et al.* Relation of plasma brain natriuretic peptide levels on admission for ST-elevation myocardial infarction to left ventricular end-diastolic volume six months later measured by both echocardiography and cardiac magnetic resonance. *Am. J. Cardiol.* **104**, 878–82 (2009).
146. Bárcena, C. *et al.* Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J. Hepatol.* **63**, 670–8 (2015).
147. Bellan, M. *et al.* Gas6 as a putative noninvasive biomarker of hepatic fibrosis. *Biomark. Med.* **10**, 1241–1249 (2016).
148. Howangyin, K.-Y. *et al.* Myeloid-Epithelial-Reproductive Receptor Tyrosine Kinase and Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 Co-Ordinately Improve Remodeling After Myocardial Infarction via Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor. *Circulation* CIRCULATIONAHA.115.020857- (2016). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020857
149. Beltrami, C. A. *et al.* Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* **89**, 151–63 (1994).
150. van den Borne, S. W. M. *et al.* Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 30–37 (2010).
151. Hervas, A. *et al.* A Multidisciplinary Assessment of Remote Myocardial Fibrosis After Reperfused Myocardial Infarction in Swine and Patients. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* (2016). doi:10.1007/s12265-016-9698-9
152. Garg, P. *et al.* Extra-cellular expansion in the normal, non-infarcted myocardium is associated with worsening of regional myocardial function after acute myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **19**, 73 (2017).
153. Bulluck, H. *et al.* Automated Extracellular Volume Fraction Mapping Provides Insights Into the Pathophysiology of Left Ventricular Remodeling Post-Reperfused ST-Elevation Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* (2016). doi:10.1161/JAHA.116.003555
154. Biesbroek, P. S. *et al.* Changes in remote myocardial tissue after acute myocardial infarction and its relation to cardiac remodeling: A CMR T1 mapping study. *PLoS One* (2017). doi:10.1371/journal.pone.0180115
155. Puntmann, V. O. *et al.* Native T1 and ECV of Noninfarcted Myocardium and Outcome in Patients With Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2018). doi:10.1016/j.jacc.2017.12.020
156. Carberry, J. *et al.* Remote Zone Extracellular Volume and Left Ventricular Remodeling in Survivors of ST-Elevation Myocardial Infarction. *Hypertension* (2016). doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07222
157. Litwin, S. E. Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats - Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition. *Circulation* (1991). doi:10.1161/01.CIR.83.3.1028
158. Talman, V. & Ruskoaho, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research* (2016). doi:10.1007/s00441-016-2431-9

159. Perea, R. J. *et al.* Utility of galectin-3 in predicting post-infarct remodeling after acute myocardial infarction based on extracellular volume fraction mapping. *Int. J. Cardiol.* **223**, 458–464 (2016).
160. Sharma, U. C. *et al.* Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* (2004). doi:10.1161/01.CIR.0000147181.65298.4D
161. Henderson, N. C. *et al.* Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.0511167103
162. Hashmi, S. & Al-Salam, S. Galectin-3 is expressed in the myocardium very early post-myocardial infarction. *Cardiovasc. Pathol.* (2015). doi:10.1016/j.carpath.2014.12.001
163. Yu, L. *et al.* Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ. Hear. Fail.* (2013). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.971168
164. Van Der Velde, A. R. *et al.* Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure data from CORONA and COACH. *Circ. Hear. Fail.* (2013). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000129
165. Lok, D. J. *et al.* Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin. Res. Cardiol.* (2013). doi:10.1007/s00392-012-0500-y
166. Yancy, C. W. *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation* (2013). doi:10.1161/CIR.0b013e31829e8776

Serum levels of Growth Arrest-Specific 6 protein and soluble AXL in patients with ST-segment elevation myocardial infarction

European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care
1–9

© The European Society of Cardiology 2017

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/2048872617740833

journals.sagepub.com/home/acc



Guillem Caldentey¹, Pablo García De Frutos², Helena Cristóbal², Manel Garabito^{2,3}, Antonio Berruezo^{1,3}, Xavier Bosch^{1,3}, Rodolfo San Antonio¹, Eduardo Flores-Umanzor¹, Rosario J Perea^{3,4}, Teresa M De Caralt^{3,4}, Jany Rodríguez^{1,3} and José T Ortiz-Pérez^{1,3}

Abstract

Background: Serum soluble AXL (sAXL) and its ligand, Growth Arrest-Specific 6 protein (GAS6), intervene in tissue repair processes. AXL is increased in end-stage heart failure, but the role of GAS6 and sAXL in ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) is unknown.

Objectives: To study the association of sAXL and GAS6 acutely and six months following STEMI with heart failure and left ventricular remodelling.

Methods: GAS6 and sAXL were measured by enzyme-linked immunosorbent assay at one day, seven days and six months in 227 STEMI patients and 20 controls. Contrast-enhanced magnetic resonance was performed during admission and at six months to measure infarct size and left ventricular function.

Results: GAS6, but not sAXL, levels during admission were significantly lower in STEMI than in controls. AXL increased progressively over time ($p < 0.01$), while GAS6 increased only from day 7. GAS6 or sAXL did not correlate with brain natriuretic peptide or infarct size. However, patients with heart failure (Killip > 1) had higher values of sAXL at day 1 (48.9 ± 11.9 vs. 44.0 ± 10.7 ng/ml; $p < 0.05$) and at six months (63.3 ± 15.4 vs. 55.9 ± 13.7 ng/ml; $p < 0.05$). GAS6 levels were not different among subjects with heart failure or left ventricular remodelling. By multivariate analysis including infarct size, Killip class and sAXL at seven days, only the last two were independent predictors of left ventricular remodelling (odds ratio 2.24 (95% confidence interval: 1.08–4.63) and odds ratio 1.04 (95% confidence interval: 1.00–1.08) respectively).

Conclusion: sAXL levels increased following STEMI. Patients with heart failure and left ventricular remodelling have higher sAXL levels acutely and at six month follow-up. These findings suggest a potential role of the GAS6–AXL system in the pathophysiology of left ventricular remodelling following STEMI.

Keywords

AXL receptor tyrosine kinase, GAS6, myocardial infarction, heart failure, cardiac remodelling

Date received: 18 April 2017; accepted: 12 October 2017

¹Institut Clínic Cardiovascular, Hospital Clínic Barcelona, Spain

²Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC and IDIBAPS, Barcelona, Spain

³Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain

⁴Centre de Diagnòstic per la Imatge, Hospital Clínic Barcelona, Spain

Corresponding author:

José T Ortiz-Pérez, Institut Clínic Cardiovascular, Hospital Clínic, Villarroel 170, Stairs #1, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain.

Email: jtortiz@clinic.ub.es

Introduction

Although the prognosis of acute coronary syndrome has improved in the last 30 years, it remains the main cause of mortality in Western countries.¹ In spite of an optimal coronary reperfusion and the initiation of pharmacologic treatment, the incidence of adverse left ventricular remodelling after an ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) remains high.²

During the acute phase of STEMI, necrotic myocytes are progressively replaced by fibrotic tissue by an active and complex process involving multiple cell types.^{3,4} Inflammation is highly variable across individuals⁵ and an excessive response can have catastrophic consequences.⁶ Therefore, repair of injured tissues requires timely activation of endogenous inhibitory pathways that restrain pro-inflammatory signals.⁷ Inflammation and fibrosis formation after STEMI is an area of interest where potential new therapeutic targets could be found.^{8,9}

The product of Growth Arrest-Specific gene 6 (GAS6) is a vitamin K-dependent protein which acts as ligand of a transmembrane tyrosine kinase receptor family including three members, AXL, MerTK and Tyro3, commonly known as TAM receptors.¹⁰ GAS6 activation of the TAM receptors plays a key role in inflammation modulation in sepsis and in tissue injury.^{11,12} TAM receptors are expressed with more or less intensity depending on tissue type, AXL being the one that predominates in cardiac tissue.

The TAM system appears to interact with several phagocytic networks.¹³ Myocyte efferocytosis,¹⁴ innate immunity regulation,¹⁵ macrophages differentiation, fibrosis and vascular integrity repair are TAM regulated processes that could contribute to tissue plasticity and repair. Circulating levels of the extracellular part of TAM receptors can be detected in blood, forming a stable complex with GAS6, due to the effect of the Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing proteases (ADAMs) that mediate the cleavage of these proteins.¹⁶

Few studies have focused on the importance of the GAS6–TAM system in cardiac pathology. A recent publication showed that AXL expression is increased in heart failure of ischaemic or non-ischaemic origin.¹⁷ There is scarce information about the role of GAS6–TAM in acute myocardial infarction. The aim of this study was to determine whether GAS6–TAM components were increased in STEMI in the acute setting and at mid-term follow-up, and to evaluate a possible relation with the occurrence of heart failure and cardiac remodelling.

Methods

Population

From 2009, all patients admitted to the Coronary Care Unit with a first STEMI were requested to participate in several consecutive research studies looking at LV remodelling.^{18–21} Subjects referred to our centre for percutaneous coronary

intervention (PCI) through the STEMI Catalanian Network who were early transferred to the referring hospitals were not screened for participation in these studies. Subjects who stayed in the unit were included in the study if they presented with typical chest pain lasting more than 30 min and had ≥ 0.2 mV ST-segment elevation in leads V_1 to V_3 or 0.1 mV elevation in other contiguous electrocardiographic leads or suspicion of true posterior infarction and increased troponin I release. In all cases, PCI was the reperfusion therapy. At the physician's discretion and unless contraindicated, captopril or enalapril (at least 6.25 mg every 8 h or 2.5 mg every 12 h, respectively) and beta-blockers were initiated early, usually by 24 h from admission. Serum troponin I was measured during 48 h, every 6 h during the first 12 h and every 12 h thereafter. In addition, serum B-type natriuretic peptide (BNP) was measured 48 h after admission. Subjects with haemodynamic instability or any contraindications to undergo contrast-enhanced Cardiac Magnetic Resonance (ce-CMR) were not included. In addition, patients with concomitant fibrotic diseases of the liver, lungs or kidneys or any chronic inflammatory or autoimmune disease were excluded. A total of 294 subjects were screened for participation and 67 were excluded for different reasons. The remaining 227 STEMI patients (mean age 58 ± 12 years, 84% men, 43% anterior infarction, 81% Killip I) were included. The presence of heart failure was evaluated using Killip classification. The local Institutional Review Board approved the study and an informed consent was obtained from each participant. A group of 20 healthy subjects selected from an outpatient clinic who were matched for cardiovascular risk factors with the study population served as a control group.

Blood samples (10 ml) were drawn in the control group and in STEMI patients at days 1 and 7 from admission and at six month follow-up. All blood samples were centrifuged and post-processed similarly. The isolated serum was stored at -80°C until analysis.^{22,23}

Soluble AXL determination was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique, as previously described.²³ Antibody AF154 (R&D Systems) was used as capture antibody at a concentration of 2.0 $\mu\text{g/ml}$ and BAF154 (R&D Systems) and detection antibody was added at a concentration of 50 ng/ml. Detection of the specifically bound antibody was done through standard colorimetry at 450 nm. For GAS6 determination,²² AF885 (R&D Systems) was used as capture antibody and BAF885 as detection (also obtained from R&D Systems). C-reactive protein measurements were performed using the ELISA Human C-Reactive Protein (CRP) Duoset DY1707 from R&D Systems.

Ce-CMR

A standard ce-CMR study was performed in each patient during admission and at six months in a 1.5 T clinical scanner (SIEMENS, Erlangen, Germany or Signa CV HDxt, GE Medical Systems, Wisconsin, USA) equipped

Table 1. Main variable values based on occurrence of heart failure.

	Killip I n = 185 (81%)	Killip > I n = 42 (19%)	p value
Age (years)	59 ± 11	58 ± 14	0.571
Sex (% male)	83	86	0.676
GAS6 1d (ng/ml)	19.7 ± 5.4	21.2 ± 6.7	0.146
GAS6 7d (ng/ml)	19.6 ± 6.1	19.4 ± 6.1	0.861
GAS6 6m (ng/ml)	21.6 ± 5.7	22.3 ± 7.3	0.602
sAXL 1d (ng/ml)	44.0 ± 10.7	48.9 ± 11.9	0.047
sAXL 7d (ng/ml)	50.3 ± 11.9	53.2 ± 9.2	0.201
sAXL 6m (ng/ml)	55.9 ± 13.7	63.3 ± 15.4	0.011
CRP 1d (ng/ml)	76.7 ± 175.4	113.0 ± 107.2	0.004
CRP 7d (ng/ml)	64.0 ± 161.8	91.0 ± 110.5	0.033
CRP 6m (ng/ml)	8.3 ± 10.0	14.0 ± 20.0	0.123
Monocytes 1d (× 10 ⁹ /l)	0.60 ± 0.53	0.54 ± 0.22	0.927
Monocytes 7d (× 10 ⁹ /l)	0.63 ± 0.60	1.57 ± 2.24	0.010
Monocytes 6m (× 10 ⁹ /l)	0.48 ± 0.30	0.44 ± 0.27	0.717
BNP (pg/ml)	153 ± 127	246 ± 151	< 0.001
Tnl (ng/ml)	113 ± 124	283 ± 337	< 0.001
DM (%)	15	29	0.159
Hypertension (%)	40	43	0.704
Dyslipidaemia (%)	35	48	0.138
Current smoking (%)	64	67	0.757
EF at admission (%)	49 ± 9	41 ± 11	0.004
EF at six months (%)	53 ± 8	49 ± 12	0.106
LV EDV at admission (ml)	155 ± 36	171 ± 49	0.049
LV EDV at six months (ml)	159 ± 38	183 ± 65	0.051
Anterior wall STEMI. (%)	38	68	<0.001
LV remodelling (%)	12.8	34.5	0.010
MO (%)	37	51	0.110

GAS6: Growth Arrest-Specific 6 protein; sAXL: soluble AXL; CRP: C-reactive protein; BNP: brain natriuretic peptide; Tnl: troponin I (peak); DM: diabetes mellitus; EF: ejection fraction; LV EDV: left ventricular end-diastolic volume; MO: microvascular obstruction by late gadolinium enhanced cardiac magnetic resonance

with cardiac-dedicated software. LV function was assessed using a steady-state free-precession cine sequence prescribed in sequential 10-mm short axis slices with no gap from base to apex to achieve full LV coverage. The contrast-enhanced images were acquired 10 to 15 min after intravenous administration of gadodiamide-DTPA (Omniscan, Amersham Health, Madrid) at a dose of 0.2 mmol/kg using a standard segmented inversion-recovery fast gradient-echo pulse sequence. The inversion time was adjusted to null normal myocardium, typically between 180 and 320 ms. Matrix size was set to 256 and the mean field of view was 360 mm, resulting in a typical voxel size of 1.4 mm × 1.4 mm × 10 mm. All CMR images were cropped and de-identified for analysis by an independent experienced observer blinded to all clinical and angiographic data. The endocardial and epicardial borders on sequential short axis cine images were manually traced to compute LV end-systolic volume (ESV) and end-diastolic volume (EDV) as well as LV ejection fraction (LVEF) using Argus® software (SIEMENS, Erlangen, Germany). A self-customized tool based in MATLAB platform (The

MathWorks, Natick, Massachusetts) was used to compute the infarct size. First, the endocardial and epicardial borders were manually traced on short-axis contrast-enhanced images. Similarly, an experienced observer roughly outlined the hyperenhanced myocardium, and those areas were post-processed with an algorithm to define the infarcted myocardium according to the half-maximum pixel intensity criteria. Briefly, a histogram of the pixel intensities is created for the entire region of interest manually drawn by the observer. Then, the software identifies the maximum pixel intensity within the region of interest. The final infarct extent is automatically defined as those pixels with signal intensity above 50% of the maximum of the initial region. The infarcted areas on sequential short-axis slices were summed and divided by the total LV wall to calculate infarct size as a percentage of the LV wall. Microvascular obstruction, defined as any area of late hypo-enhancement surrounded by hyperenhancement on ce-CMR images, was also included in the infarct size. A microvascular obstruction extent score was computed by summing all segments with microvascular obstruction

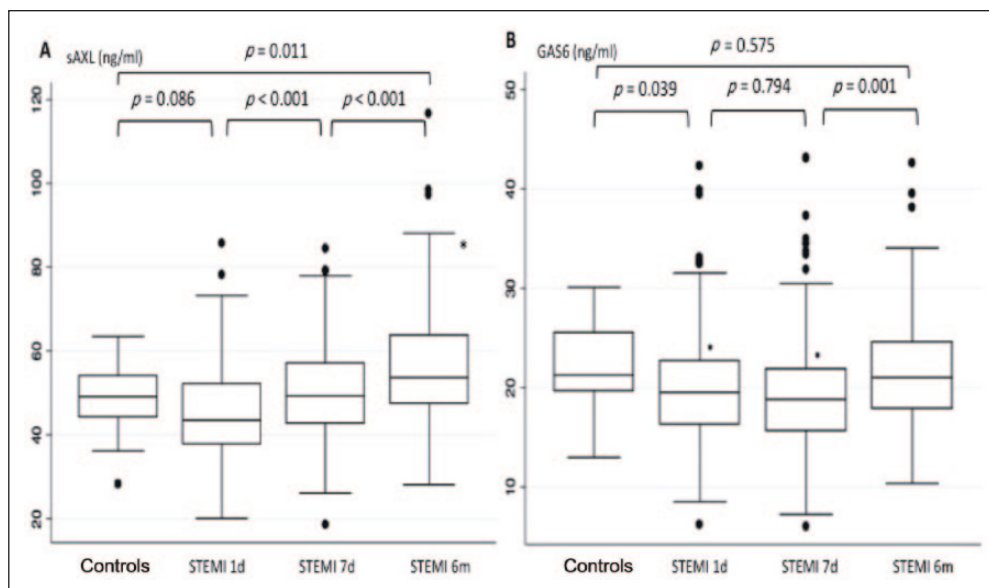


Figure 1. Soluble AXL (a) and GAS6 (b) levels in controls and in STEMI patients at different points in time. Box-plot represent median and interquartile range and vertical lines represent 95% confidence intervals. Black dots represent outliers.

sAXL: soluble AXL; GAS6: Growth Arrest-Specific gene 6 protein; STEMI: ST-segment elevation myocardial infarction; 1d: one day; 7: seven days; 6m: six months

according to the recommended 17-segment model. LV remodelling was defined as a 20% increase in EDV between admission and at six months.²

Continuous data are expressed as mean \pm SD and categorical variables as percentages. Shapiro–Wilk test confirmed that soluble AXL (sAXL) and GAS6 levels at any time point were not normally distributed. Accordingly, individual changes were compared with Wilcoxon matched-pair signed-rank tests and differences between groups were explored with independent-samples Mann–Whitney U tests. Correlations between sAXL and GAS6 values and quantitative parameters derived from ce-CMR or blood analyses were performed using Spearman Rho tests. The influence of Killip grade and changes of sAXL and GAS6 values were evaluated with analysis of variance (ANOVA) of repeated measures with between subjects effect. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with Stata 14.2 4.5 for Windows and IBM SPSS[®] 20.

Results

By paired analysis, a significant increase in sAXL levels was observed during the acute phase of STEMI patients (45.0 ± 11.3 ng/ml at day 1 and 50.8 ± 11.5 ng/ml at day 7, $p < 0.001$). At six month follow-up, sAXL continued to increase and was significantly greater than in the control group (57.2 ± 14.2 vs. 48.8 ± 8.9 ng/ml, $p = 0.011$). In contrast, no significant changes in GAS6 levels were found during the acute phase of STEMI (20.4 ± 5.8 ng/ml at day 1, 19.9 ± 5.7 ng/ml at day 7, $p = 0.794$), although both measures

were smaller than those found in the control group (22.3 ± 4.3 ng/ml, $p = 0.039$ and $p = 0.015$ respectively). At six month follow-up, however, GAS6 levels increased to 21.6 ± 5.7 ng/ml from day 7, $p = 0.001$ (Figure 1(a) and (b)). Subjects with incomplete revascularization showed higher sAXL levels at day 1 (48.1 ± 12.0 vs. 43.8 ± 10.8 ng/ml, $p = 0.033$) and at day 7 (53.6 ± 10.6 vs. 49.8 ± 11.9 ng/ml, $p = 0.041$), with no differences in GAS6 values.

CRP levels at day 1 and day 7 were higher in patients than controls (85.3 ± 163.5 and 65.3 ± 146.9 vs. 13.9 ± 5.7 mg/l, $p < 0.001$). At six month follow-up, CRP levels in patients significantly decreased to 11.7 ± 19.6 mg/l, $p < 0.001$) with no significant differences as compared with controls, $p = 0.301$. Monocyte counts significantly increased from day 1 to day 7 ($0.587 \pm 0.486 \times 10^9/l$ vs. $0.803 \pm 1.111 \times 10^9/l$, $p = 0.007$) and decreased at six month follow-up ($0.449 \pm 0.277 \times 10^9/l$, $p = 0.004$). No significant correlation was observed between CRP levels and monocyte count and GAS6 or sAXL levels at any time point (Supplementary Material online).

Heart failure

The majority of subjects ($n = 185$, 81%) did not develop heart failure during admission. A total of 33 (14.3%) patients reached Killip grade 2 at any time point and a minority were classified as being in Killip grades 3 or 4 (two and seven patients, respectively). Patients who developed heart failure during admission (Killip > 1 , $n = 42$) had more frequently anterior wall infarction and higher values of BNP and troponin, as well as worse LV function, larger

Table 2. Univariate predictors of adverse left ventricular remodelling.

	No remodelling	Remodelling	p value
Age (years)	59 ± 11	58 ± 12	0.734
Male (%)	83	93	0.259
Complete revascularization (%)	70	79	0.375
HR at admission (beats/min)	74 ± 19	77 ± 17	0.481
SBP at admission (mmHg)	133 ± 30	128 ± 28	0.478
DBP at admission (mmHg)	80 ± 19	79 ± 16	0.887
Time to reperfusion (min)	288 ± 315	217 ± 168	0.280
GAS6 1d (ng/ml)	19.8 ± 5.4	21.7 ± 7.9	0.170
GAS6 7d (ng/ml)	19.4 ± 5.8	20.6 ± 6.7	0.417
GAS6 6m (ng/ml)	21.9 ± 6.2	21.6 ± 4.5	0.746
sAXL 1d (ng/ml)	44.5 ± 11.8	47.4 ± 8.4	0.046
sAXL 7d (ng/ml)	50.2 ± 11.9	55.9 ± 9.6	0.018
sAXL 6m (ng/ml)	56.4 ± 14.8	60.9 ± 11.0	0.093
CRP 1d (ng/ml)	87.8 ± 185.9	76.8 ± 117.0	0.781
CRP 7d (ng/ml)	75.7 ± 173.6	52.8 ± 103.7	0.535
CRP 6m (ng/ml)	8.8 ± 12.8	10.2 ± 10.9	0.681
Monocytes 1d (× 10 ⁹ /l)	0.59 ± 0.55	0.60 ± 0.26	0.924
Monocytes 7d (× 10 ⁹ /l)	0.79 ± 0.98	1.19 ± 2.09	0.201
Monocytes 6m (× 10 ⁹ /l)	0.47 ± 0.30	0.50 ± 0.26	0.740
Infarct size (% LV)	16.2 ± 11.1	23.4 ± 15.9	0.043
BNP (pg/ml)	146 ± 114	140 ± 107	0.859
Tnl (ng/ml)	108.3 ± 87.9	218.2 ± 288.0	0.077
MO present (%)	40.2	43.5	0.818
No. segments MO	0.96 ± 1.51	1.52 ± 2.27	0.270
EF at admission (%)	49 ± 8	44 ± 13	0.054
EF at admission <40% (%)	16.1	31.0	0.070
EF at six months (%)	54 ± 7	46 ± 14	0.008
LVEDVi at admission (ml)	83.6 ± 15.2	77.5 ± 21.3	0.192
LVEDVi at six months (ml)	80.9 ± 15.4	105.0 ± 29.6	0.001
LVESVi at admission (ml)	43.1 ± 12.5	45.2 ± 20.3	0.634
LVESVi at six months (ml)	37.7 ± 11.7	60.3 ± 31.4	0.002

Data expressed as mean ± standard deviation or percentages.

HR: heart rate; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; GAS6: Growth Arrest-Specific 6 protein; sAXL: soluble AXL; CRP: C-reactive protein; BNP: brain natriuretic peptide; Tnl: troponin I (peak); No. segments MO: number of segments with microvascular obstruction; EF: ejection fraction; LVEDVi: left ventricular end-diastolic volume index; LVESVi: left ventricular end-systolic volume index

Table 3. Multivariate predictors of adverse left ventricular remodelling by binary logistic regression analysis.

Variable	Wald	p value	OR (Expo-B)	OR 95% confidence interval
Infarct size (% LV)	2.837	0.092	1.031	0.995 1.069
sAXL seven days (ng/ml)	4.554	0.033	1.043	1.003 1.085
Killip class (by grade)	4.743	0.029	2.240	1.084 4.630

OR: odds ratio; LV: left ventricle; sAXL: soluble AXL

LV volumes and higher occurrence of adverse LV remodeling during follow-up (Table 1).

When compared with patients without heart failure, patients with Killip >1 had greater values of sAXL at one day (48.9±11.9 vs. 44.0±10.7 ng/ml, $p=0.047$) and six month follow-up (63.3±15.4 vs. 55.9±13.7 ng/ml, $p=0.011$). By ANOVA of repeated measures no interaction

between the presence of Killip >1 and the increase in sAXL over time was observed. GAS6 levels were not significantly different at any time between subjects with or without heart failure during admission. CRP levels were also higher in patients with heart failure at day 1 (113.0±107.2 vs. 76.7±175.4 mg/l, $p=0.004$) and at day 7 (91.0±110.5 vs. 64.0±161.8 mg/l, $p=0.033$). Monocyte

counts were only higher in heart failure patients at seven days ($1.596 \pm 2.243 \times 10^9/l$ vs. $0.627 \pm 0.597 \times 10^9/l$, $p=0.009$).

Cardiac remodelling

There was no correlation between sAXL or GAS6 levels at any time point and parameters of ventricular dysfunction, including initial and follow-up LVEF or LV indexed volumes, nor with BNP values during hospitalization. Infarct mass derived by LGE-CMR or peak troponin were not correlated with sAXL or GAS6 either. However, a weak but significant positive correlation was found between sAXL at day 1 and the change in LV ESV index and LV EDV index from baseline to follow-up ($r=0.183$, $p=0.029$ and $r=0.171$, $p=0.033$ respectively). These correlations remained significant between sAXL at six month follow-up and the change in LV ESV index ($r=0.165$, $p=0.029$) and improved slightly for the change in LV EDV index ($r=0.238$, $p=0.009$). Interestingly, despite the moderate correlation observed between BNP and infarct size with LVEF and LV volume indexes at baseline and follow-up, neither of the two correlated with the changes in LV volume indexes (Supplementary Material Table 3). A weak but significant direct correlation between CRP levels acutely was observed with BNP, infarct mass and LV ESV index, as well as an inverse correlation with ejection fraction. At six month follow-up, CRP still correlated with LV ESV index and LVEF. Monocyte counts were not correlated with infarct mass, LVEF or BNP, but levels at day 1 correlated with initial and follow-up LV volumes. Neither CRP nor monocyte count correlated with changes in LV volume indexes over time (Supplementary Material). Patients that fulfilled adverse ventricular remodelling criteria at follow-up ($n=29$, 16%) had higher values of sAXL at day 1 (47.4 ± 8.4 vs. 44.5 ± 11.8 ng/ml, $p=0.046$), day 7 (55.9 ± 9.6 vs. 50.2 ± 11.9 ng/ml, $p=0.018$) and six months (60.9 ± 11.0 vs. 56.4 ± 14.8 ng/ml, $p=0.093$) respectively. They also had larger baseline infarct size by ce-CMR (22.1 ± 15.8 vs. 16.3 ± 11.0 % LV mass, $p=0.043$). In contrast, no significant differences were observed in GAS6 between patients with adverse ventricular remodelling and those without (21.7 ± 7.9 vs. 19.8 ± 5.4 ng/ml, $p=0.170$; 20.6 ± 6.7 vs. 19.4 ± 5.8 ng/ml, $p=0.417$ and 21.6 ± 4.5 vs. 21.9 ± 6.2 ng/ml, $p=0.746$ at first day, one week and six months). Also no significant differences were found between CRP and monocyte count between patients with or without adverse remodelling (Table 2). Subjects who presented heart failure during hospitalization were more likely to develop adverse LV remodelling at follow-up (34.5% vs. 12.8%, $p=0.01$). In a multivariate logistic regression analysis including infarct size, Killip class during hospitalization and sAXL at day 7, the last two were found to be independent predictors of adverse LV remodelling (Table 3).

Clinical follow-up

Clinical follow-up was completed in all patients for a mean of 79 ± 49 months; 16 (7%) subjects died (11 cardiac and five non-cardiac origin). A total of six subjects were readmitted for heart failure and 11 for new myocardial infarction. Thirteen subjects (5.7%) either died from cardiac causes or were readmitted for heart failure. Neither their levels of sAXL at day 1 (49.8 ± 15.1 vs. 44.7 ± 11.0 ng/ml), day 7 (51.9 ± 8.8 vs. 50.8 ± 11.5 ng/ml) and six months (56.2 ± 8.0 vs. 57.2 ± 14.4 ng/ml) nor the GAS6 at day 1 (22.4 ± 5.9 vs. 19.9 ± 5.6 ng/ml), day 7 (19.1 ± 9.4 vs. 19.5 ± 5.9 ng/ml) and six months (13.9 ± 6.0 vs. 21.8 ± 5.9 ng/ml) were significantly different from the remaining subjects.

Discussion

Cardiac repair is an active process where inflammation and efferocytosis of apoptotic cells are key factors. It has been shown that TAM receptors, mainly MerTK, intervene in this process.^{12,14,24,25} The progressive increase in sAXL levels found in STEMI in the present study suggests that GAS6–TAM activation is triggered at the moment of the acute event and remains activated during the healing period. It is reasonable to speculate whether the GAS6–TAM system, and particularly AXL, may be involved in myocardial repair processes at long-term.

The GAS6–TAM complex has been involved in vascular haemostasis and atherosclerosis.^{26,27} The GAS6 system could delay vascular smooth muscle cell senescence regulating apoptosis and inflammation.^{28–31} It has been suggested that low GAS6 is related to the presence of cardiovascular risk factors, and several investigators have suggested that it could have a role as a predictor of cardiovascular events. A relationship between low GAS6 levels and inflammation, endothelial dysfunction markers and new onset of type-2 diabetes has been reported.³² Some of the beneficial effects of statins, such as the modulation of smooth muscle cells' function and their preventive role in vascular calcification, have been related to the restoration of the GAS6–AXL pathway.^{33–35} Despite that in our series we did not find differences in GAS6 by cardiovascular risk factors, the low GAS6 levels we found acutely in STEMI might be a reflection of the higher risk for coronary events. In addition, the significant increase in GAS6 values at six months can be attributed to the high proportion of patients who started treatment with statins (83% of patients at discharge). The role of GAS6 in ischaemic cardiomyopathy and acute coronary syndromes is controversial. A previous study with a small group of patients showed no association between GAS6 levels and any degree of coronary disease.³⁶ On the other hand, Lee et al. found lower plasma levels of GAS6 in patients undergoing coronary artery by-pass grafting compared with controls and they were negatively correlated with fasting glucose and endothelial dysfunction

markers and predicted the operative mortality.³⁷ In the study by Jiang and colleagues, GAS6 levels were measured in 80 patients with coronary artery disease, of whom only eight patients (10%) presented with acute myocardial infarction. GAS6 concentrations were significantly lower in patients than in a healthy control group, and there was a trend toward increased expression of GAS6 according to the severity of the disease. Moreover, they evidenced a probably protective role of the GAS6 c.834+7G>A polymorphism that was associated with a lower risk for coronary artery disease.³⁸ In agreement with this study, we found that GAS6 levels in serum early after STEMI were lower than those measured in healthy controls. GAS6 combines with sAXL to form a stable receptor–ligand compound. In normal conditions, there is an excess of sAXL over GAS6, so that all GAS6 is bound to AXLs, preventing activation of TAM receptors.¹⁶ Therefore, any condition causing an increase in AXL release would theoretically neutralize the free concentration of GAS6, which indicates that circulating GAS6 is not active but, rather, an inhibited and functionally inactive ligand. In line with this hypothesis, we observed that GAS6 levels continued to decrease during admission, denoting an inverse relationship with the increase in sAXL. In addition, GAS6 levels were not associated with infarct size nor with parameters of LV function or changes in LV volumes, suggesting the lack of systemic effects of circulating GAS6 in LV remodelling. Whether locally released GAS6 in the myocardium that could exceed AXL effects could have a potential role in LV remodelling is beyond the scope of this study and needs to be explored in experimental studies.

A previous publication by Liu and co-workers found an increase in sAXL levels in acute coronary syndrome as compared with controls.³⁹ In the current study involving a larger cohort of patients, we did not find differences in the baseline sAXL levels between STEMI patients and controls, but a significant increase was observed in patients by paired analysis at seven days, which suggests the participation of AXL in myocardial infarction pathophysiology. The exact mechanism causing the increase in sAXL observed in our study cannot be elucidated based on our findings. AXL is expressed in different cell types that participate in atherosclerotic plaque inflammation, such as vascular endothelial and smooth muscle cells and macrophages. However, we did not find any correlation between circulating monocytes count and sAXL. The increase in sAXL may be also the consequence of the direct shedding effect of ADAM10 and ADAM17 in the necrotic myocardium, as shown in the left ventricle in a rat model of myocardial infarction.⁴⁰ Against this possibility, in a prior study from our group we found no differences in ADAM17 in serum among STEMI patients either in the acute phase or at six months as compared with controls.⁴¹ The infarcted myocardium heals and becomes more fibrotic with time. However, sAXL continued to increase at six months, which points more to inflammatory

cells or fibroblasts as the source of sAXL. Therefore, no definitive conclusion can be drawn about the source of sAXL, and a combination of several mechanisms cannot be ruled out.

Probably the most striking finding in our study is the association between heart failure and LV remodelling with higher values of sAXL at any time, probably related to a state of persistent inflammation. Battlle et al.¹⁷ found a six-fold increase in AXL protein expression in the myocardium of 15 end-stage heart failure patients as compared with 11 controls from heart donors. This was accompanied by greater levels of sAXL in a cohort of 192 heart failure patients compared with 67 controls without heart failure. They found no differences in AXL expression dependent on ischaemic and non-ischaemic heart failure, neither for gender nor ejection fraction (all patients had ejection fraction $\leq 40\%$). Interestingly, sAXL levels were higher in patients with the worst New York Heart Association functional class and provided additional prognostic value on top of BNP to predict all-cause mortality, admissions for heart failure or heart transplantation. As in our study, they did not find any correlation between sAXL and BNP. In a more recent study, it was evidenced that sAXL, but not troponins, added a greater predictive value for adverse events than high BNP alone in heart failure patients.⁴² Our results line up with these prior studies, since sAXL levels correlated neither with infarct size nor with BNP, but still could be identified as an independent predictor of adverse LV remodelling. BNP, released in the acute setting of STEMI in response to stretching and pressure overload of myocardial fibres, correlates with parameters of LV function and predicts adverse LV remodelling.¹⁸ In contrast, as shown in our study, sAXL did not correlate with parameters of infarct size, BNP, microvascular obstruction or LV systolic function but correlated with changes in LV volumes and remodelling. As in many prior studies, the presence of microvascular obstruction phenomenon was associated with larger infarcts, low LVEF and larger baseline and follow-up LV volumes but did not identify subjects who developed marked increase in LV volumes over time. Therefore, sAXL could represent a new player in heart failure pathophysiology following STEMI, independently of the BNP and troponin pathway.

In summary, sAXL progressively increased following STEMI and was found to be associated with heart failure. In addition, sAXL was identified as an independent predictor of adverse LV remodelling. On the contrary, GAS6 levels were lower in STEMI patients than in controls, probably reflecting their higher risk for cardiovascular events. Further histological and experimental studies are needed to characterize the role of the different components of this system in inflammation and myocardial healing following myocardial infarction and to elucidate whether it may become a new therapeutic target.

Limitations

GAS6 and AXL were measured from plasma using an ELISA technique, so we had no information of protein expression locally in injured myocardium. We cannot assure whether the increase of sAXL observed is the cause or a consequence of LV remodelling. To elucidate this question, additional histological studies in experimental models may be helpful. On the other hand, we studied a population with a low prevalence of heart failure. The presence of overt heart failure, cardiogenic shock and electric instability are limiting conditions to conduct a ce-CMR study in the acute phase. Those subjects are likely the ones who will benefit the most from potential new therapies. Larger studies focusing on sicker patients, who are at a higher risk for adverse events, are warranted.

Acknowledgements

All authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation. This study has been performed in collaboration with the Clinical Competence Centre Cardiology, Erlangen, Germany.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad and Instituto de Salud Carlos III, Fondo Investigación Sanitaria (grant numbers PI15/00531, SAF2015-66515-R and RTC-2015-4184-1), the European Regional Development Fund (ERDF) 'Una manera de hacer Europa', Fundació La Marató TV3 (grant numbers 20153030 and 20153031), the Catalan Society of Cardiology SCC_ROCHE2015_001 (SAP Code: DN040578) and Siemens Healthcare 11/425.

References

- Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: The Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation* 2014; 129(14): 1483–1492.
- Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: Patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation* 2002; 106: 2351–2357.
- Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11: 255–265.
- Shinde AV and Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 70: 74–82.
- Altara R, Manca M, Sabra R, et al. Temporal cardiac remodeling post-myocardial infarction: Dynamics and prognostic implications in personalized medicine. *Heart Fail Rev* 2015; 21: 25–47.
- Frangogiannis NG. Activation of the innate immune system in the pathogenesis of acute heart failure. *Eur Hear J Acute Cardiovasc Care*. Epub ahead of print 1 April 2017. DOI:10.1177/2048872617707456.
- Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD, et al. Mechanisms of resolution of inflammation: A focus on cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1001–1006.
- Seropian IM, Sonnino C, van Tassel BW, et al. Inflammatory markers in ST-elevation acute myocardial infarction. *Eur Hear J Acute Cardiovasc Care* 2016; 5: 382–395.
- Seropian IM, Toldo S, van Tassel BW, et al. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 1593–1603.
- Van der Meer JHM, van der Poll T and van't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: Roles in inflammation and hemostasis. *Blood* 2014; 123: 2460–2469.
- Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, et al. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol* 1999; 162: 3498–3503.
- Choi J-Y, Seo JY, Yoon Y-S, et al. Mer signaling increases the abundance of the transcription factor LXR to promote the resolution of acute sterile inflammation. *Sci Signal* 2015; 8: ra21.
- Lemke G and Burstyn-Cohen T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1209: 23–29.
- Wan E, Yeap XY, Dehn S, et al. Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ Res* 2013; 113: 1004–1012.
- Rothlin C V, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, et al. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2015; 33: 355–391.
- Ekman C, Stenhoff J and Dahlbäck B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 838–844.
- Battle M, Recarte-Pelz P, Roig E, et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2014; 173: 402–409.
- Garcia-Alvarez A, Sitges M, Delgado V, et al. Relation of plasma brain natriuretic peptide levels on admission for ST-elevation myocardial infarction to left ventricular end-diastolic volume six months later measured by both echocardiography and cardiac magnetic resonance. *Am J Cardiol* 2009; 104: 878–882.
- Ortiz-Pérez JT, Lee DC, Meyers SN, et al. Determinants of myocardial salvage during acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2010; 3: 491–500.
- Ortiz-Pérez JT, Riera M, Bosch X, et al. Role of circulating angiotensin converting enzyme 2 in left ventricular remodeling following myocardial infarction: A prospective controlled study. *PLoS One* 2013; 8: e61695.
- Perea RJ, Morales-Ruiz M, Ortiz-Perez JT, et al. Utility of galectin-3 in predicting post-infarct remodeling after acute myocardial infarction based on extracellular volume fraction mapping. *Int J Cardiol* 2016; 223: 458–464.
- Alciato F, Sainaghi PP, Castello L, et al. Development and Validation of an ELISA method for detection of growth arrest

- specific 6 (gas6) protein in human plasma. *J Immunoassay Immunochem* 2008; 29: 167–180.
23. Recarte-Pelz P, Tàssies D, Espinosa G, et al. Vitamin K-dependent proteins GAS6 and Protein S and TAM receptors in patients of systemic lupus erythematosus: Correlation with common genetic variants and disease activity. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: R41.
 24. Howangyin K-Y, Zlatanova I, Pinto C, et al. Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase and milk fat globule epidermal growth factor 8 co-ordinately improve remodeling after myocardial infarction via local delivery of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 2016; 133: 826–839.
 25. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, et al. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* 2012; 189: 3508–3520.
 26. Fernández-Fernández L, Bellido-Martín L and García de Frutos P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2008; 100: 604–610.
 27. Laurance S, Lemarié CA and Blostein MD. Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Adv Nutr* 2012; 3: 196–203.
 28. Jin C, Wang H, Chen Y, et al. Gas6 delays senescence in vascular smooth muscle cells through the PI3K/Akt/FoxO signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35: 1151–1166.
 29. Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA, et al. Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* 2006; 98: 1446–1452.
 30. Clauser S, Meilhac O, Bièche I, et al. Increased secretion of gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* 2012; 107: 140–149.
 31. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, et al. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 869–875.
 32. Hung YJ, Lee CH, Chu NF, et al. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care* 2010; 33: 1840–1844.
 33. Son BK, Kozaki K, Iijima K, et al. Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ Res* 2006; 98: 1024–1031.
 34. Son B-K, Akishita M, Iijima K, et al. Mechanism of pi-induced vascular calcification. *J Atheroscler Thromb* 2008; 15: 63–68.
 35. Collett G, Wood A, Alexander MY, et al. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 2003; 92: 1123–1129.
 36. Borgel D, Durand E, Clauser S, et al. Plasma Gas6 levels and coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2009; 101: 215–216.
 37. Lee C-H, Shieh Y-S, Tsai C-S, et al. Plasma concentrations predict aortic expression of growth-arrest-specific protein 6 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *PLoS One* 2013; 8: e79452.
 38. Jiang L, Liu CY, Yang QF, et al. Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 738–743.
 39. Liu Y-W, Yang Q-F, Zuo P-Y, et al. Elevated serum levels of soluble Axl in acute coronary syndrome. *Am J Med Sci* 2015; 349: 124–129.
 40. Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res* 2000; 86: 939–945.
 41. Ortiz-Pérez JT, Riera M, Bosch X, et al. Role of circulating angiotensin converting enzyme 2 in left ventricular remodeling following myocardial infarction: A prospective controlled study. *PLoS One* 2013; 8: e61695.
 42. Batlle M, Campos B, Farrero M, et al. Use of serum levels of high sensitivity troponin T, galectin-3 and C-terminal propeptide of type I procollagen at long term follow-up in heart failure patients with reduced ejection fraction: Comparison with soluble AXL and BNP. *Int J Cardiol* 2016; 225: 113–119.