

La quinasa Fgr como diana terapéutica en inflamación cardiaca.

Mariam José Sánchez Velásquez^{1, 2, a}, Marta Pérez-Hernández², José Antonio Enríquez²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. GENOXPHOS-Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, 28029 Madrid, España.

a. mjossanchezvel@gmail.com

Palabras clave: diana terapéutica; quinasa Fgr; inflamación; enfermedad cardiovascular

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más común de mortalidad a nivel mundial, afectando aproximadamente al 32% de la población global [1]. Aunque son muchos los factores asociados a estas enfermedades, la mayoría comparte un mecanismo: la inflamación [2,3,4]. Por tanto, reducir la inflamación cardiaca supondría un importante avance en la terapéutica de estas enfermedades. Investigadores del CNIC demostraron que la tirosina quinasa Fgr es activada por estrés (por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS)), y fosforila la subunidad A del complejo II (CII) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, aumentando la actividad del CII, lo que produce un cambio metabólico celular [7]. Demostraron además que este cambio metabólico en los macrófagos induce la producción de citoquinas inflamatorias y a la polarización de estos hacia el tejido dañado. De hecho, la pérdida sistémica de Fgr en ratones (Fgr-knock out -KO-) sometidos a distintos tipos de estrés (inanición, hipoxia/reoxigenación, infección por *E. coli* y obesidad) generan macrófagos incapaces de adaptarse metabólicamente y por tanto no producen inflamación [8,9]. Dada la importancia de la inflamación en las enfermedades cardiacas, resulta interesante estudiar el papel de la quinasa Fgr en el corazón y su implicación en la regulación de los complejos mitocondriales en los distintos tipos celulares cardiacos (como macrófagos cardiacos (cMacs) y cardiomiocitos). Por ello, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar el papel de la Fgr en el corazón mediante el uso de ratones Fgr-KO, a fin de proponerla como diana terapéutica en la inflamación cardiovascular.

Cita: Sánchez Velásquez, Mariam José; Pérez-Hernández, Marta; Enríquez, José Antonio (2022) La quinasa Fgr como diana terapéutica en inflamación cardiaca. *dianas* 11 (2): e202209fa03. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202209fa03](http://www3.uah.es/dianas?e202209fa03) <http://www3.uah.es/dianas?e202209fa03>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Sánchez-Velásquez MJ, Pérez-Hernández M, Enríquez JA. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares matan aproximadamente a 17.9 millones de personas al año [1]. A pesar de que estas engloban muchos tipos de enfermedades, la mayoría se caracteriza por cursar con inflamación [2,3,4]. Si bien, la inflamación tiene un papel fisiológico fundamental en la reparación de los tejidos, se vuelve perjudicial cuando se prolonga en el tiempo o cuando aparece en tejidos no dañados [5]. La inflamación inicia con el reclutamiento y extravasación de células proinflamatorias promoviendo la liberación de citoquinas y quimioatrayentes que permite el mantenimiento activo del proceso celular inflamatorio contribuyendo así a la disfunción celular, precursora de enfermedades cardiovasculares. [5,6]

El grupo del Dr. Enríquez en el CNIC, demostró recientemente el papel fundamental de la quinasa Fgr en la adaptación metabólica mitocondrial de los macrófagos hacia un fenotipo inflamatorio. Demostraron que la quinasa Fgr, activada por estrés (en concreto por un aumento de peróxido de hidrógeno H₂O₂) fosforila una subunidad del CII de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, produciendo un aumento de la actividad del CII y por último desencadenando un fenotipo inflamatorio [7] (ver figura 1). En consecuencia, la pérdida sistémica de Fgr en modelos murinos (Fgr-KO); conlleva que no haya un aumento de la actividad del CII bajo estrés, por tanto, las mitocondrias son incapaces de adaptarse metabólicamente bajo diferentes condiciones (como la inanición, hipoxia/reoxigenación, infección por *E. coli* y obesidad) lo que conduce a una incapacidad de la célula para liberar citoquinas [8,9]. Algunos estudios proponen la regulación de la polarización de los macrófagos a un fenotipo antiinflamatorio para el abordaje farmacológico de procesos inflamatorios crónicos de bajo grado [2,4,9].

Tirosina quinasa Fgr como diana terapéutica

Las proteínas Src (Lyn, Hck, Lck, Blk, Src, Fyn, Yes y Fgr) pertenecen a una familia de proteínas no receptores con actividad de tirosina quinasas que desempeñan un papel fundamental en una gran variedad de procesos celulares [10]. La quinasa Fgr se ubica tanto dentro como fuera de la mitocondria [11]. Diferentes estudios han demostrado la participación de Fgr en la vía de señalización del metabolismo

lipídico, procesos inflamatorios y estrés oxidativo, emergiendo recientemente como diana en la enfermedad inflamatoria crónica [8-12].

La quinasa Fgr se expresa principalmente en células mieloides (granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) [11]. Sin embargo, se ha detectado Fgr en cardiomiocitos de un modelo murino de cardiomiopatía arritmogénica [13]. Además, se ha demostrado que los propios cardiomiocitos pueden producir citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF α [14]. Hasta el momento, los experimentos para medir la actividad del CII en ratones Fgr-KO se han realizado en corazón entero, lo que hace imposible interpretar de qué células surgen los cambios producidos por la pérdida de Fgr. Por ello es necesario medir la actividad de los complejos mitocondriales en distintos tipos celulares, como cardiomiocitos y cMacs para dilucidar mejor el papel de Fgr en los principales tipos celulares del corazón.

Actualmente están disponibles inhibidores inespecíficos de la familia Src para tratamientos contra el cáncer (dasatinib, bosutinib); y se aprobó un programa europeo FP7-HEALTH-2011 (ID de subvención: 282095) para el desarrollo de inhibidores de Src para tratar la artritis y lesiones pulmonares. TL02-59 es un inhibidor selectivo de Fgr a un IC₅₀ de 0,03 nM, aunque puede inhibir a otros miembros de la familia Src como Lyn y Hck con IC₅₀ de 0,1 nM y 160 nM, respectivamente [15]. Se ha demostrado que TL02-59 al inhibir la autofosforilación de Fgr suprime potentemente el crecimiento y la apoptosis de células de leucemia mieloide aguda (LMA) que sobreexpresan esta quinasa [16]. Además, un estudio realizado por el Dr. Enríquez y colaboradores; demostró que la eliminación de H₂O₂ mitocondrial era suficiente para prevenir la activación de Fgr en células derivadas de la médula ósea de ratón y que ello evitaba la polarización de los macrófagos y la inflamación [7], lo que sugiere otra vía de inhibir Fgr (indirectamente).

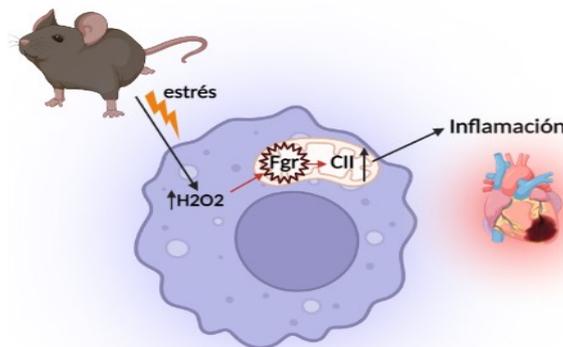


Figura 1. Vía de señalización del eje regulador de ROS-FGR y su interacción con el CII: Bajo condiciones de estrés, el aumento de especies reactivas como el H₂O₂ activan Fgr; y ésta fosforila la subunidad A del CII de la cadena de transporte de electrones mitocondrial aumentando su actividad, provocando un cambio en la adaptación metabólica que conlleva a la activación de macrófagos [7-9]. (Elaboración en biorender).

Actividad del CII mitocondrial

El CII, también conocido como succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima fundamental tanto para el ciclo de Krebs como para la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa [17]. El succinato es oxidado a fumarato por la SDH en el ciclo de Krebs, y los electrones liberados de esta oxidación son transferidos a la cadena transportadora de electrones para reducir la ubiquinona a ubiquinol y posteriormente transferir los electrones al complejo III (figura 2) [18].

La SDH se compone de 4 subunidades (SDHA-B-C-D). Las subunidades SDHA y la SDHB forman el grupo hidrofílico responsable de la oxidación de succinato a fumarato; mientras que las subunidades SDHC y SDHD se encuentran ancladas a la membrana mitocondrial interna. Fgr fosforila los residuos Y535 y Y596 de la subunidad A, lo que aumenta su actividad. La SDH y la acumulación de succinato se han relacionado estrechamente con inflamación [19]. En macrófagos activados, la acumulación de succinato y el aumento de su oxidación aumenta el ROS, estabiliza HIF1 α , lo que lleva a un aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias como IL1 β . Al contrario, la inhibición de la actividad del CII promueve una respuesta celular antiinflamatorio [18,19].

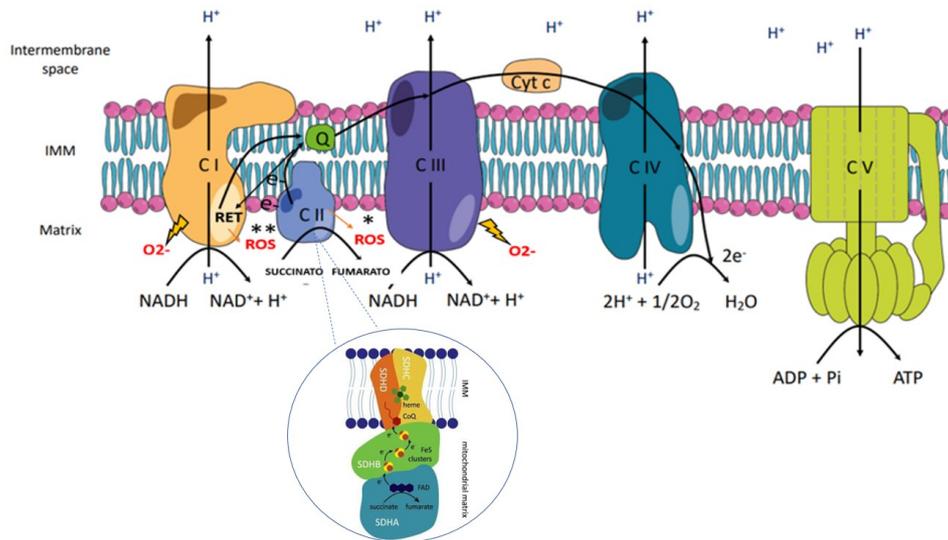


Figura 2. Cadena transportadora de electrones mitocondrial formada por el complejo I al IV (CI a CIV). El complejo V (CV) cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP. El CII cataliza la oxidación del succinato a fumarato. ** RET (por sus siglas en inglés reverse electron transport) o transporte inverso de electrones, ocurre cuando los electrones cedidos del CII al ubiquinol pasan al complejo I reduciendo NAD^+ a NADH , proceso que genera gran cantidad de ROS. Las mitocondrias tienen una membrana externa y una membrana interna (IMM), separadas por el espacio intermembrana. En la figura solo se representa la IMM. (Edición en biorender).

Por tanto, dada la relación de la quinasa Fgr con inflamación, la importancia de la inflamación en enfermedades cardiovasculares, y la necesidad de nuevos tratamientos para las mismas, este proyecto tiene como objetivo principal estudiar el posible rol cardioprotector de inhibir Fgr para tratar la inflamación cardíaca. Para ello, 1. Estudiaremos distintos parámetros cardíacos e inflamatorios en ratones Fgr-KO a nivel basal y tras inducir un estrés cardíaco agudo con isoproterenol (ISO); con el objetivo de evaluar el efecto de la inhibición sistémica y crónica de Fgr; 2. Estudiaremos la implicación de Fgr en la regulación de la actividad del CII mitocondrial en distintos tipos celulares del corazón (cMacs y cardiomiocitos), y 3. Estudiaremos *in vitro* si el inhibidor de Fgr, TL0259, puede modificar la actividad del CII mitocondrial en distintas condiciones como test preliminar de su uso *in vivo*.

Materiales y métodos

Cultivo celular

En algunos experimentos, se empleó una línea celular de fibroblastos inmortalizados aislados de las orejas de ratones C57BL/6J CD45.1 y de su respectivo Fgr-KO. Las células se cultivaron en medio Eagle 999 modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (FBS), glutamina (1,0 %) y estreptomycin (0,5 %), a 37°C en aerobiosis. Las placas de células fueron utilizadas a una confluencia del 80 % aproximadamente.

Modelo murino

Para la mayoría de los experimentos, se utilizaron ratones con fondo genético C57BL/6J CD45.1 (Charles River) y C57BL/6OlaHsd (Harlan), y sus respectivos Fgr-ko homocigotos. La principal diferencia entre ambos fondos es la presencia o no del gen NNT (el fondo J es NNT KO y el fondo OlaHsd es NNT WT). Esta proteína tiene un papel importante en el equilibrio redox. Se utilizaron tanto machos como hembras entre 8 y 14 semanas de edad (a no ser que se defina lo contrario), provenientes del animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Los animales se mantuvieron en unas condiciones de luz, temperatura y humedad controladas (ciclo luz y oscuridad de 12 horas, a 22°C y 65-70 % de humedad relativa); recibieron agua y comida *ad libitum*. Los protocolos de los experimentos fueron aprobados por el comité ético del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), según las directrices internacionales de uso de animales de experimentación (PROEX111.7/22).

Medición del pulso y presión arterial en los ratones de estudio.

Para medir el pulso, y la presión arterial sistólica y diastólica de los ratones con ambos fondos genéticos, se utilizó un método de medición indirecto, simultáneo y no invasivo, basado en esfigmomanometría. El sistema Kent-Scientific-CODA está basado en celdas foto-conductiva con sensores del flujo sanguíneo, la cual se ilumina a través de una pequeña lámpara, registrando las pulsaciones de las arterias de la cola del ratón y convirtiéndolas en señales eléctricas. El método registra la primera aparición del pulso cardíaco en la cola del roedor cuando se desinfla la bomba de insuflación [20]. Se realizó un entrenamiento de 3 días

previos a las mediciones definitivas; la importancia del entrenamiento radica en que los ratones se acostumbren a estar dentro de la celda de medición, evitando así fluctuaciones por estrés aducido a la técnica, de manera que con el entrenamiento puedan reflejar la presión arterial en estado basal. El entrenamiento consistió en colocar al ratón dentro de la celda, con la cola sujeta por un manguito ocluidor. Se realizaron 10 rondas de medición con un tiempo de 10 minutos por ronda; un máximo de 6 ratones por ronda.

Aislamiento de cardiomiocitos

El sistema clásico de aislamiento de cardiomiocitos usa el método de perfusión retrograda Langendorff, pero debido a la falta de éste en el laboratorio, utilizamos un método simplificado [21]. La técnica consiste en ocluir la aorta y perfundir el corazón a través del ventrículo izquierdo con diferentes soluciones para disgregar el corazón de manera homogénea. Previo al sacrificio, a un grupo se le administró una dosis aguda de ISO 160mg/kg intraperitoneal [22]. Tras sacrificar al animal mediante CO₂ y dislocación cervical, se abre el tórax, exponiendo el corazón, y se ocluye la aorta ascendente con pinzas Reynolds. La primera solución consiste en un tampón EDTA para limpiar de sangre del corazón. La siguiente solución consiste en un tampón de perfusión (taurina: 10mmol/L, BDM: 10mmol/L, glucosa 10mmol/L, 4-2-hydroxyethyl-piperazina-1-2-ácido etanosulfónico (HEPES): 10mmol/L, NaH₂PO₄: 0,5mmol/L, KCl: 5mmol/L, NaCl: 130mmol/L, MgCl₂: 1mmol/L; pH:7,8) con colagenasa (Colagenasa I: 0,5mg/ml, proteasa 0,05mg/ml; 37°C) para disgregar el tejido. La disociación celular se completa por acción mecánica, y se detiene la reacción enzimática con una solución que contiene tampón de perfusión con 5 % de FBS. La suspensión celular se filtra con filtro de 100 µm, y las células se someten a 2 rondas secuenciales de sedimentación por gravedad durante 30 min. El sedimento celular contiene una fracción enriquecida de miocitos. El pellet con los miocitos se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Mediciones bioquímicas en suero sanguíneo y orina

La sangre se obtuvo por punción cardíaca. Para obtener el suero sanguíneo, se centrifugó la sangre a 2,500 rpm durante 15 minutos y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis. La bioquímica del suero para: creatina quinasa MB (CKMB) se determinó usando un analizador automático dimensión RxL Max. La orina se recolectó por las mañanas para medir microalbúmina como parámetro clínico preliminar de daño renal.

Mitocondrias aisladas de cultivo celular

Previamente a los ensayos enzimáticos en mitocondrias aisladas de fibroblastos inmortalizados, las células se trataron con los siguientes compuestos: rotenona (6 horas 250 nM, para inhibir el CI), el inhibidor químico TL0259 (TOCRIS) para Fgr (6 horas 10 nM), o ambos. Estas concentraciones se mantuvieron en todo el proceso de extracción mitocondrial. La extracción de mitocondrias se realizó con el protocolo de Prebre J.M et al, con algunas modificaciones [23]. Primero, las células se levantaron mediante tripsinización (Tripsina 5 % ,10 min, 37°C, aerobiosis), y se centrifugaron a 1,200 rpm por 5 min. El pellet se resuspendió en medio A (sacarosa: 250mM; HEPES:2mM; BSA: 5 mg/ml; EDTA, 0,1 mM; pH 7,4), y se homogenizó con un homogenizador de cristal Potter-Elvehjem ajustable, seguido centrifugación a alta velocidad (10,000 rpm por 15 minutos, 4°C). En la primera centrifugación, las mitocondrias se separan del resto de componentes celulares en el sobrenadante; y en la segunda centrifugación (18,000 rpm por 15 min,4°C), el pellet que contiene las mitocondrias fue resuspendido en medio A. Las muestras se guardaron a -80°C para análisis posteriores.

Aislamiento de cMacs

Tras sacrificar al animal mediante CO₂ y dislocación cervical, se extirpo el corazón y se mantuvo en PBS. Se procedió a pasar los corazones a un buffer de digestión enzimática (DNAasa 10UI/ml, liberasa 13UI/ml, HBSS), y tras disgregar mecánicamente el tejido, se incubó a 37°C a 500 rpm por 45 min. El disgregado se pasó por un filtro de 40 µm utilizando un tampón PEB frío (PBS, EDTA 1 r%, BS5 %) como diluyente y el émbolo de una jeringa para filtrar el resto de tejido; seguido de una centrifugación (4°C a 1,500 rpm por 5min). El pellet que contiene los cMacs y eritrocitos, se resuspendió en tampón de lisis (4°C, por 5 min), para romper los eritrocitos. Se utilizó PEB-Azida frío para parar la reacción, seguido de una centrifugación (4°C a 1,500 rpm por 5min). El pellet se resuspendió en FBS+ 10 % DMSO. Las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas a -80°C en el recipiente de congelación Thermo Scientific™ Mr. Frosty™, para análisis posteriores.

Actividad enzimática del CII: en cardiomiocitos, cMacs y mitocondrias aisladas

En todas las muestras se realizó la cuantificación de proteínas con el método Bradford mediante lectura espectrofotométrica a 595 nm. Posteriormente, se realizaron al menos tres ciclos de congelación-descongelación para permeabilizar las membranas al sustrato. Para medir la actividad del CII, se utilizaron 10 µg de proteína. Las medidas de la actividad enzimática del CII de la cadena de transporte de

electrones mitocondrial, se realizó mediante espectrofotometría según protocolo [24], en células permeabilizadas (cardiomiocitos y cMacs) y en mitocondrias permeabilizadas aisladas de fibroblastos inmortalizados.

La actividad enzimática del CII (succinato deshidrogenasa), se mide siguiendo la disminución de la absorbancia durante 5-8 min a 600 nm debida a la oxidación del sustrato metabólico (succinato) siendo 2,6-diclorofenolindofenol el aceptor de electrones. El pocillo de reacción de actividad enzimática basal contiene el mix de reacción (buffer CI/C2 con BSA (2,5mg/ml), 2,6-diclorofenolindofenol:5mM, ubiquinona:65 mM en etanol, Antimicina A:1 mg/ml en etanol, Rotenona: 500 μ M en etanol) y la muestra (10 μ g) y posteriormente, se añade el sustrato metabólico del CII, succinato (0,06M), y se mide la actividad enzimática acoplándola con la reducción de la ubiquinona a ubiquinol.

Citometría de flujo para identificar cMacs

El análisis inmunofenotípico de la subpoblación de cMacs se realizó a partir del disgregado previo almacenado a -80°C . Una vez se descongelaron las células, se procedió a realizar un lavado con buffer PBE (PBS, EDTA 0,4 %, FBS 0,5 %) seguido de una centrifugación a 1,500 rpm por 5min, y el pellet se resuspendió en PBE. Para la caracterización inmunofenotípica de cMacs, se empleó un panel de marcadores de superficie con anticuerpos monoclonales y policlonales (CD45+, CD11+, Ly6+, MHCII-). Además, se realizó un control negativo sin anticuerpos primarios. Se incubaron las células con los anticuerpos conjugados a 4°C en oscuridad durante 15 min; y tras 3 lavados, se centrifugó 1,500 rpm por 5 min; el pellet se resuspendió en tampón PBE. El marcador fluorescente DAPI se utilizó como indicador de viabilidad celular. Las muestras fueron procesadas en el citómetro BD LSRFortessa™ X-20.

Tratamiento de los datos

Los valores se expresan con la media \pm SEM. Los datos fueron analizados para verificar una distribución normal; si era el caso, se aplicó tests paramétricos (t de Student no pareada o ANOVA para comparación entre grupos); y si no, se utilizaron tests no paramétricos (Mann Whitney o Kruskal Wallis). La significación se fijó en $P \leq 0,05$. En los análisis estadísticos, se emplearon los programas Microsoft Office Excel, GraphPad Prism 8 y FlowJo_v10-8-1.

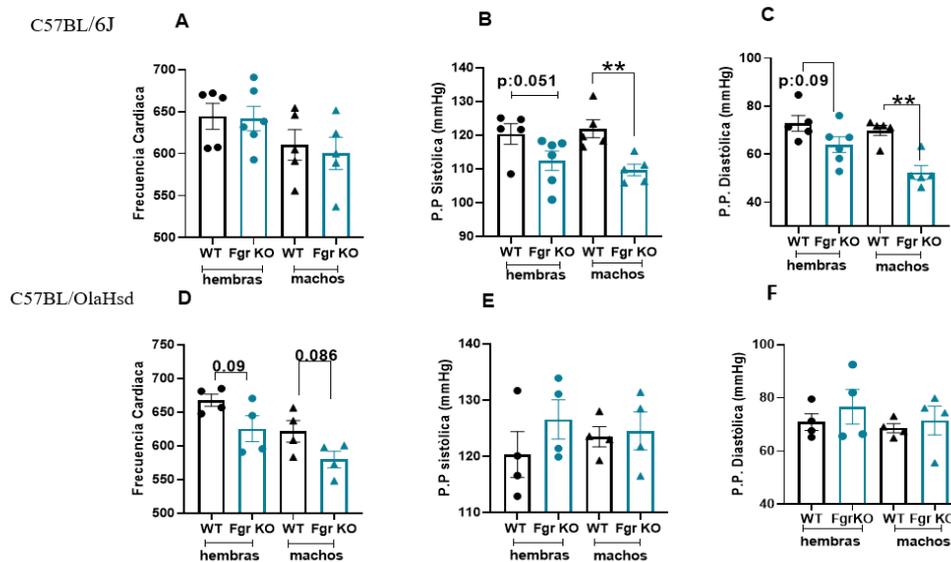


Figura 3. Comparación de la frecuencia cardíaca y presión arterial entre ratones WT (barras negras) y Fgr-KO (barras azules) con fondos genéticos distintos. **A-C:** ratones con el fondo genético C57BL/6J N=5 y 5 WT (machos y hembras respectivamente) y N=6 y 5 FgrKO (machos y hembras respectivamente). **B:** **p=0.0273 (t de Student no pareada). **C:** **p=0.0159 (t de Student no pareada). **D-F:** ratones con el fondo genético C57BL/OlaHsd N=4 y 4 WT (machos y hembras respectivamente) y N=4 y 4 FgrKO (machos y hembras respectivamente).

Resultados

Para conocer si hay diferencias intrínsecas entre los genotipos y evaluar efectos de la inhibición sistemática y crónica de Fgr, nos propusimos medir la frecuencia cardíaca y presión arterial a nivel basal como indicador de función cardíaca. Además, puesto que posteriormente íbamos a inyectar ISO para inducir un estrés cardíaco agudo, y el ISO incrementa la frecuencia cardíaca, era importante determinar los valores basales. Lo primero que observamos en la figura 3 panel A y D, es que la frecuencia cardíaca es similar en ambos fondos genéticos WT, pero sí hay diferencias entre sexos, como ya se ha descrito anteriormente (alrededor de 650 pulsaciones por minuto en hembras, y \approx 600 en machos). La frecuencia

cardíaca tiende a disminuir en ambos sexos en los Fgr-KO sólo en el fondo genético OlaHsd, lo que podría tener un efecto beneficioso. En contraste, respecto a la presión arterial, hay una disminución significativa en los ratones Fgr-KO del fondo C57BL/6J, especialmente marcado en machos, efecto que no ocurre en el fondo OlaHsd (ver figura 3, panel B-C; E-F).

Para activar Fgr, concretamente en el corazón, decidimos inducir un estrés agudo mediante una inyección de ISO. Se ha descrito que el ISO genera un aumento de ROS [22] y por tanto esto activaría Fgr, y por último esto conduciría a inflamación. Cabe esperar que la eliminación de Fgr lo prevenga. El ISO es un agonista β adrenérgico que aumenta la velocidad de conducción provocando arritmia. Para comprobar si la pérdida de Fgr, reduce la inflamación cardíaca tras inducir estrés, se cuantificó la CKMB como medida de inflamación, en muestras de suero sanguíneo, de ratones con los genotipos C57BL/6J y C57BL/OlaHsd, entre 8-14 semanas (ver figura 4, panel B-C). Como era de esperar, en ambos fondos hay un aumento significativo en los WT cuando inyectamos ISO. Sin embargo, en los ratones J Fgr-KO (Figura 4, panel B), la CKMB no incrementa significativamente en suero sanguíneo después de la administración de la droga; y el fondo C57BL/OlaHsd aumenta, pero en menor medida que el WT (Figura 4, panel C).

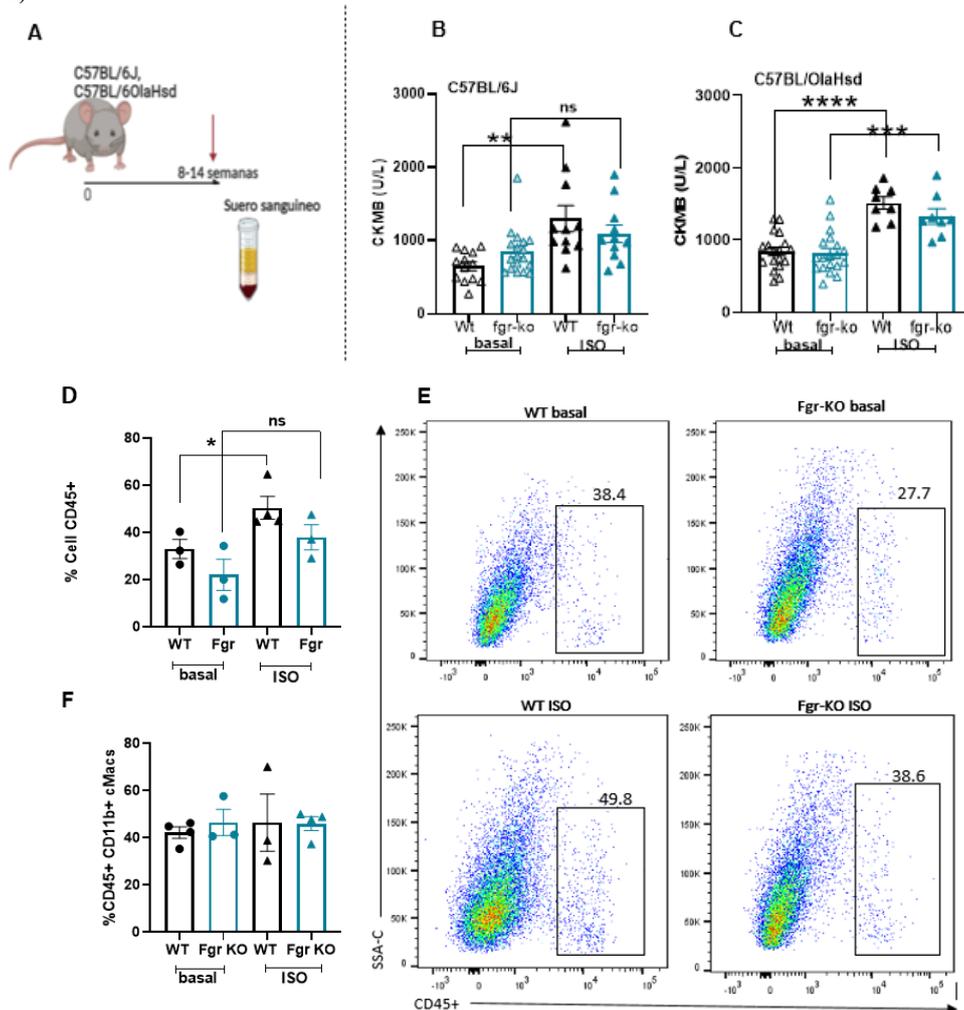


Figura 4. **Figura 4.** A-C: mediciones de CKMB. B: valores de CKMB en ratones C57BL/6J WT y FgrKO basal (N:13 y 18 respectivamente) y con ISO (N: 11 y 11 respectivamente): **: $p=0.0012$ (t de Student no pareada). ns (no significativo). C: medición de CKMB en ratones C57BL/OlaHsd WT y FgrKO basal ((N:18 y 19 respectivamente) y con ISO (N: 8 y 8 respectivamente). ****: $p<0.0001$ (t de Student no pareada). ****: $p=0.0004$ (t de Student no pareada). D-F: cuantificación de infiltrados de células inmunitarias CD45+, por citometría de flujo y porcentaje de células CD45+ en el corazón de ratones C57BL/6J WT y Fgr-KO basal (N=3 y 3, respectivamente) y con ISO (N=4 y 3 respectivamente); * $p=0.0458$ (t de Student no pareada). F: porcentaje de cMac (CD45+, CD11+, Ly6-, HCMII+) en el corazón de ratones C57BL/6J Wt y Fgr-KO basal (N=4 y 3 respectivamente) y con ISO (N=3 y 4 respectivamente). Los resultados eran similares en el fondo OlaHsd.

Por otro lado, otra manera de medir la respuesta inmune es cuantificar la infiltración de células inmunitarias CD45+ en el corazón tras el estrés cardíaco de ISO mediante citometría de flujo. De nuevo, la inyección de ISO produce un aumento de células CD45+ en el WT (Figura 4, panel D-E), lo que sugiere que el daño cardíaco producido por el ISO activa al sistema inmune. A diferencia del WT, los ratones J Fgr-KO responden con menos infiltrado de células inmunitarias ante un estímulo agudo, lo que

nos sugiera una respuesta inmune menos agresiva ante el estrés. Sin embargo, sorprendentemente, no vimos diferencias en el porcentaje de cMacs (Figura 4, panel F). Esto podría deberse a que los macrófagos tardan más tiempo en activarse/reclutarse y ya que sacrificamos a los animales 10 minutos post ISO no sería suficiente tiempo para ver diferencias en cMacs, pero otras hipótesis no se descartan.

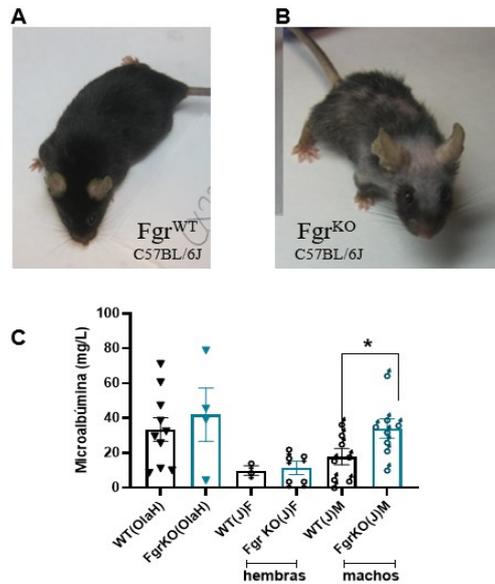


Figura 5: Síndrome similar a lupus en machos del fondo J. **A-B:** fenotipo de los ratones J machos a las 76 semanas Fgr-WT y Fgr-KO (dermatitis). **C:** valores de microalbúmina en el genotipo C57BL/OlaHsd (N=10 WT y 4 KO), y C57BL/6J separados por sexos (N=2 WT y 5 KO hembras; y N=8 WT y 8 KO machos), * $p=0.0499$ (Mann Whitney).

Una observación que se hizo en el laboratorio es que los ratones Fgr-KO viven significativamente más tiempo. Sin embargo, concretamente los machos del fondo C57BL/6J, tenían un aspecto envejecido (Figura 5, panel A-B). Estos últimos presentaban una dermatitis, en algunos casos severa, tan pronto como a la edad de 8 semanas (Figura 5). Consultando la literatura, vimos que se ha descrito un síndrome similar a lupus en otros KO de la familia de las Src quinastas. Además de la dermatitis, otra característica del lupus es que los ratones tienen proteinuria, manifestada por un aumento de microalbúmina en orina. Por tanto, medimos este parámetro en nuestros ratones. La figura 5C muestra que 1) los ratones OlaHsd tienen niveles más altos de microalbúmina que los J de manera intrínseca, pero no asociada a enfermedad ya que los OlaHsd KO no tienen dermatitis, 2) el aumento de microalbúmina en el fondo J es exclusivo de machos, resultado que coincide con los ratones que sí tienen dermatitis. Esto sugiere que los machos Fgr-KO de fondo J tienen un síndrome similar a lupus.

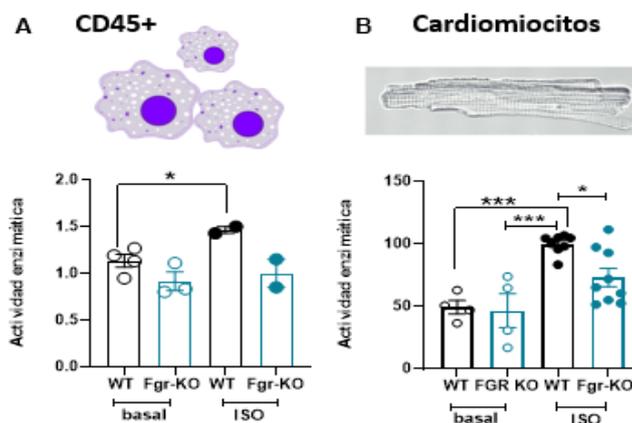


Figura 6. Medición de la actividad enzimática del CII en células CD45+ cardíacas y cardiomiocitos de ratones WT y Fgr-KO. **A:** actividad enzimática del CII en CD45+ aislados de ratones WT (N=4 basal y 2 con ISO) y FgrKO (N=3 basal y 2 ISO). * $p=0.0352$ (t de Student no pareada). **B:** actividad enzimática del CII en cardiomiocitos de ratones WT (N=4 basal y 8 con ISO) y FgrKO (N=4 basal y 9 con ISO). *** $p<0.0005$ (ANOVA). * $p=0.028$ (ANOVA).

Lo siguiente que quisimos estudiar es el papel de Fgr en la regulación de la actividad del CII en distintos tipos celulares del corazón. El corazón contiene varios tipos celulares de los cuales los cardiomiocitos son los mayoritarios tanto en número como en volumen. En la figura 6, lo primero que observamos es que no hay diferencias entre WT y FgrKO en la actividad del CII a nivel basal ni en CD45+ ni en cardiomiocitos,

lo que puede ser porque Fgr no está activada en estado basal. Al administrar el ISO, la actividad enzimática del CII tanto en las células hematopoyéticas CD45+ como los cardiomiocitos de los ratones WT aumentan significativamente, lo que sugiere que ambos tipos celulares expresan Fgr ya que ese aumento sea posiblemente debido a que el estrés inducido por el ISO activa Fgr, que fosforila al CII y aumenta su actividad. De hecho, observamos que este aumento del CII no ocurre en las células de los Fgr-KO (ver figura 6).

La finalidad última del proyecto es poder utilizar inhibidores de Fgr en pacientes para reducir la inflamación cardíaca. Mediante la inhibición de Fgr esperamos que la actividad del CII no aumente y por tanto prevenir la inflamación. Por tanto, como test preliminar, estudiamos *in vitro* si el inhibidor de Fgr TL0259 (10 nM) puede modificar la actividad del CII mitocondrial en mitocondrias aisladas de fibroblastos inmortalizados de ratones C57BL/6J Fgr-KO y WT (figura 7, panel A). En la figura 7, panel B, vemos que la actividad del CII aumenta en WT cuando se tratan las células con rotenona (barra WT+ Rot), ya que esta produce una inhibición del CI y un aumento de ROS; y el aumento del CII se debe a la activación de Fgr ya que, si además se tratan las células con TL0259 o bien se pone el tratamiento de rotenona en células FgrKO, se previene el aumento (barra WT+Rot+TL0259 y barra FgrKO+ Rot). Los datos sugieren que cuando hay aumento de ROS, aumenta la actividad del CII y esto se previene mediante la inhibición farmacológica de Fgr.

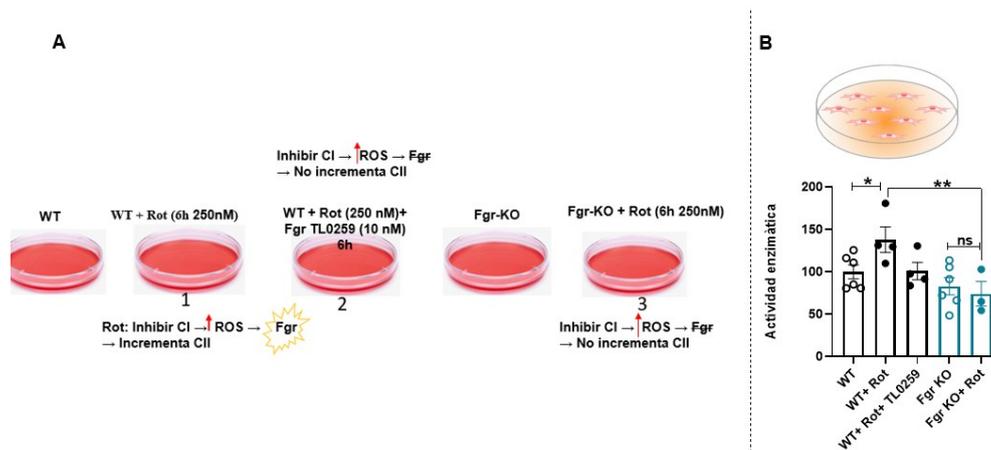


Figura 7. Actividad enzimática del CII en mitocondrias aisladas de fibroblastos inmortalizados tratados en diferentes condiciones. * $p=0.0422$ (t de Student no pareada). ** $p=0.0137$ (t de Student no pareada).

Discusión.

En este estudio hemos caracterizado el papel de la quinasa Fgr en el corazón en condiciones basales y en condiciones de estrés cardíaco agudo usando dos modelos murinos de Fgr-KO. La eliminación de Fgr de manera crónica y sistémica resulta en, 1) una sorprendente disminución de la presión cardíaca (principalmente en machos del fondo genético C57BL/6J) de manera basal; 2) una disminución de parámetros de inflamación cardíaca bajo condiciones de estrés agudo (menos CKMB y menor infiltración de células del tejido hematopoyético CD45+); y 3) mayor longevidad, pero asociada a un síndrome similar a lupus (principalmente en machos del fondo genético C57BL/6J). Además, hemos demostrado que la implicación de Fgr en la regulación de la actividad del CII no se limita a cMaes, sino que también afecta a cardiomiocitos. Por último, sugerimos que inhibir Fgr farmacológicamente puede tener un papel cardioprotector al impedir el aumento de la actividad del CII y, por tanto, podría evitar la inflamación cardíaca.

Una de las conclusiones más importantes que sacamos del estudio es la relevancia del modelo a usar y las diferencias intrínsecas entre sexos [25]. En este estudio hemos usados dos modelos murinos con dos fondos genéticos y hemos separado en la mayoría de los experimentos machos y hembras. Observamos diferencias muy significativas entre los distintos grupos. Es fundamental que los investigadores sean conscientes de estas diferencias ya que, entre otros, se pueden observar resultados contradictorios entre laboratorios. Esto también hace que cualquier extrapolación con otros modelos (ya sean murinos, o de otras especies, incluyendo al humano) debe hacerse con cautela. Se suele decir “Mice are not human” (los ratones no son humanos) para explicar la imperfección de los modelos, pero en este caso podemos ir más allá y decir que no todos los modelos murinos son iguales, ni los sexos se comportan igual.

Una de las mediciones donde mayores diferencias entre el fondos genéticos y sexo vemos es en la frecuencia cardíaca y presión arterial. En el fondo C57BL/6J, hay una disminución de la presión arterial, efecto que no ocurre en el fondo OlaHsd; sin embargo, en este último hay una disminución de la frecuencia cardíaca. En cualquier caso, es interesante mencionar que Fgr también se ha descrito que se expresa en células endoteliales, lo que podría explicar el efecto en la presión arterial. Ya que el ISO

aumenta la frecuencia cardíaca, nos propusimos medir la presión arterial tras la administración de ISO; sin embargo, esto no fue posible debido a que el estrés inducido por el ISO es demasiado alto, lo que imposibilitó las lecturas dentro de las celdas de medición.

Hemos estudiado dos parámetros para evaluar la inflamación cardíaca: medimos CKMB en sangre y cuantificamos la infiltración de cMacs en el corazón. En experimentos posteriores se pretenderá medir otros parámetros como fibrosis mediante histología, y medir citoquinas proinflamatorias. Es importante mencionar que la dosis inyectada de ISO es una dosis muy alta para asegurarnos que Fgr se active. La CKMB es la primera enzima que se eleva en el torrente sanguíneo después de un infarto [26], y es un indicador de inflamación. Observamos que su aumento en ratones Fgr-KO tratados con ISO no es tan pronunciado como en ratones WT. De la misma manera, observamos una menor infiltración de células hematopoyéticas CD45+ en los Fgr-KO tratados con ISO. Nuestros datos sugieren que, ante el estrés cardíaco agudo (mediado por la cardiotoxicidad del ISO), la ausencia de Fgr impide que las células liberen mediadores de la inflamación lo que favorecería una respuesta celular menos agresiva ante el estrés cardíaco y podría ser cardioprotector.

Una observación del grupo del Dr. Enriquez, es que los ratones Fgr-KO, viven significativamente más tiempo (datos sin publicar), sin embargo, observamos que los ratones desarrollan una dermatitis compatible con un síndrome similar a lupus. Un aspecto importante para considerar es que se ha descrito que las deficiencias de Lyn, Fyn o Csk, todos miembros de la familia de Src como la Fgr, conducen a un síndrome tipos lupus leve, probablemente debido a la desregulación sistémica y sostenida del sistema inmune [27]. De nuevo, observamos diferencias entre sexos y fondos genéticos, estando la dermatitis y la microalbumina en orina solo presente/aumentada en machos del fondo J.

La mayoría de las quinasas de la familia Src se han descrito principalmente en células inmunitarias. Sin embargo, ya que los propios cardiomiocitos pueden participar en inflamación liberando citoquinas, nos parecía interesante analizar si Fgr tiene un rol en este proceso. Para tener una medida más directa, quisimos cuantificar la expresión de la proteína Fgr en miocitos aislados mediante western blot, pero el anticuerpo que tenemos no funciona correctamente. Por tanto, decidimos usar una manera indirecta: establecer si la presencia o ausencia de Fgr modula la actividad del CII en cardiomiocitos aislados. Demostramos que en presencia de Fgr en condiciones de estrés agudo aumenta la actividad del CII en cardiomiocitos aislados, proceso que no ocurre en ausencia de Fgr (cardiomiocitos de ratones Fgr KO). Esto sugiere que Fgr se puede expresar también en cardiomiocitos en situaciones de estrés, lo que podría tener un efecto multiplicador de la señal inflamatoria y tener un efecto contraproducente. Por tanto, idealmente un inhibidor de Fgr tendría como diana tanto los cMacs como los cardiomiocitos.

Hasta ahora todos los experimentos se han hecho en modelos murinos donde Fgr es eliminado de manera crónica y sistémica. En el laboratorio estamos trabajando para hacer un modelo murino donde la Fgr se elimine exclusivamente en un tejido (knock out condicional) mediante una inyección de tamoxifeno; de esta manera podremos controlar la localización y el momento en el que se elimina el gen (por ejemplo, podríamos eliminarlo solo en ratones que presentan una cardiomiopatía). Esto sería una situación más real, ya que un inhibidor de Fgr se daría solo a ciertas personas bajo ciertas circunstancias.

Una de las mayores ventajas de esta diana (Fgr) es que ya existe un inhibidor que, a dosis bajas, es específico de Fgr. Se ha demostrado que el inhibidor TL0259 a la dosis que hemos usado (10 nM) disminuye la cantidad de proteína Fgr sin afectar a las otras quinasas de la familia Src [16]. Estos estudios se han realizado en ciertos tipos de cáncer, pero no nos consta ningún estudio en corazón, lo que hace que sea un estudio muy novedoso. Una primera aproximación *in vitro* para estudiar el inhibidor TL0259 es saber si afecta a la actividad del CII. Utilizando fibroblastos inmortalizados de ratón WT y Fgr KO, hemos demostrado que, a) en condiciones basales, no hay diferencias en la actividad del CII entre fibroblastos WT, tratados con el inhibidor TL0259, y fibroblastos Fgr KO, sugiriendo que Fgr está “inactivo” de manera basal; b) en condiciones de aumento de ROS (provocado mediante la adición de rotenona durante 6 horas en el medio), la actividad del CII aumenta en fibroblastos WT pero no aumenta en los Fgr KO, lo que sugiere que el aumento de la actividad se debe a la activación de Fgr; y c) el tratamiento con el inhibidor TL0259 en fibroblastos WT tratados con rotenona (ROS aumentado, Fgr activa) impide el aumento de la actividad del CII, indicando que efectivamente TL0259 está inhibiendo la quinasa Fgr y por tanto está no puede fosforilar al CII.

Conclusiones y perspectivas futuras

La quinasa Fgr tiene un papel protagonista en la inflamación del tejido cardíaco, mostrando datos muy prometedores como futura diana terapéutica. En nuestro estudio, demostramos que la quinasa Fgr está participando en los procesos inflamatorios del corazón y que, además, su papel no está limitada a un tipo celular (cMacs), sino que también participa activamente en la célula principal del corazón, el cardiomiocito. Las demás células distribuidas del tejido (cardiomiocitos). Además, demostramos *in vitro* que el inhibidor de Fgr TL0259, tiene un efecto directo reductor sobre la actividad enzimática del CII lo que disminuiría una respuesta inflamatoria celular. Nuestro trabajo experimental en cultivo celular y en el modelo de ratón sistémico Fgr-KO, ha demostrado que la inhibición de Fgr actúa como un factor

protector importante en el proceso inflamatorio cardiaco. Sin embargo, las diferencias son condicionales al fondo genético lo que nos lleva a plantearnos la necesidad de desarrollar nuevos experimentos que nos permitan comprender mejor el papel de Fgr de cara a trasladar los estudios a humanos.

A futuro, el laboratorio se propone generar ratones Fgr-KO condicionales que permitirán comprender mejor el papel de la quinasa Fgr en los distintos órganos. Además, será importante evaluar el papel de la Fgr no solo en estrés agudo, sino en otros tipos de estrés cardiaco crónico como en insuficiencia cardiaca o en isquemia. Por último, probaremos el inhibidor TL0259 *in vivo* que aportará datos interesantes si se plantea a futuro su uso como un posible candidato terapéutico.

Agradecimientos

La autora agradece al grupo GENOXPHOS del CNIC, a la Universidad de Alcalá y a Fundación Carolina por la beca otorgada para la realización del Máster.

Referencias bibliográficas

1. Cardiovascular diseases. 2021 (11June). World health Organization. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Steven, S. Frenis, K. Oelze M, et al. 2019. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2019/7092151.
3. Ferrucci, L. Fabbri, E. 2018. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*, 15(9):505-522.
4. Frostegård, J. 2013. Immunity, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *BMC Med*, 11: 117.
5. Münzel, T. Camici, GG. Maack, C. Bonetti, NR. Fuster, V. Kovacic, JC. 2017. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature. *J Am Coll Cardio*, 70(2):212-229.
6. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203):428-435.
7. Acín-Pérez, R. Carrascoso, I. Baixauli, F. et al. 2014. ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metab*, 19(6):1020-1033.
8. Acín-Pérez, R. Iborra, S. Martí-Mateos, Y. et al. 2020. Fgr kinase is required for proinflammatory macrophage activation during diet-induced obesity. *Nat Metab*, 2(9):974-988.
9. Garaude, J. Acín-Pérez, R. Martínez-Cano, S. et al. 2016. Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense. *Nat Immunol*, 17(9):1037-1045.
10. Roskoski, R Jr. 2015. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, 94:9-25.
11. Dwyer, A.R. Mouchemore, K.A. Steer, J.H. et al. 2016. Src family kinase expression and subcellular localization in macrophages. *J Leukoc Biol*, 100(1):163-75.
12. Crainiciuc, G. Palomino-Segura, M. Molina-Moreno, M. et al. 2022. Behavioural immune landscapes of inflammation. *Nature*, 601(7893):415-421.
13. Pérez-Hernández, M. et al. 2021. Transcriptomic Coupling of PKP2 With Inflammatory and Immune Pathways Endogenous to Adult Cardiac Myocytes. *Front Physiol*, 11:623190.
14. Chelko, SP. Asimaki, A. Lowenthal, J. et al. 2019. Therapeutic Modulation of the Immune Response in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circulation*, 140(18):1491-1505.
15. Lu, X.L. Liu, X.Y. Cao, X. Jiao, B.H. 2012. Novel patented SRC kinase inhibitor. *Curr Med Chem*, 19(12):1821-1829.
16. Weir, M.C. Shu, S.T. Patel, R.K. et al. 2018. Selective Inhibition of the Myeloid Src-Family Kinase Fgr Potently Suppresses AML Cell Growth in Vitro and in Vivo. *ACS Chem Biol*, 13(6):1551-1559.
17. Quinlan, C.L. Orr, A.L. Perevoshchikova, I.V. Treberg, J.R. Ackrell, B.A. Brand, M.D. 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32):27255-64.
18. Hadrava Vanova, K. Kraus, M. Neuzil, J. Rohlena, J. 2020. Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. *Redox Rep*, 25(1):26-32.
19. Mills, EL. Kelly, B. Logan, A. et al. 2016. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 167(2):457-470.
20. Flores, P. Infante, O. Torres, G. Memije, R. Rossini, G. 2002. A non-invasive method to record vital signs in rats. *Instituto Nacional de Cardiología de Mexico*. 33(2):180-186.

21. Ackers-Johnson, M. Li, P.Y. Holmes, A.P. O'Brien, S.M. Pavlovic, D. Foo, R.S. 2016. A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes from the Adult Mouse Heart. *Circ Res*, 119(8):909-920.
22. Chang, S.C. et al. 2018. Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model Using Osmotic Pump Implantation. *Methods Mol Biol*, 1816:207-220.
23. Preble, J. M., Pacak, C. A. Kondo, H. MacKay, A. A. Cowan, D. B. McCully, J. D. Rapid Isolation and Purification of Mitochondria for Transplantation by Tissue Dissociation and Differential Filtration. *J. Vis. Exp.* (91)
24. Birch-Machin, M.A. Turnbull, D.M. 2001. Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol*, 65:97-117.
25. Enríquez, J.A.2019. Mind your mouse strain. *Nat Metab*;1(1):5-7. doi:10.1038/s42255-018-0018-3.
26. Faulx, MD. Chandler, MP. Zawaneh, MS. Stanley, WC. Hoit, BD.2007. Mouse strain-specific differences in cardiac metabolic enzyme activities observed in a model of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;34(1-2):77-80.
27. Lee, HY. Celhar, T. Fairhurst AM. 2021. Assessing Lupus-Like Disease in Murine Model Systems. *Curr Protoc*;1(11):272.