

Artículo original

La inhibición de la PI3K γ protege contra la miocardiopatía diabética en ratonesAngelo Maffei^a, Giuseppe Cifelli^a, Raimondo Carnevale^a, Roberta Iacobucci^a, Fabio Pallante^a, Valentina Fardella^a, Stefania Fardella^a, Emilio Hirsch^b, Giuseppe Lembo^{a,c} y Daniela Carnevale^{a,c,*}^a Department of Angiocardioneurology and Translational Medicine, IRCCS Neuromed, Istituto Neurologico Mediterraneo, Pozzilli, Isernia, Italia^b Department of Molecular Biotechnologies and Health Sciences, University of Torino, Turin, Italia^c Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Roma, Italia

Historia del artículo:

Recibido el 2 de octubre de 2015

Aceptado el 7 de abril de 2016

On-line el 13 de julio de 2016

Palabras clave:

Diabetes mellitus

Miocardiopatía

Fármacos en investigación

Proteína PI3K γ

Ratón

RESUMEN

Introducción y objetivos: Las enfermedades cardiovasculares, incluida la miocardiopatía, son las principales complicaciones de la diabetes mellitus. Un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares que conducen a la miocardiopatía es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos. Se propuso la fosfoinosítido 3-cinasa gamma (PI3K γ) como objetivo molecular contra la miocardiopatía diabética, dado el papel que desempeña la PI3K γ en el remodelado cardiaco frente a la sobrecarga de presión. Dada la disponibilidad de un inhibidor farmacológico de este objetivo molecular, el GE21, se ha investigado la validez de nuestra hipótesis induciendo la diabetes a ratones con ablación genética de la PI3K γ , o *knock-in*, para una PI3K γ catalíticamente inactiva.

Métodos: Se provocó la diabetes a los ratones empleando estreptozotocina. Se evaluó la función cardiaca mediante exámenes ecocardiográficos secuenciales, mientras que la fibrosis y la inflamación se evaluaron mediante examen histológico.

Resultados: La diabetes mellitus indujo disfunción cardiaca en los ratones genéticamente intactos (*wild-type*). La disfunción sistólica se previno completamente y la diastólica parcialmente, tanto en ratones con PI3K γ inactivada como ratones sin actividad de cinasa. La disfunción cardiaca se recuperó en la misma medida administrando el inhibidor de la PI3K γ GE21, de manera dependiente de la dosis. Estas acciones de inhibición genética o farmacológica de la PI3K γ se asociaron con una reducción de la fibrosis y la inflamación en el corazón diabético.

Conclusiones: Nuestro estudio demuestra un papel fundamental de la PI3K γ en la miocardiopatía diabética en ratones y el efecto beneficioso de la inhibición farmacológica de la PI3K γ ; destaca su potencial como estrategia prometedora para el tratamiento clínico de las complicaciones cardiacas de los pacientes diabéticos.

© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

PI3K γ Inhibition Protects Against Diabetic Cardiomyopathy in Mice

ABSTRACT

Introduction and objectives: Cardiovascular diseases, including cardiomyopathy, are the major complications in diabetes. A deeper understanding of the molecular mechanisms leading to cardiomyopathy is critical for developing novel therapies. We proposed phosphoinositide3-kinase gamma (PI3K γ) as a molecular target against diabetic cardiomyopathy, given the role of PI3K γ in cardiac remodeling to pressure overload. Given the availability of a pharmacological inhibitor of this molecular target GE21, we tested the validity of our hypothesis by inducing diabetes in mice with genetic ablation of PI3K γ or knock-in for a catalytically inactive PI3K γ .

Methods: Mice were made diabetic by streptozotocin. Cardiac function was assessed by serial echocardiographic analyses, while fibrosis and inflammation were evaluated by histological analysis.

Results: Diabetes induced cardiac dysfunction in wild-type mice. Systolic dysfunction was completely prevented, and diastolic dysfunction was partially blocked, in both PI3K γ knock-out and kinase-dead mice. Cardiac dysfunction was similarly rescued by administration of the PI3K γ inhibitor GE21 in a dose-dependent manner. These actions of genetic and pharmacological PI3K γ inhibition were associated with a decrease in inflammation and fibrosis in diabetic hearts.

Keywords:

Diabetes mellitus

Cardiomyopathy

Investigational drugs

PI3K γ protein

Mouse

* Autor para correspondencia: Department of Angiocardioneurology and Translational Medicine, IRCCS Neuromed, Via Atinense 18, 86077 Pozzilli, Isernia, Italia. Correo electrónico: Daniela.carnevale@uniroma1.it (D. Carnevale).

Conclusions: Our study demonstrates a fundamental role of PI3K γ in diabetic cardiomyopathy in mice and the beneficial effect of pharmacological PI3K γ inhibition, highlighting its potential as a promising strategy for clinical treatment of cardiac complications of diabetic patients.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

DM: diabetes mellitus
 KD: sin actividad de cinasa (*kinase-dead*)
 KO: *knock-out*
 MCD: miocardiopatía diabética
 PI3K γ : fosfoinosítido 3-cinasa gamma
 WT: animales genéticamente intactos (*wild-type*)

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un importante problema de salud pública que afecta a casi 400 millones de personas y causa 5 millones de muertes al año en todo el mundo¹. Las complicaciones cardiovasculares, como la aterosclerosis y la miocardiopatía, son las principales causas de muerte en la DM.

En la DM se observan varias anomalías cardíacas, como apoptosis, hipertrofia, fibrosis y alteraciones de la contractilidad de los miocitos, que dan lugar a disfunción ventricular izquierda. Estas anomalías llevan al trastorno clínico denominado miocardiopatía diabética (MCD), que se diagnostica cuando se produce una disfunción ventricular sin que haya aterosclerosis coronaria ni hipertensión. Se ha demostrado que la DM aumenta el riesgo de insuficiencia cardíaca entre 2 y 5 veces².

La miocardiopatía diabética puede tener varias causas, ya que hay distintas alteraciones anatomopatológicas inducidas por el estado hiperglucémico, como el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la alteración del perfil inflamatorio, que pueden afectar a la función y la estructura del corazón³.

Un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares que conducen a las anomalías cardíacas anatomopatológicas es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos destinados a mejorar la evolución cardiovascular de los pacientes diabéticos.

Hemos estudiado ampliamente, tanto en células cardíacas como en leucocitos, la señalización de la isoforma gamma de la fosfoinosítido 3-cinasa gamma (PI3K γ), una cinasa de lípidos y proteínas que genera el segundo mensajero fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato, y da lugar a la activación de las cascadas de señalización de pasos posteriores. Al estudiar la función que esta proteína cumple en el remodelado cardíaco en respuesta a la sobrecarga de presión, se observó que, en los miocitos, la PI3K γ ejerce un control negativo de la concentración de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) como proteína de almacén^{4,5} y desempeña un papel clave durante la internalización de los receptores adrenérgicos β activados, a través de su actividad cinasa⁶. Además, dado que se sabe que la PI3K γ regula la migración de los leucocitos al desencadenar la acumulación de fosfatidil(3,4,5)-trifosfato en el borde de avance⁷, se exploró con mayor detalle la repercusión de esta vía de señalización en el proceso inflamatorio que interviene en el remodelado cardíaco en respuesta a la sobrecarga de presión. Se observó que la PI3K γ leucocitaria afecta de manera crucial al reclutamiento de células inflamatorias y el proceso fibroso que es característico observar en la sobrecarga de presión, ya que su inhibición permite un remodelado cardíaco favorable⁸. En el aspecto vascular, se ha descrito que los ratones que carecen de PI3K γ están protegidos

contra la hipertensión inducida por la administración crónica de angiotensina II⁹ a través de un mecanismo en el que intervienen tanto el estrés oxidativo como el manejo del calcio, lo cual indica un papel adicional de la PI3K γ en la regulación del tono vascular. Recientemente, se ha sintetizado un nuevo inhibidor farmacológico de la PI3K γ de molécula pequeña, que parece prometedor en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares asociadas a la inflamación¹⁰.

La hipótesis del presente estudio es que la vía de señalización de la PI3K γ puede ser importante en la regulación de la migración leucocitaria y el remodelado cardíaco, incluso en otros contextos de fisiopatología cardiovascular, como las alteraciones cardíacas inducidas por la DM. Así pues, se investigó si la PI3K γ tiene un papel en el desarrollo de la disfunción cardíaca inducida por la DM y si la inhibición farmacológica de la PI3K γ por medios farmacológicos puede tener efecto terapéutico ante esa complicación de la DM.

MÉTODOS

Modelo animal

Se utilizaron ratones C57Bl/6J machos de 8 semanas de edad, *knock-out* (KO) para la p110 γ , que es la subunidad catalítica de la PI3K γ , o ratones *knock-in* con una p110 γ catalíticamente inactiva (*kinase-dead* [KD]), así como otros ratones de las respectivas camadas, genéticamente intactos (*wild-type* [WT]). Se generaron ratones transgénicos con un método descrito con anterioridad⁵. Se mantuvo en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a los animales, que dispusieron de alimento y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron según lo establecido en las guías europea (Directiva del Consejo de la CE 2010/6) e italiana (D.Lgs. 116/92) sobre el cuidado de los animales, y fueron autorizados por un comité del centro.

Se indujo DM mediante inyecciones consecutivas de estreptozotocina. Se disolvió estreptozotocina (Sigma-Aldrich; Estados Unidos) en tampón de citrato de Na al 2,94% con pH 4,5 y concentración de 7,5 mg/ml. Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal estreptozotocina 50 mg/kg/día durante 5 días.

La aparición de la DM se determinó mediante análisis de la glucosa en suero tras un periodo de 12 h en ayunas y utilizando un *kit* de análisis colorimétrico de la glucosa (Cayman Chemical; Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante.

Se disolvió GE21 en agua y se administró mediante sonda a dosis de 5 mg/kg/día o 50 mg/kg/día, según estuviera indicado. La administración de GE21 se inició 7 semanas después de la primera inyección de estreptozotocina.

Análisis ecocardiográfico

Se realizaron análisis ecocardiográficos seriados hasta 15 semanas después de las inyecciones de estreptozotocina.

El análisis ecocardiográfico se realizó después de aplicar a los ratones anestesia con isoflurano (al 5% en oxígeno a 1 l/min para la inducción y al 1% para el mantenimiento de la anestesia), utilizando un dispositivo Vevo 2100 equipado con un transductor de haz lineal de 15–40 MHz (Visualsonics; Canadá). La adquisición de todas las imágenes ecocardiográficas se realizó cuando la

frecuencia cardiaca de los ratones era de entre 540 y 590 lpm. Se obtuvo un registro ventricular izquierdo en modo M, utilizando imágenes de eje corto paraesternal bidimensionales como guía. Se midió el grosor del septo interventricular y de la pared posterior en la fase telediastólica, así como el diámetro interno del ventrículo izquierdo. Se calcularon el grosor relativo de la pared, la fracción de eyección y la fracción de acortamiento utilizando fórmulas estándares.

A continuación, en proyección apical de 4 cámaras, se realizó un análisis de Doppler pulsado a nivel de la válvula mitral para determinar el llenado ventricular rápido (onda E) y se utilizó Doppler tisular para determinar la velocidad de relajación precoz a través de la onda E' en el anillo mitral lateral. Puede argumentarse que el cociente E/E' no es un indicador perfecto de la función diastólica, que se podría estimar mejor con métodos invasivos como las curvas de presión-volumen. Sin embargo, se ha demostrado que el cociente E/E' es el parámetro no invasivo más útil como estimador de la función diastólica¹¹, y se optó por este método porque permite evaluar la función diastólica continuamente en el mismo animal.

Por último, se realizó un análisis de la deformación según un método ya descrito¹². De manera resumida, se utiliza un análisis de *strain* basado en el método de *speckle-tracking* de imágenes de ecocardiografía bidimensionales y en escala de grises adquiridas en las proyecciones de eje corto y eje largo paraesternal, para cuantificar la *strain* y la *strain rate* (tasa de deformación) en los ejes longitudinal y radial. Todas las imágenes se adquirieron a una velocidad alta (unos 200 fotogramas/s).

Histología

Se anestesió a los ratones, se realizó una toracotomía y se provocó una parada cardiaca en diástole (inyección intracardiaca de 100 μ l de KCl 1 M). Se extrajeron los corazones y se aplicó posfijación durante una noche en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato, tras lo cual se incluyeron en parafina. En los cortes cardiacos (4 μ m), se determinó la PI3K γ mediante tinción con un anticuerpo específico (1:100) producido con métodos ya descritos^{6,8}, seguida de un anticuerpo secundario antirrátón (1:200, Jackson Immunoresearch; Estados Unidos). Los cortes se tiñeron también con anti-CD68 (1:200, AbD Serotec; Reino Unido), seguido de un anticuerpo secundario antirrata (1:200, Jackson Immunoresearch) con objeto de evaluar la infiltración macrofágica. Además, se evaluó la fibrosis en cortes teñidos con rojo Sirius y se cubrieron con cubreobjetos utilizando medios de montaje de preparaciones con xileno.

Todas las imágenes se captaron con un microscopio de fluorescencia/óptico DMI3000B Leica (Leica Microsystems; Alemania) y se procesaron para los análisis cuantitativos con el programa Leica Application Suite (LAS V3.3) Image Analysis.

Tabla

Parámetros ecocardiográficos de la estructura cardiaca

	Control			Diabetes mellitus			Diabetes mellitus + GE21		
	4 semanas	8 semanas	11 semanas	4 semanas	8 semanas	11 semanas	4 semanas	8 semanas	11 semanas
SIV (mm)	0,73 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,76 \pm 0,02	0,74 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01
PP (mm)	0,73 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01	0,74 \pm 0,02	0,73 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01
DTDVI (mm)	3,41 \pm 0,02	3,48 \pm 0,08	3,53 \pm 0,06	3,47 \pm 0,06	3,59 \pm 0,07	3,65 \pm 0,05	3,45 \pm 0,03	3,56 \pm 0,06	3,59 \pm 0,03
VTDVI (mm)	47,0 \pm 1,7	50,2 \pm 2,6	52,1 \pm 2,1	49,0 \pm 1,3	54,1 \pm 2,4	55,5 \pm 1,2	49,3 \pm 1,1	52,9 \pm 2,3	50,4 \pm 1,2
GPR	0,43 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01
MVI (mg)	63,4 \pm 2,9	67,3 \pm 2,4	71,4 \pm 2,7	65,2 \pm 2,4	71,3 \pm 2,4	73,4 \pm 2,6	67,5 \pm 2,1	69,7 \pm 2,7	69,4 \pm 1,3

DTDVI: diámetro telediastólico ventricular izquierdo; GPR: grosor relativo de la pared; MVI: masa ventricular izquierda; PP: grosor de la pared posterior ventricular izquierda en diástole; SIV: grosor del septo interventricular en diástole; VTDVI: volumen telediastólico ventricular izquierdo.

Parámetros ecocardiográficos de la estructura cardiaca de los ratones de control, los tratados con estreptozotocina (50 mg/kg/día durante 5 días) y los tratados con estreptozotocina más la dosis superior de GE21 (50 mg/kg/día, iniciada 5 semanas después de la estreptozotocina).

Análisis estadístico

Los datos se expresan en forma de media \pm error estándar de la media. Se analizaron con un ANOVA (análisis de la varianza) de una vía o con ANOVA de medidas repetidas, según fuera apropiado, seguido de la prueba de Bonferroni *post hoc*, utilizando un programa informático de estadística (SPSS 21.0, IBM). Se consideró significativo un valor de p bilateral < 0,05.

RESULTADOS

Efectos de la diabetes mellitus en los parámetros fisiológicos y la estructura y la función cardiacas

La DM inducida por la infusión de estreptozotocina en 4 semanas elevó la glucemia en ayunas de 180 \pm 9 a 303 \pm 30 mg/dl (p < 0,05) e inhibió el aumento del peso corporal inducido por el avance de la edad en los ratones de control (24,4 \pm 0,5 frente a 26,1 \pm 0,4 g al final del periodo de observación). La DM no afectó a los índices macroscópicos de la estructura cardiaca. De igual modo, la inhibición de la PI3K γ no tuvo efecto alguno en la estructura del corazón. De hecho, ni las mediciones del grosor del septo interventricular y de la pared posterior ni las del diámetro y el volumen del ventrículo izquierdo mostraron diferencias entre los grupos experimentales (tabla). De igual modo, los parámetros calculados, como la masa ventricular izquierda y el grosor relativo de la pared, fueron similares en los ratones diabéticos y los de control (tabla).

Tal como se esperaba, la DM indujo miocardiopatía. Concretamente, se observó un deterioro de la función sistólica (evaluada mediante la fracción de acortamiento y la fracción de eyección) (figura 1) 15 semanas después de la inducción de DM. La función sistólica empeoró hasta el final del periodo de observación. La DM inducida por estreptozotocina provocó también una disfunción diastólica, evaluada mediante el cociente E/E'. La disfunción diastólica se inició en la semana 11 tras la infusión de estreptozotocina y empeoró luego hasta el final del estudio.

Para evaluar con mayor detalle la función cardiaca, se realizó un análisis de la *strain*, y se observó que los ratones diabéticos presentaban una alteración de la función miocárdica tanto en el movimiento radial como en el longitudinal (figura 2). De hecho, la DM determinó una disminución de la velocidad radial y longitudinal, el desplazamiento y la *strain*. De igual modo, la DM redujo la *strain* radial y longitudinal.

La modulación genética de la PI3K γ contrarresta la disfunción sistólica y diastólica observada en los ratones diabéticos

La DM se asoció a activación de la PI3K γ en el corazón, según lo indicado por la evaluación inmunohistoquímica (figura 3). Así pues, se investigó si la PI3K γ intervenía en la MCD mediante el examen de ratones con ablación genética de la PI3K γ (KO). Además, se investigó si estos efectos se debían a la actividad cinasa

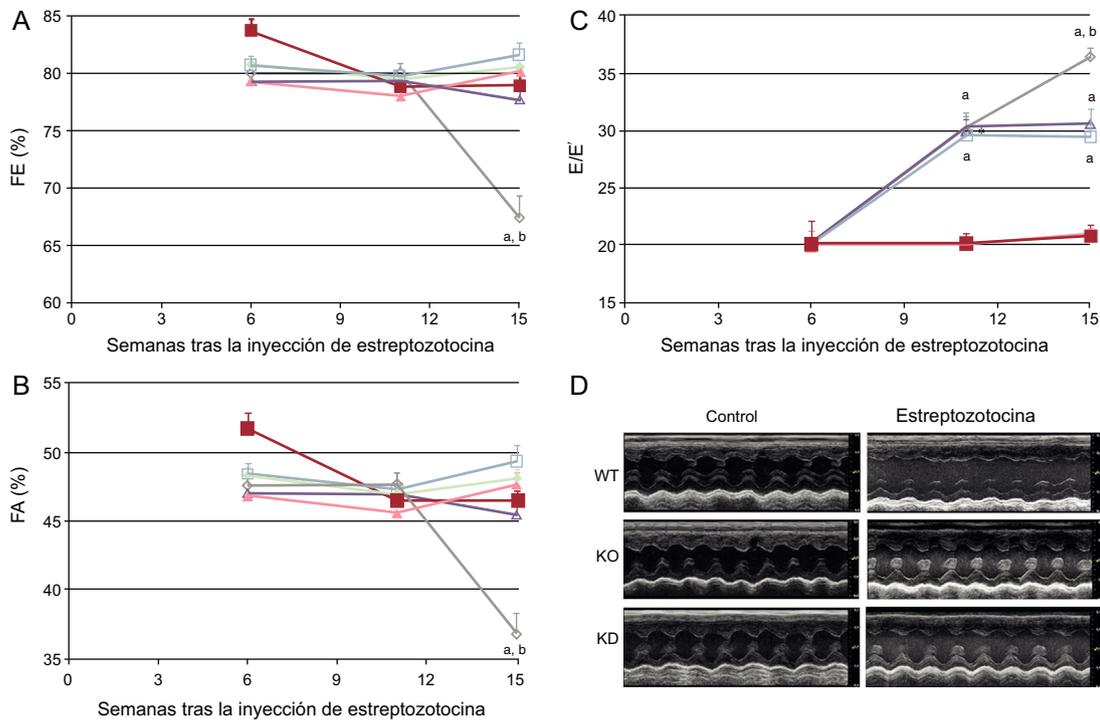


Figura 1. La manipulación genética de la PI3K γ afecta a la disfunción sistólica y diastólica en los ratones diabéticos, según lo indicado por la ecocardiografía convencional. A: fracción de eyección. B: fracción de acortamiento. C: cociente E/E' en los ratones WT, KD y KO en condiciones de control y de diabetes. D: imágenes ecocardiográficas representativas. FA: fracción de acortamiento; FE: fracción de eyección; KD: sin actividad cinasa (*kinase-dead*); KO: *knock-out*; PI3K γ : fosfoinosítido 3-cinasa gamma; WT: *wild-type*. Ratones WT, n = 11 por grupo; ratones KD, n = 7 por grupo; ratones KO, n = 4 por grupo. Símbolos negros: ratones de control; símbolos claros: ratones diabéticos; \diamond : ratones WT; \square : ratones KD, Δ : ratones KD.

^ap < 0,01 frente a las condiciones de control.

^bp < 0,01 frente a KD y frente a KO.

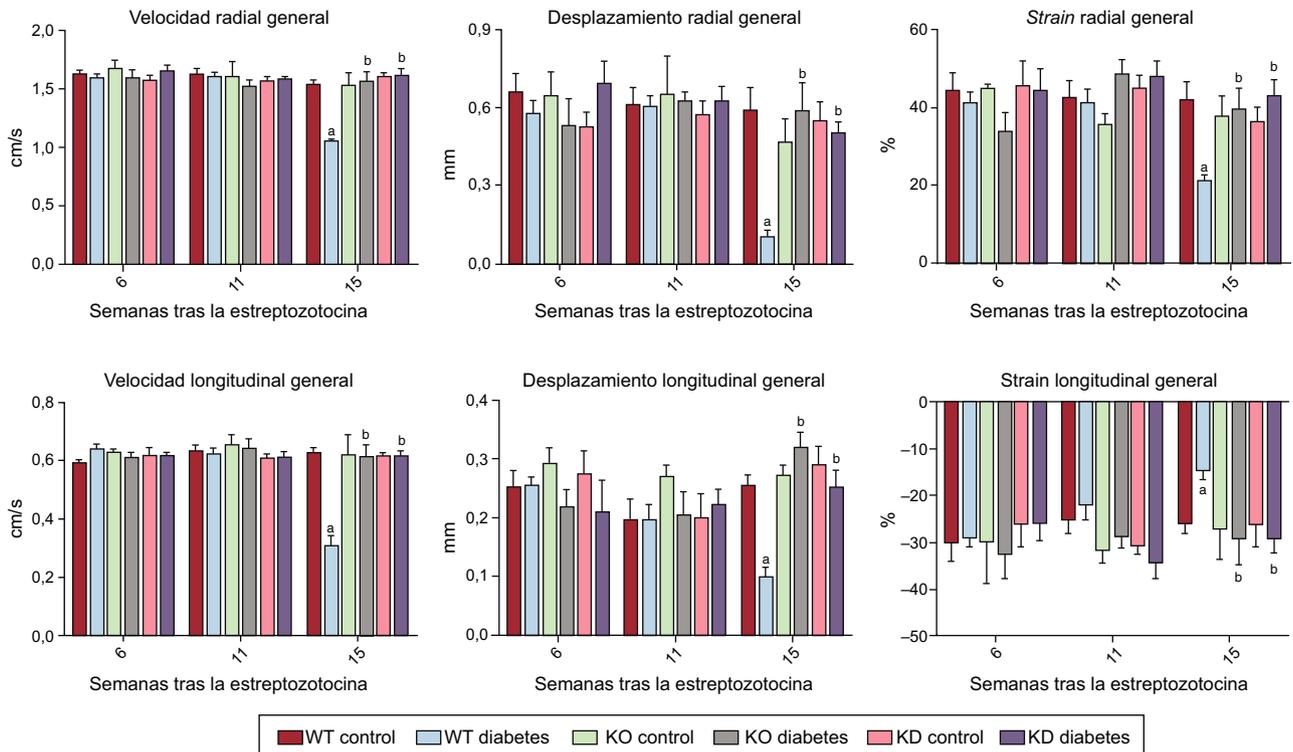


Figura 2. La manipulación genética de la PI3K γ afecta a la disfunción cardíaca de los ratones diabéticos, según lo indicado por el análisis de la *strain*. Velocidad radial y longitudinal, desplazamiento y *strain* en ratones WT, KD y KO en condiciones de control y de diabetes mellitus. KD: sin actividad cinasa; KO: *knock-out*; WT: *wild-type*; PI3K γ : fosfoinosítido 3-cinasa gamma. Ratones WT, n = 11 por grupo; ratones KD, n = 7 por grupo; ratones KO, n = 4 por grupo.

^ap < 0,01 frente a las condiciones de control.

^bp < 0,01 frente a KD y frente a KO.

de la enzima mediante el estudio de ratones que expresaban una forma KD de la enzima.

Ni la ablación genética ni la expresión de una forma KD de la PI3K γ afectaron a la glucemia en ayunas (KO, 288 ± 51 mg/dl; KD, 295 ± 46 mg/dl) o el peso corporal, lo cual permitió examinar el efecto en la MCD de manera independiente de la hiperglucemia. Además, según los datos obtenidos en ratones WT, la DM no afectó a los índices macroscópicos de la estructura cardíaca en ninguno de los genotipos (datos no presentados).

La función cardíaca basal fue similar en todos los genotipos. Como se ha indicado antes, la DM indujo disfunción sistólica en los animales WT. La disminución de la fracción de acortamiento y de la fracción de eyección, que son índices de la disfunción sistólica, no se observó en los ratones KO ni en los KD (figura 1). De igual modo, el análisis más detallado de la *strain* mostró que la disfunción cardíaca observada en los ratones WT 15 semanas después del tratamiento con estreptozotocina no se observaba en los ratones KO ni en los KD. De hecho, la velocidad longitudinal y radial, el desplazamiento y la *strain* no se vieron afectados por la DM cuando se causó una ablación o una mutación de la PI3K γ (figura 2).

El papel de la PI3K γ en la disfunción diastólica inducida por la DM tuvo un perfil temporal diferente. En las fases iniciales (hasta 11 semanas después de la inyección de estreptozotocina), tanto los ratones KO como los KD mostraron la misma disminución del cociente E/E' que los ratones WT. Sin embargo, mientras que la disfunción diastólica siguió empeorando en los ratones WT en las semanas posteriores, la función diastólica se mantuvo estable en los ratones mutantes (figura 1).

Así pues, tanto la presencia como la actividad cinasa de la PI3K γ son importantes para facilitar la instauración de una disfunción cardíaca en respuesta a la DM.

La inhibición farmacológica de la PI3K γ contrarresta la disfunción sistólica y diastólica observada en los ratones diabéticos

Estos resultados llevaron a explorar la posibilidad de que un inhibidor farmacológico de la actividad cinasa de la PI3K γ pudiera

revertir la MCD. Para ello, se trató a ratones con GE21 7 semanas después de la inyección de estreptozotocina, es decir, después de que la MCD fuera ya evidente. De hecho, la disfunción cardíaca apareció más precozmente en esta serie experimental, lo cual era de prever por la alta variabilidad que se asocia generalmente al tratamiento con estreptozotocina¹³.

Además, la inhibición de la PI3K γ no afectó a la glucemia en ayunas (337 ± 27 mg/dl a la dosis máxima) o el peso corporal (datos no presentados). De manera análoga, la administración de GE21 no afectó a los índices macroscópicos de la función cardíaca (tabla).

La administración de GE21 pudo contrarrestar la disminución de la fracción de acortamiento y la fracción de eyección solo 2 semanas después del inicio del tratamiento. La dosis superior de este inhibidor de la PI3K γ permitió restablecer incluso la función cardíaca por completo, hasta hacerla similar a la observada en los ratones de control. La administración de GE21 no tuvo efecto alguno en la función sistólica en los ratones de control (figura 4).

Al realizar el análisis de la *strain*, la administración de GE21 permitió contrarrestar la disfunción de la velocidad radial y longitudinal, el desplazamiento y la *strain*, con lo que los ratones diabéticos presentaron una recuperación completa de la función miocárdica (figura 5). El efecto producido por el GE21 en la velocidad radial y el desplazamiento mostró una acción temprana del fármaco que podía observarse ya tras la primera semana de tratamiento. Además, la dosis superior del fármaco mostró efecto en la velocidad longitudinal y el desplazamiento antes que la dosis inferior. La administración de GE21 no tuvo efecto alguno en los ratones de control (datos no presentados).

Según lo observado con la manipulación genética de la enzima, la acción del GE21 en la función diastólica mostró un perfil temporal de eficacia diferente del observado en la función sistólica (figura 4). De hecho, el GE21 mostró un efecto bifásico: en las primeras semanas de tratamiento, el GE21 causó mayor deterioro de la función diastólica en comparación con los ratones no tratados. Este efecto nocivo en la función diastólica fue breve, puesto que fue observable a partir de la segunda semana de tratamiento. En cambio, después de 4 semanas, el tratamiento con

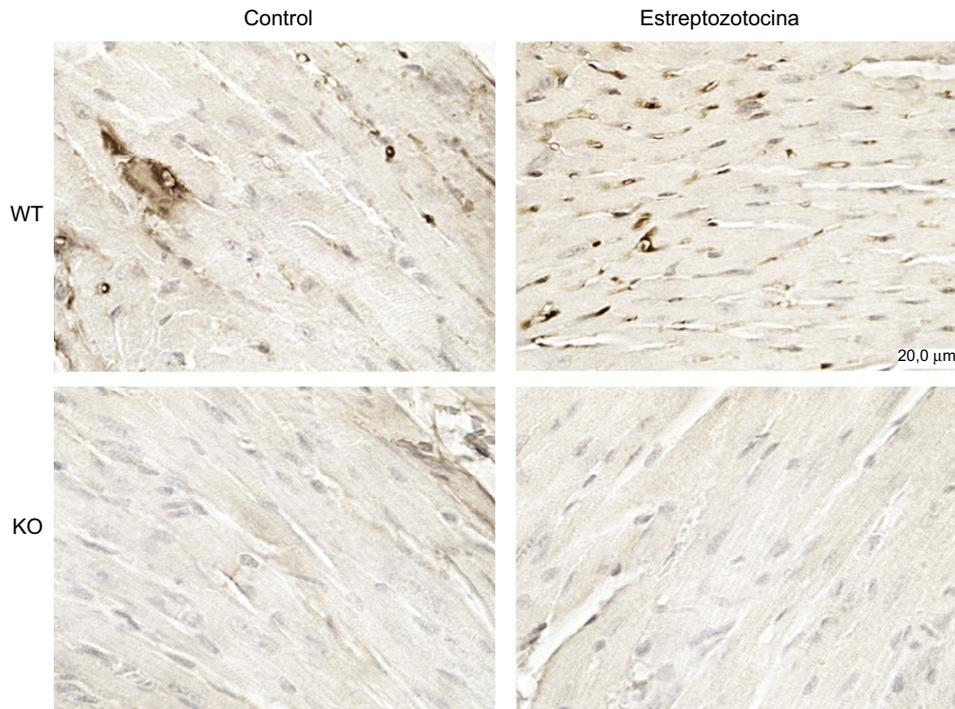


Figura 3. La expresión de PI3K γ aumenta en los ratones diabéticos. Imágenes microscópicas representativas de preparaciones histológicas de ventrículos izquierdos de ratones de control y ratones diabéticos. Se utilizaron ratones KO para la PI3K γ como controles negativos. Aumentos: $\times 200$; barra de la escala: 100 μ m; n = 4 por grupo. KO: *knock-out*; PI3K γ : fosfoinosítido 3-cinasa gamma; WT: *wild-type*.

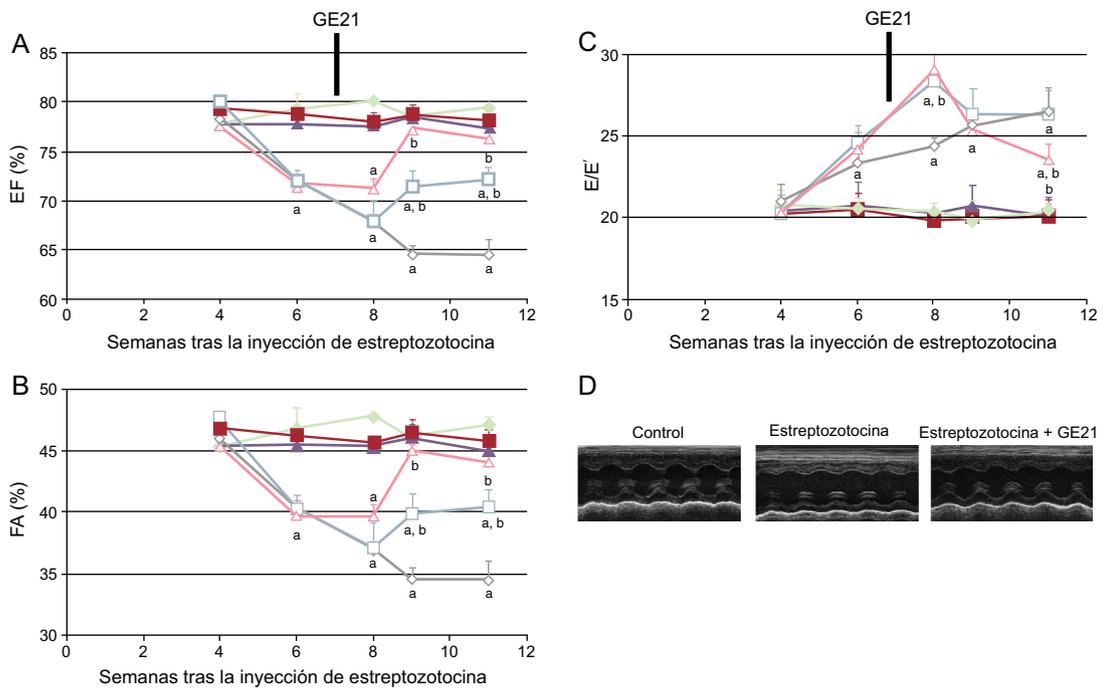


Figura 4. El GE21 revierte la disfunción sistólica y diastólica en los ratones diabéticos, según lo indicado por la ecocardiografía convencional. A: fracción de eyección. B: fracción de acortamiento. C: cociente E/E' de los ratones de control y los ratones diabéticos, tratados con diferentes concentraciones de GE21. D: imágenes ecocardiográficas representativas (n = 10 por grupo). FA: fracción de acortamiento; FE: fracción de eyección.

Símbolos negros: ratones de control; símbolos vacíos: ratones diabéticos; ◇: tratados con el vehículo; □: tratados con GE21 5 mg/kg/día, Δ: tratados con GE21 50 mg/kg/día.

^ap < 0,01 frente a los ratones de control.

^bp < 0,01 frente a los ratones tratados con el vehículo.

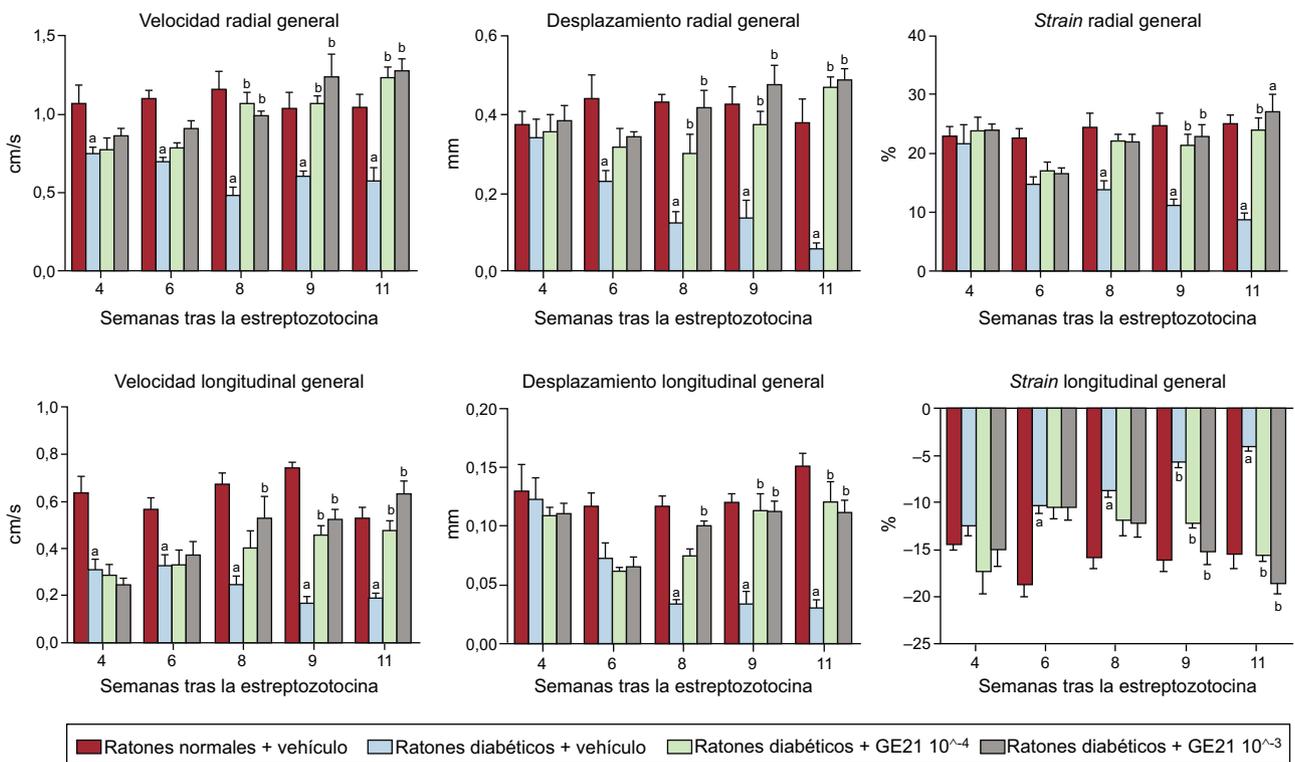


Figura 5. El GE21 revierte la disfunción sistólica de los ratones diabéticos, según lo indicado por el análisis de la *strain*. Velocidad radial y longitudinal, desplazamiento y *strain* en ratones de control y ratones diabéticos tratados con el vehículo o con GE21 (n = 5 por grupo).

^ap < 0,05 frente a los ratones de control.

^bp < 0,05 frente a los ratones tratados con el vehículo.

GE21 a la dosis superior de 50 mg/kg/día empezó a contrarrestar la disfunción diastólica inducida por la DM.

Tanto la acción nociva temprana como el efecto beneficioso tardío del GE21 en la función diastólica dependían de la interacción farmacológica con mecanismos que estaban alterados por la DM, puesto que el GE21 no tuvo efecto alguno en los ratones de control.

La PI3K γ modula la fibrosis y la inflamación cardíacas observadas en los ratones diabéticos

El análisis histológico realizado al final del periodo experimental mostró que el corazón de los ratones diabéticos presentaba un intenso depósito de material fibroso y de infiltración macrófaga (figura 6).

Tanto la inactivación genética de la actividad de PI3K γ como la inhibición farmacológica de la PI3K γ , que permitían contrarrestar la disfunción cardíaca inducida por la DM, se asociaron también a menos fibrosis e infiltración macrófaga.

DISCUSIÓN

La miocardiopatía diabética es una entidad clínicamente diferenciada en los pacientes diabéticos, que se caracteriza por disfunción cardíaca sin factores de riesgo concomitantes como obesidad, hipertensión o tabaquismo¹⁴. Se supone que un 40-75% de los pacientes diabéticos sufren MCD³, lo cual aumenta la incidencia de insuficiencia cardíaca¹⁵. A pesar de la elevada prevalencia de esta enfermedad, actualmente no hay ningún tratamiento específico para los pacientes con MCD. En este estudio, se observó que la PI3K γ desempeña un papel fundamental en la respuesta a la DM a través de la actividad cinasa, como se observa en los ratones tratados con una dosis baja de estreptozotocina, que constituyen un modelo bien caracterizado de DM de inicio temprano que conduce a una elevación gradual de la glucemia¹⁶. En consecuencia, la inhibición farmacológica de la PI3K γ puede revertir la disfunción cardíaca inducida por la DM. Por último, se observó que este efecto de la PI3K γ se asocia a 2 importantes determinantes anatomopatológicos de la MCD, la fibrosis y la inflamación.

Nuestros resultados indican que el principal efecto de la inhibición de la PI3K γ en los diabéticos es una mejoría de la función cardíaca. De hecho, la DM causó anomalías cardíacas evidentes tanto en la función sistólica como en la diastólica. En cambio, no se observó alteración alguna de la estructura macroscópica del corazón durante todo el periodo de observación. Estos datos concuerdan con los de estudios previos¹⁷, en los que se ha observado que la DM inducida por estreptozotocina causa un deterioro de la función cardíaca sin modificar la estructura del corazón. La ausencia de PI3K γ previno por completo la función sistólica incluso en presencia de DM. Se observó el mismo efecto con la inhibición genética de la actividad catalítica de la PI3K γ . Por lo que respecta a estas acciones, la PI3K γ tiene efectos en el corazón dependientes e independientes de cinasa⁵. El hecho de que la simple inhibición genética de la actividad catalítica sea suficiente para obtener los mismos efectos que produce la ausencia total de PI3K γ indica que esta causa sus efectos cardíacos nocivos en la DM solo a través de su acción dependiente de cinasa. La mejoría de la disfunción sistólica se demostró con mayor sensibilidad en el análisis de la *strain*, que es un examen más detallado de la función cardíaca.

Hay varios mecanismos que pueden explicar los efectos cardíacos de la PI3K γ en nuestro estudio. La PI3K γ desempeña funciones fundamentales en los leucocitos, los miocitos y las células vasculares¹⁸, y todas estas células intervienen en la respuesta cardíaca a la DM⁴. En concreto, se ha demostrado que la PI3K γ controla directamente la contractilidad de los miocitos a través de una regulación de la producción de cAMP que es

independiente de cinasa⁵. El hecho de que los animales KD, que tienen concentraciones de cAMP comparables a las de los WT⁵, no sufrieran disfunción contráctil en respuesta a la DM descarta esta posible explicación, si bien no se puede descartar otros posibles efectos directos en los miocitos. Por otra parte, nuestro estudio puso de manifiesto que la inhibición genética o farmacológica de la PI3K γ tuvo un efecto beneficioso en 2 parámetros que afectan a la función cardíaca en la respuesta a la DM: la inflamación y la fibrosis. El sistema inmunitario participa en el desarrollo de la MCD. De hecho, los modelos murinos de DM muestran sobreexpresión cardíaca de citocinas como la interleucina 1 β y el factor de crecimiento transformador beta¹⁹ y activación de los macrófagos²⁰. La PI3K γ es un mediador fundamental de la activación del sistema inmunitario y la ausencia de su actividad cinasa inhibe la acumulación de leucocitos en el corazón⁸. Otra característica anatomopatológica de la MCD es la inducción de fibrosis. El aumento de la fibrosis perivascular e intermiofibrilar se ha observado tanto en pacientes humanos²¹ como en ratones con DM inducida por estreptozotocina¹⁹. Además, estas 2 acciones probablemente estén relacionadas, puesto que la activación de las vías de la inflamación conduce a un aumento de la fibrosis en los ratones con MCD¹⁹. En consecuencia, se ha demostrado también que la PI3K γ induce fibrosis cardíaca⁵ y se ha puesto de relieve que esta característica depende de la PI3K γ en los leucocitos⁸, lo cual confirma la importancia de la relación entre la inflamación cardíaca y la fibrosis en la acción cardíaca de la PI3K γ .

Este estudio tuvo también un objetivo traslacional al estudiar el tratamiento con un inhibidor farmacológico como estrategia novedosa contra la MCD. Un inhibidor farmacológico diferente de la PI3K γ previno la aparición de DM autoinmunitaria y revirtió la hiperglucemia en ratones no obesos diabéticos²². Esto ha elevado las expectativas respecto a un tratamiento anti-PI3K γ para abordar las alteraciones metabólicas observadas en la DM. Sin embargo, debe señalarse que la aparición de DM en los ratones no obesos diabéticos se ha atribuido a un trastorno autoinmunitario²³. En la DM autoinmunitaria, cabe esperar que los tratamientos farmacológicos que actúan sobre la vía inmunitaria de la PI3K γ contrarresten de manera efectiva la etiología de la DM, más que sus consecuencias. Por otra parte, no se observó reversión de la hiperglucemia en nuestro estudio, en el que la DM se produjo a través de un efecto tóxico directo en las células de los islotes del páncreas. Nuestro estudio amplía estas observaciones previas respecto al efecto de los inhibidores farmacológicos de la PI3K γ en la DM, al mostrar que, incluso en ausencia de los efectos metabólicos que se podrá obtener en la DM autoinmunitaria — que es bastante infrecuente—, la inhibición de la PI3K γ continúa teniendo una acción potente contra la MCD.

En nuestro estudio, la inhibición genética o farmacológica de la PI3K γ contrarrestó la disfunción cardíaca inducida por la DM. Tal como se ha observado en los modelos genéticos, el efecto principal que se produjo después del tratamiento con GE21 fue una notable mejoría de la función sistólica, que se restableció por completo. El análisis más detallado de la *strain* mostró un efecto más temprano del GE21 y permitió también una definición más exacta de la acción regional del fármaco. De hecho, la mejoría en la velocidad y en el desplazamiento del eje radial del ventrículo izquierdo, que refleja predominantemente la actividad del mesocardio (parte media del miocardio)²⁴, se observó también con una dosis inferior del fármaco de manera más temprana que las correcciones del eje longitudinal, que en cambio reflejan principalmente la actividad del endocardio. Sin embargo, la acción sobre la función diastólica fue menos clara. De hecho, el desarrollo inicial de la disfunción diastólica no se corrigió con la ablación de la PI3K γ ni con la inhibición de la actividad cinasa, y solo se bloqueó la progresión posterior de la disfunción diastólica. De igual modo, con la inhibición farmacológica, la función diastólica se mantuvo incluso

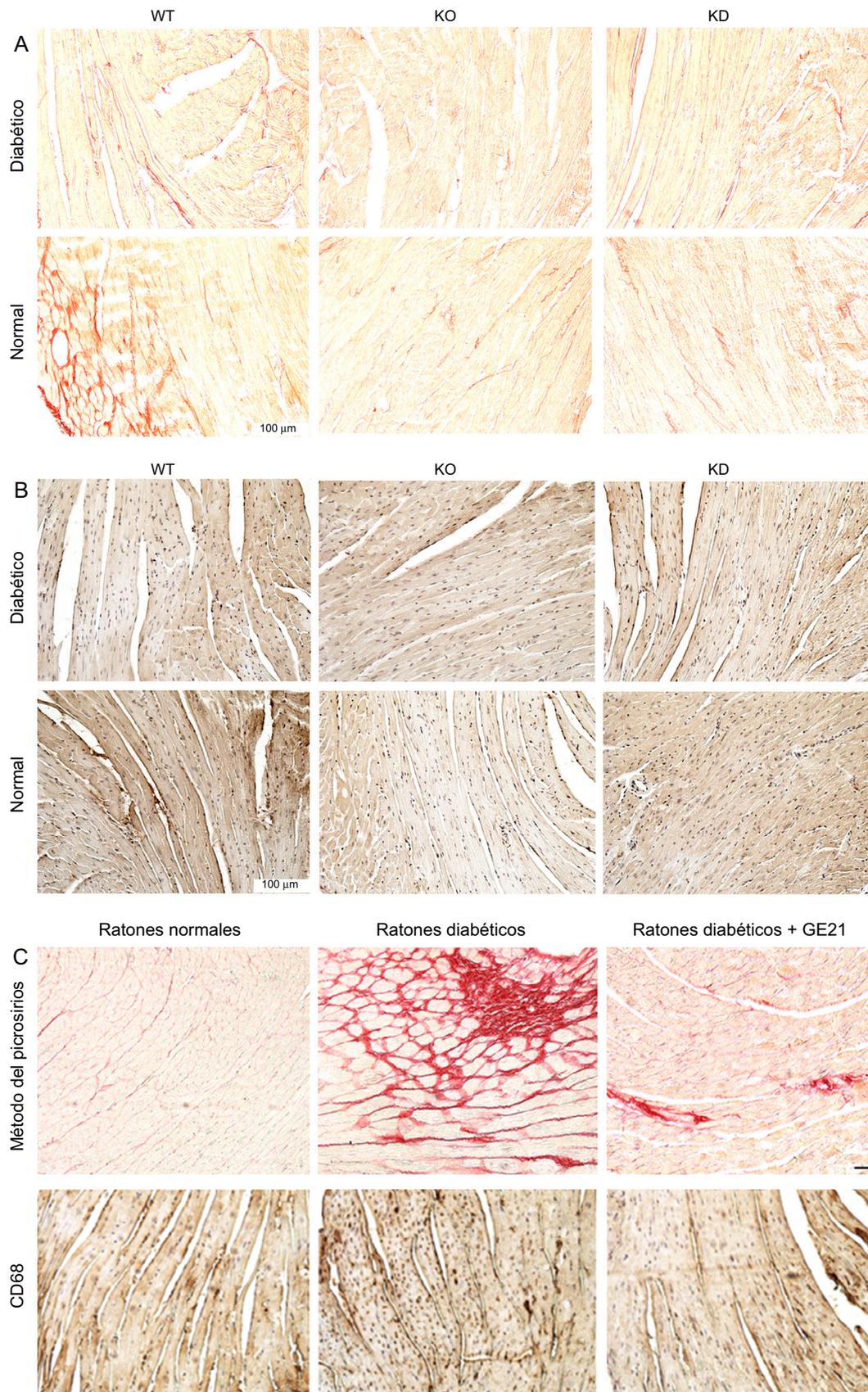


Figura 6. La inhibición genética o farmacológica de la PI3K γ reduce la fibrosis y la inflamación cardíacas de los ratones diabéticos, sin afectar a los miocardiocitos o los vasos sanguíneos. A y B: imágenes microscópicas representativas de preparaciones histológicas de ventrículos izquierdos de ratones WT, KD y KO en condiciones de control y de diabetes mellitus (tinción utilizada en A, método del picosirio; en B, anti-CD68; n = 4 por grupo). C: imágenes microscópicas representativas de preparaciones histológicas de ventrículos izquierdos de ratones control y diabéticos tratados con el vehículo o con GE21 50 mg/kg/día (n = 10 por grupo; aumentos, $\times 200$; barra de la escala, 100 μm). KD: sin actividad cinasa; KO: *knock-out*; WT: *wild-type*.

sin deterioro alguno en los ratones diabéticos, y solo un tratamiento prolongado con GE21 llevó a una recuperación de la disfunción diastólica inducida por la DM. Nuestros datos indican que hay 2 mecanismos diferentes para el desarrollo inicial de la disfunción diastólica y su progresión final en respuesta a la DM, y que la PI3K γ interviene solo en el estadio final. En consecuencia, parece que la inhibición crónica de la PI3K γ requeriría un inicio más prolongado para alcanzar una mejora de las características diastólicas del ventrículo izquierdo. Dado que la mayoría de los pacientes con MCD se caracterizan por una disfunción diastólica prominente^{3,14}, esto podría limitar el beneficio aportado por la inhibición de la PI3K γ en la práctica clínica. Sin embargo, la importancia general de nuestros resultados, que muestran mejoras a largo plazo tanto de la función sistólica como de la diastólica, indica que los inhibidores de la PI3K γ podrían considerarse posibles tratamientos de interés para las complicaciones cardíacas de los pacientes diabéticos. Es posible que futuros estudios permitan establecer si esta línea de investigación puede conducir a mejoras en el tratamiento clínico de estos pacientes.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra un efecto beneficioso de la inhibición genética o farmacológica de la PI3K γ en los ratones con MCD. El estudio confirma la acción de la inhibición de la PI3K γ sobre la función cardíaca, y amplía por primera vez la validez de este abordaje de la DM. Los resultados de este estudio constituyen una prueba de concepto que resalta el potencial de una aproximación farmacológica basada en la inhibición de la PI3K γ como estrategia prometedora para el tratamiento clínico de los pacientes que sufren MCD.

AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a V. Berardi (IRCCS Neuromed) por su ayuda en la preparación y corrección del manuscrito.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por Regione Campania (PON *Distretto Campania Bioscience* y POR-HOCKEY) y por el Ministerio de Salud de Italia (*Ricerca Corrente*) en ayudas a G. Lembo.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- La MCD es un problema médico frecuente. El conocimiento de los mecanismos moleculares que conducen a la MCD es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos para esta enfermedad.

¿QUÉ APORTA ESTE ESTUDIO?

- Se demuestra el papel esencial de la PI3K γ en el desarrollo de la MCD empleando modelos genéticos. Se demuestra que el tratamiento farmacológico basado en la inhibición de la PI3K γ es eficaz en un modelo murino de MCD. Tanto la inhibición genética como la inhibición farmacológica de la PI3K γ mostraron una actividad contra la reducción inducida por la DM en la función sistólica más potente que en la función diastólica.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre FB, Alex C, Nam H, et al. *IDF Diabetes Atlas*. 6.ª ed. Basilea: International Diabetes Federation; 2012:50.
2. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham Study. *Am J Cardiol*. 1974;34:29–34.
3. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014;57:660–671.
4. Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*. 2002;110:737–749.
5. Patrucco E, Notte A, Barberis L, et al. PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004;118:375–387.
6. Perino A, Ghigo A, Ferrero E, et al. Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110 γ . *Mol Cell*. 2011;42:84–95.
7. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation. *Science*. 2000;287:1049–1053.
8. Damilano F, Franco I, Perrino C, et al. Distinct effects of leukocyte and cardiac phosphoinositide 3-kinase γ activity in pressure overload-induced cardiac failure. *Circulation*. 2011;123:391–399.
9. Vecchione C, Patrucco E, Marino G, et al. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K γ . *J Exp Med*. 2005;201:1217–1228.
10. Carnevale D, Vecchione C, Mascio G, et al. PI3K γ inhibition reduces blood pressure by a vasorelaxant Akt/L-type calcium channel mechanism. *Cardiovasc Res*. 2012;93:200–209.
11. Matsushita K, Minamishima T, Goda A, et al. Comparison of the reliability of E/E' to estimate pulmonary capillary wedge pressure in heart failure patients with preserved ejection fraction versus those with reduced ejection fraction. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2015;31:1497–1502.
12. Carnevale D, Cifelli G, Mascio G, et al. Placental growth factor regulates cardiac inflammation through the tissue inhibitor of metalloproteinases-3/tumor necrosis factor- α -converting enzyme axis: crucial role for adaptive cardiac remodeling during cardiac pressure overload. *Circulation*. 2011;124:1337–1350.
13. Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med*. 2011;61:356–60.
14. Galderisi M. Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy: evaluation by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1548–1551.
15. Dandamudi S, Slusser J, Mahoney DW, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Chen HH. The prevalence of diabetic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *J Card Fail*. 2014;20:304–309.
16. McEvoy RC, Andersson J, Sandler S, Hellerstrom C. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest*. 1984;74:715–722.
17. Yong QC, Thomas CM, Seqqat R, Chandel N, Baker KM, Kumar R. Angiotensin type 1 receptor-deficient mice develop diabetes-induced cardiac dysfunction, which is prevented by renin-angiotensin system inhibitors. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:169.
18. Carnevale D, Lembo G. PI3K γ in hypertension: a novel therapeutic target controlling vascular myogenic tone and target organ damage. *Cardiovasc Res*. 2012;95:403–408.
19. Westermann D, Rutschow S, Jäger S, et al. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*. 2007;56:641–646.
20. Monji A, Mitsui T, Bando YK, Aoyama M, Shigeta T, Murohara T. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305:H295–H304.
21. Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1977;60:884–899.
22. Azzi J, Moore RF, Elyaman W, et al. The novel therapeutic effect of phosphoinositide 3-kinase- γ inhibitor AS605240 in autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2012;61:1509–1518.
23. Camps M, Rückle T, Ji H, et al. Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med*. 2005;11:936–943.
24. Bauer M, Cheng S, Jain M, et al. Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res*. 2011;108:908–916.