



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de la proteína Gas6 y los receptores TAM como marcadores diagnósticos en patologías humanas

Pedro Recarte Pelz

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Estudio de la proteína Gas6 y los receptores TAM  
como marcadores diagnósticos en patologías humanas.**

**M.Sc. Pedro Recarte Pelz, 2014**



**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA**

**Estudio de la proteína Gas6 y los receptores TAM  
como marcadores diagnósticos en patologías humanas.**

Memoria presentada por **Pedro Recarte Pelz** para optar al título  
de **Doctor en la Universidad de Barcelona**

El presente trabajo se ha realizado bajo la dirección del Dr. Pablo García de Frutos del  
Departamento de Muerte y Proliferación Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de  
Barcelona, y bajo la tutoría de **la Dra. Ma. Isabel Vazquez Baanante**

**Dr. Pablo García de Frutos**

**Dra. Ma. Isabel Vazquez Baante**

**Ms.Sc. Pedro Recarte Pelz**



## **Agradecimientos**

Primero que nada quiero agradecer a mi familia: a mis padres Catherine y Ricardo, por su apoyo incondicional a mis planes y metas cumplidas, y también a las que vendrán; a mi hermana Johanna, por apoyarme y preocuparse siempre por mí; al tío Mancho y a mi primo Román, por haberme ayudado exitosamente con los trámites burocráticos venezolanos, necesarios para mantenerme en Europa y estudiar lo que me apasiona. A mi amigo y colega Alejandro, a Edoardo y Francisco, por haber colaborado también en la superación de dichos trámites.

A Pablo, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y tomarme en cuenta para sus proyectos. No sólo aprendí sobre cáncer, lupus, el sistema TAM, entre otros, sino también a trabajar bajo dificultades y a como seguir adelante. En su laboratorio incluyo a Begoña, Jari y Cristina, quiénes entre conversaciones profundas sobre distintos temas, discusiones sobre cómo se hace un Westernblot correctamente y risas sobre la pura vida, me ayudaron a disfrutar de mi trabajo en el laboratorio.

También quiero agradecer a muchos compañeros y amigos del trabajo, amigos en Barcelona, Europa e incluso en el mundo. Todos aportaron su granito de arena, ya sea invitándome a tomar una cerveza para olvidar las dificultades o a jugar fútbol para respirar otro ambiente; otros donando su preciada sangre para tener mis valiosos controles sanos; otros ofreciéndome un sitio donde acampar y otros simplemente preguntando sobre mi trabajo, dándome ánimos para seguir adelante.

El doctorado más que un título, más que un trabajo e incluso más que una hipótesis a investigar, es una prueba de resistencia, perseverancia e improvisación para solucionar problemas; pero también es la más importante de todas: una prueba que demuestra cuánto te gusta algo y cuánto estás dispuesto a hacer para lograrlo.

Finalmente quiero agradecer a aquellas personas cercanas que me han inspirado a tratar de entender las enfermedades que las afectan y también a intentar mejorar sus vidas. Seguiré adelante en mi plan de intentar mejorar la calidad de vida de las personas, y también de entender la naturaleza de las cosas que nos rodean.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	11
El sistema Gas6 / ProtS - TAM.....	11
Los receptores proteína tirosina quinasa .....	11
Los ligandos de TAM y las proteínas dependientes de vitamina K.....	14
Información general de los componentes del sistema TAM .....	17
Proteína S.....	17
La proteína Gas6 .....	21
Los receptores TAM .....	22
Afinidad entre Gas6 y proteína S, y los receptores TAM .....	26
Activación de los receptores.....	29
Formas solubles de los receptores TAM .....	32
Vías de señalización del sistema TAM .....	34
Vías de señalización de MerTk.....	35
Vías de señalización de Axl .....	40
Vía de señalización de Tyro3.....	43
El Cáncer .....	46
Procesos claves para el desarrollo del cáncer .....	48
Efecto de Gas6 en cáncer.....	51
Efecto de los receptores TAM en cáncer .....	52
Estudios experimentales del sistema TAM en cáncer .....	54
El proceso de metástasis.....	58
El cáncer de Colon.....	62

Lupus .....	66
Tipos de Lupus .....	66
Diagnóstico del lupus .....	67
Tratamientos actuales.....	70
Posibles causas de la enfermedad .....	71
Receptores TAM en el lupus .....	76
Insuficiencia cardiaca .....	82
Diagnóstico.....	82
Gas6 y el sistema TAM en la insuficiencia cardiaca .....	90
Posibilidades diagnósticas y terapéuticas de la regulación del sistema TAM .....	91
II. HIPÓTESIS.....	92
III. OBJETIVOS .....	92
IV. RESULTADOS.....	94
Resumen del artículo sobre el sistema TAM en Lupus. ....	94
Artículo I. 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. ....	95
Resumen del artículo sobre la situación de Axl en insuficiencia cardiaca.....	105
Artículo II. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure.....	106
Resumen sobre el estudio del sistema TAM en cáncer de colon .....	114
Artículo III. Situation of the TAM tyrosine protein kinase receptors and their ligands Gas6 and Protein S in colon cancer.....	116
V. RESUMEN GENERAL.....	131
Lupus .....	131
Insuficiencia cardiaca .....	133
Cáncer de Colon .....	135
VI. CONCLUSIONES .....	137

VII. BIBLIOGRAFÍA .....	138
VIII. ANEXOS .....	150
Otras publicaciones del doctorando .....	150

## ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos.
ADAM	( <i>A disintegrin and metallopeptidase family</i> ), familia de metaloproteasas y desintegrinas.
ANA	( <i>Anti-nuclear antibodies</i> ), anticuerpos antinucleares.
Axl, sAxl	Receptor tirosina quinasa Axl (del griego <i>anexelecto</i> , descontrolado) y su forma soluble.
BBB	( <i>Blood-brain barrier</i> ), barrera cerebro-vascular.
BNP	( <i>Brain natriuretic-peptide</i> ), Péptido natriurético cerebral o péptido natriurético tipo B.
CRP	( <i>C-reactive protein C</i> ), proteína C reactiva.
cDNA	( <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> ), ácido desoxiribonucleico complementario.
DNA	( <i>Deoxyribonucleic acid</i> ), ácido desoxiribonucleico.
EGF	( <i>Epidermal growth factor</i> ), factor de crecimiento epidérmico.
ERK	( <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> ), quinasa regulada por señal extracelular
Factor Xa	Factor X de la coagulación activado.
FNIII	Módulo proteico con un plegamiento similar a los dominios tipo III de la fibronectina.
Gas6	( <i>Growth arrest specific gene 6</i> ), producto del gen 6 específico de parada celular.
GLA	Dominio de carboxilación/gamma carboxiglutámico dependiente de vitamina K.
Gla	Ácido gamma carboxiglutámico
Glu	Ácido glutámico.
LES	Lupus eritematoso sistémico.
LPS	Lipopolisacárido bacteriano.
MAPK	( <i>mitogen-activated protein kinase</i> ), proteína quinasa activada por un mitógeno.

MerTk	Receptor tirosina quinasa MerTk, expresada en <i>monocitos</i> y tejidos <i>epiteliales</i> y reproductivos, y su forma soluble (sMerTk).
MITF	( <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i> ), factor de transcripción asociado a microftalmina.
PCD	( <i>Programed cell death</i> ), muerte celular programada.
PCR	( <i>Polymerase chain reaction</i> ), reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF	( <i>Platelet-derived growth factor</i> ), factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PS	Fosfatidilserina.
<i>PROSI</i>	Gen humano que codifica la proteína S vitamina K dependiente del plasma.
PTKs	( <i>Protein tyrosine kinases</i> ), proteínas tirosina quinasa.
RNA	( <i>Ribonucleic acid</i> ), ácido ribonucleico.
RTKs	( <i>Receptor tyrosine kinase</i> ), receptores tirosina quinasa.
SHBG	( <i>Sex hormone-binding protein</i> ), proteína de unión a hormonas sexuales.
siRNA	( <i>Small interfering RNA</i> ), fragmentos de RNA de interferencia.
SNP	( <i>single nucleotide polymorphism</i> ). Polimorfismo de nucleótido simple.
TAM	Subfamilia de proteínas tirosina quinasa compuesta por tres componentes: Tyro3, Axl y MerTk.
Tyro3, sTyro3	Gen de proteína tirosina quinasa 3 y su forma soluble.
VEGF	( <i>Vascular endothelial growth factor</i> ), factor de crecimiento del endotelio vascular.
VKDPs	( <i>Vitamin K-dependent proteins</i> ), proteínas dependientes de vitamina K.
VSMC	( <i>Vascular smooth muscle cells</i> ), células de la muscular lisa del sistema vascular.
Wwox	Dominio WW que contiene oxidoreductasa.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La presente tesis está dirigida a evaluar componentes del sistema Gas6-TAM como posibles marcadores de diagnóstico en tres patologías humanas: cáncer de colon, lupus eritematoso sistémico e insuficiencia cardíaca. Para ello se cuantificaron parámetros relacionados con componentes de este sistema en grupos de pacientes de estas enfermedades.

### **El sistema Gas6 / ProtS - TAM**

#### **Los receptores proteína tirosina quinasa**

Los receptores tirosina quinasa (RTKs) son un grupo de proteínas de membrana que ayudan a regular y coordinar complejos procesos celulares. Estas proteínas son capaces de desencadenar una cascada de señalización para regular procesos de crecimiento, diferenciación, migración, adhesión y muerte celular. Los avances de los últimos 20 años de investigación han revelado que estas proteínas no sólo regulan estos procesos con gran precisión, sino que además defectos en los mismos pueden participar en el desarrollo de enfermedades de tipo cardiovascular, inmunológico y en cáncer (Zwick, Bange et al. 2001). Por este motivo las rutas de señalización controladas por RTKs ofrecen posibles vías de intervención en estas enfermedades a nivel de diagnóstico y tratamiento.

En el genoma humano se han identificado 90 genes que codifican proteínas tirosina quinasa, de los cuales 58 codifican para receptores de membrana celular. Estos pueden ser agrupados en 20 subfamilias, basados en la secuencia de su dominio quinasa (Robinson, Wu et al. 2000). De estos, los receptores de la subfamilia TAM (el nombre deriva de las iniciales de cada receptor Tyro3-Axl-MerTk) junto al receptor de angiopoietina (TIE), están presentes únicamente en vertebrados (Manning, Whyte et al. 2002). Los receptores TAM se caracterizan por tener una secuencia aminoacídica conservada (KW (I/L)A(I/L)ES) entre el dominio quinasa

y el dominio de unión molecular, y en que su estructura extracelular es muy semejante entre si y diferente al resto de los receptores tirosina quinasa, consistiendo específicamente en dos dominios semejantes a la inmunoglobulina y dos dominios de fibronectina tipo III (Linger, Keating et al. 2008).

En la figura 1 se presenta un esquema de los 20 grupos de receptores tirosina quinasa, incluyendo la subfamilia TAM. Se trata de proteínas multimodulares que se clasifican en función de los módulos que componen su estructura extracelular y su número. En la figura se observa la diferencia en la arquitectura de la parte extracelular entre cada una de las subfamilias, a pesar de que muchos de los módulos que aparecen se encuentran en más de un grupo de genes. Los más comunes son los módulos con un plegamiento de tipo inmunoglobulina (Ig, 11 subfamilias), seguidos de los módulos fibronectina III (FNIII, 5 subfamilias), que en muchas ocasiones se encuentran organizados en tándems de dos a siete módulos.

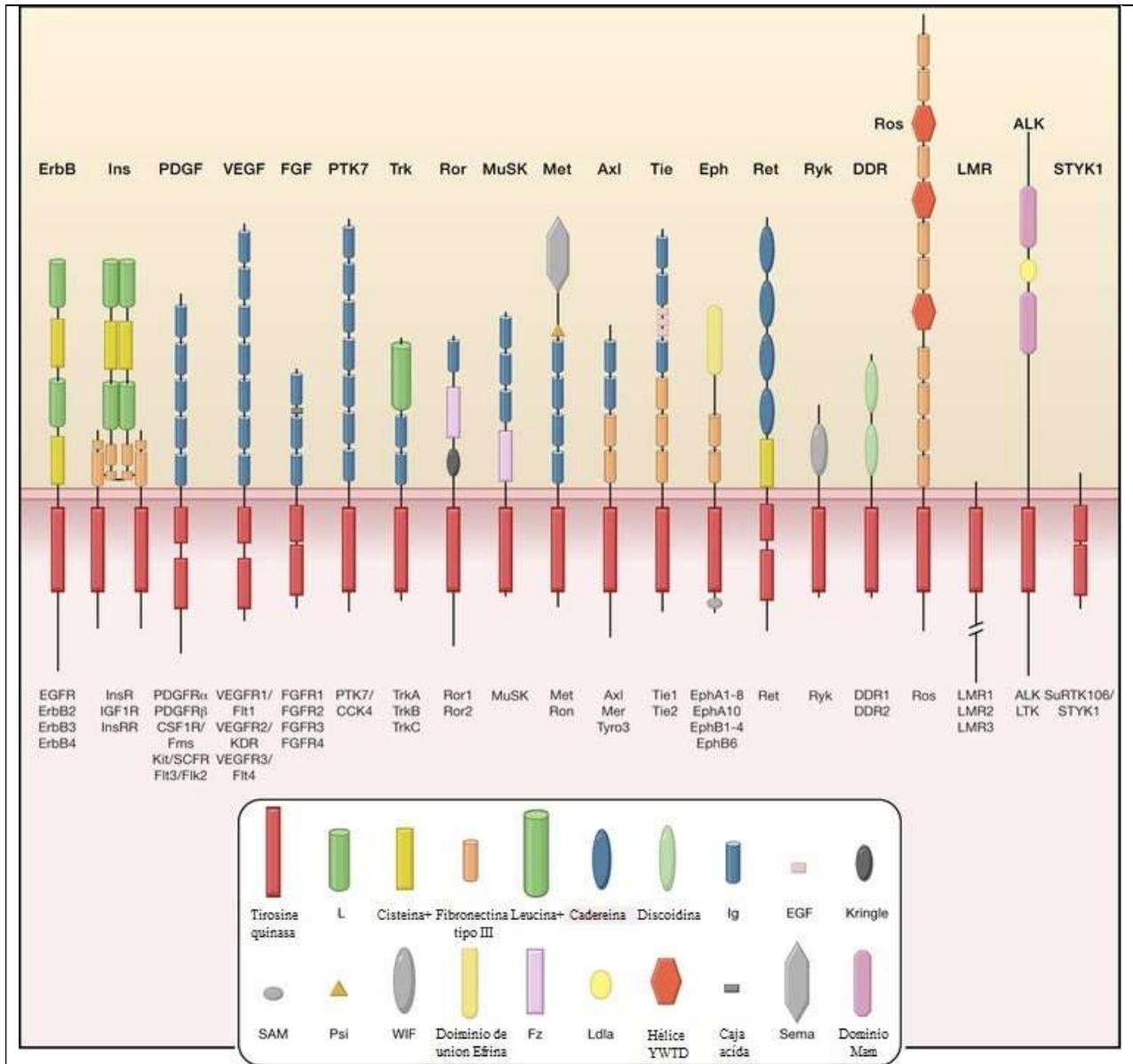


Figura 1. Las 20 subfamilias de receptores tirosina quinasa. En la figura se observa la variedad de dominios que componen estos receptores. Destaca la prevalencia del dominio de fibronectina III (FNIII, cilindro naranja), el dominio similar a inmunoglobulinas (Ig, cilindro azul), seguido de los dominios ricos en leucina (L, cilindro verde) (Lemmon and Schlessinger 2010).

El sistema TAM está formado por un grupo de tres receptores Tyro3, Axl y MerTk (TAM), siendo sus ligandos las proteínas secretadas solubles Gas6 y proteína S. Es un sistema que se identificó a mediados de los años noventa, por lo que en la actualidad hay numerosos

estudios que han trabajado sobre su biología. Una búsqueda en PubMed en Octubre de 2014 encuentra 428 artículos sobre Gas6, 701 sobre Axl, 243 sobre Tyro3/Tyro-3 y 322 sobre MerTk. Con los descubrimientos iniciales sobre su posible función, se empezó a estudiar su efecto en diferentes enfermedades, especialmente en patología cardiovascular y cáncer, además de enfermedades autoinmunes y problemas de la vista. A continuación describiré los aspectos bioquímicos de los factores más importantes de este sistema de ligandos-receptores.

## **Los ligandos de TAM y las proteínas dependientes de vitamina K**

Se conocen como ligandos aquellas sustancias que son capaces de unirse a una biomolécula, con algún fin biológico. Esta unión se da mediante interacciones moleculares como los enlaces iónicos, las fuerzas de van der Waals o los puentes de hidrógeno, y es de carácter reversible. La unión de un ligando a un receptor, como en el sistema TAM, deriva en un cambio de la conformación de este último, alterando su estado funcional. Entre los tipos de ligandos de receptores podemos encontrar enzimas y sustratos, ligandos activadores e inhibidores. En 1995 se identificó por primera vez a Gas6 y a su homólogo proteína S como ligandos de los receptores tirosina quinasa Axl y Tyro3, respectivamente (Stitt, Conn et al. 1995; Varnum, Young et al. 1995). En 1996 también se identificó al receptor MerTk como un receptor activado por Gas6 (Nagata, Ohashi et al. 1996), y muy posteriormente se demostró que proteína S podía también interactuar con el tercer componente de la familia (Prasad, Rothlin et al. 2006; Uehara and Shacter 2008).

En los receptores TAM, encontramos que sus ligandos son de tipo activador, y son proteínas dependientes de vitamina K (*vitamin K-dependent proteins*, VKDPs). Este tipo de proteínas contiene un dominio GLA (dominio que contiene ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico) en la región N-terminal. La vitamina K es necesaria para poder catalizar la transformación de residuos de ácido glutámico a residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla), en este dominio de la proteína. Estos residuos Gla tienen afinidad por iones de calcio (Stenflo and Suttie 1977; Hansson and Stenflo 2005). En vertebrados existen dos grupos de estas proteínas en función del número de residuos Gla que contengan (Figura 2). El primero se caracteriza por la presencia de 3 a 5 residuos de Gla. Este grupo incluye la osteocalcina, una proteína del tejido óseo, la proteína

asociada a la matriz de cartílago (*Upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein*, UCMA), también conocida como proteína rica en Gla (*Gla-rich protein*, GRP), y la proteína Gla de la matriz (*matrix Gla protein*, MGP). Estas proteínas son importantes para la homeostasis del calcio en el crecimiento óseo y los procesos de calcificación extraósea (Furie, Bouchard et al. 1999). Las proteínas de este grupo son de bajo peso molecular, conformadas por unos 100 aminoácidos en promedio, y tienen una estructura lejanamente relacionada entre sí.

El segundo grupo de VKDPs tienen entre 9 y 12 residuos Gla que se agrupan en el dominio GLA amino terminal. Estas proteínas participan en la coagulación y tienen en este caso un módulo proteico de 45 aminoácidos con gran similitud estructural (Bouchard, Furie et al. 1999). Un ejemplo de este grupo de proteínas es la protrombina o factor II de la cascada de coagulación. Esta es la proteína precursora de la trombina, a su vez la encargada de transformar fibrinógeno en fibrina. La fibrina es el componente esencial del coágulo sanguíneo y el principal componente del recubrimiento de las zonas vasculares dañadas para evitar la hemorragia y reparar el daño. En este último grupo también encontramos factores de crecimiento como lo son Gas6 y proteína S, ligandos del sistema TAM.

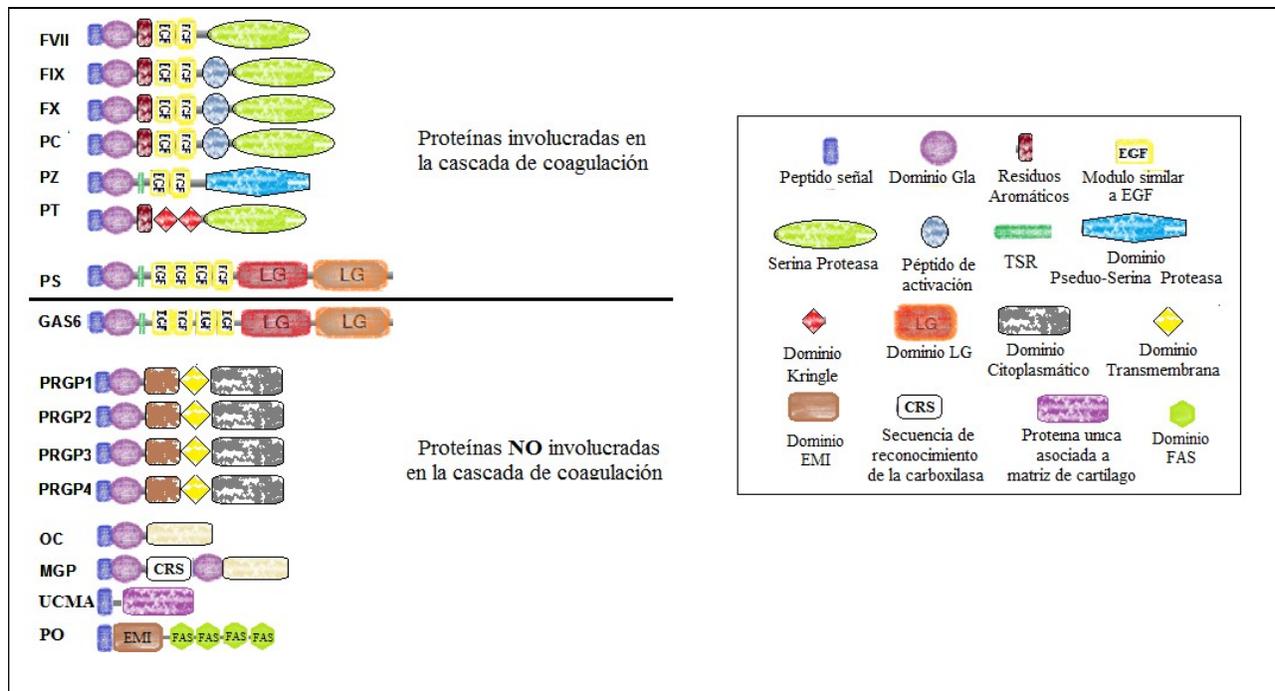


Figura 2. Estructura modular de las proteínas dependientes de vitamina K (VKDP). Estas proteínas son multimodulares, con una composición de módulos en las que destacan los dominios similares a EGF, que se repiten en siete proteínas. Las proteínas se dividen en dos grupos: aquellas que funcionan en la cascada de coagulación, como el factor VII (FVII), el factor IX (FIX), el factor X (FX) y el factor II de la coagulación o protrombina (PT); anticoagulantes naturales del plasma como la proteína Z (PZ), la proteína C (PC) y la proteína S (PS). Un segundo grupo no participa directamente en la cascada de la coagulación, como es el caso de Gas6, los genes que codifican las proteínas transmembrana con módulo Gla (PRGP1-4), y las proteínas reguladoras de la homeostasis del calcio osteoclastina (OC), proteína Gla de la matriz (MGP), periostina (PO) y la proteína asociada a la matriz de cartílago (UCMA).

En los años 1997 y 2001 se descubrió otro grupo de proteínas dependientes de vitamina K, la proteína ácida  $\gamma$ -carboxglutámica rica en prolina 1 y 2 (*proline rich Gla* 1 a 4; PRRG1-4). Mediante el uso de la base de datos dbEST, Kulman et al., identificaron 2 proteínas que contenían dominios Gla y dominios transmembrana. Se aislaron las secuencias de cDNA de PRRG1-2 (denominadas inicialmente PGRP1 y 2) en librerías de tumor colorectal, hígado y medula espinal humanos. Identificaron que ambas proteínas se expresan en una gran variedad tejidos, encontrándose con mayor abundancia en medula ósea en el caso de PRRG1, y en tiroides para PRRG2. Posteriormente, identificaron dos nuevos genes con una estructura similar, PRRG3 y PRRG4 (inicialmente TGM3 y TGM4). Su función en la fisiología humana aún no está clara,

pero su estructura modular, rica en residuos Gla, sugiere que las mismas pueden interactuar con superficies ricas en fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina (Kulman, Harris et al. 1997). Queda mucho por esclarecer sobre el papel que juegan estas proteínas a nivel celular.

Finalmente, en 1999 se identificó la periostina, una proteína que por sus características pudiera relacionarse con el grupo de proteínas dependientes de vitamina K (Figura 2). Fue descubierta en osteoblastos, y se le atribuyó la capacidad de regular la adhesión y diferenciación de este tipo de células en hueso, al que se denominó factor específico de osteoblastos. Se expresa en diferentes tipos de tejido, en las válvulas de corazón tanto durante el desarrollo como en adultos, en dientes en desarrollo, y también regula la adhesión y migración de células epiteliales de los ovarios. Se ha visto que se incrementa la expresión de periostina en diferentes tejidos en adultos, bajo condiciones adversas como estrés, lesiones o sobrecargas metabólicas (Horiuchi, Amizuka et al. 1999). En el año 2002, Yoshioka et al. observaron que los niveles de mRNA de la periostina (gen *POSTN*) estaban significativamente reducidos en numerosas líneas celulares y tejidos de cáncer. Observaron que las tasas de crecimiento de las células de cáncer se veían reducidas cuando se añadía periostina de manera exógena (Yoshioka, Fuji et al. 2002).

## **Información general de los componentes del sistema TAM**

### **Proteína S**

La proteína S fue descubierta e identificada a final de los años 70 como una glicoproteína plasmática dependiente de vitamina K (VKDP), que contenía residuos  $\gamma$ -carboxiglutámico. Fue aislada a partir de plasma bovino (DiScipio and Davie 1979). El patrón de expresión tisular del gen que codifica a la proteína S, *PROS1*, es amplio, sintetizándose en el hígado, en los hepatocitos, pero también se ha observado su expresión en células endoteliales, megacariocitos, osteoblastos, retina de rata, o en la musculatura lisa del sistema vascular, entre otros lugares (Fair and Marlar 1986; Fair, Marlar et al. 1986; Stern, Brett et al. 1986; Malm, He et al. 1994; Hall, Obin et al. 2005). La proteína, además de estar en el plasma, también se acumula

abundantemente dentro de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, desde donde puede ser liberada por la estimulación de la trombina (Stern, Brett et al. 1986).

Como el resto de VKDPs de este grupo, posee una estructura multi modular, que en su extremo amino terminal incluye un péptido señal de 24 amino ácidos seguido de un propéptido de 16 amino ácidos en la proteína humana. Ambos polipéptidos son eliminados por proteólisis antes de la secreción al medio extracelular. En humanos, la proteína S madura es una glicoproteína plasmática de cadena sencilla, de 635 amino ácidos y con tres residuos N-glicosilados (Uniprot P07225). Puede sufrir otras 2 modificaciones post-traduccionales, la gamma carboxilación del ácido glutámico y la hidroxilación de asparagina (Ploos van Amstel, van der Zanden et al. 1987). La proteína madura tiene una masa molecular de 65 kDa. El gen humano, *PROS1*, fue clonado a inicios de los años 90. El gen *PROS1* cuenta con 15 exones en su secuencia. En el genoma humano y en el de primates superiores se encontró un pseudo gen, *PROSP*, en la misma región de *PROS1* con un 97% de homología en la secuencia codificante (figura 3). Este pseudo gen carece del exón I además de poseer una mutación en una región de *splicing* y tres codones *stop* en el marco de lectura de la proteína codificada (Lundwall, Dackowski et al. 1986; Long, Marshall et al. 1988; Edenbrandt, Lundwall et al. 1990; Ploos van Amstel, Reitsma et al. 1990).

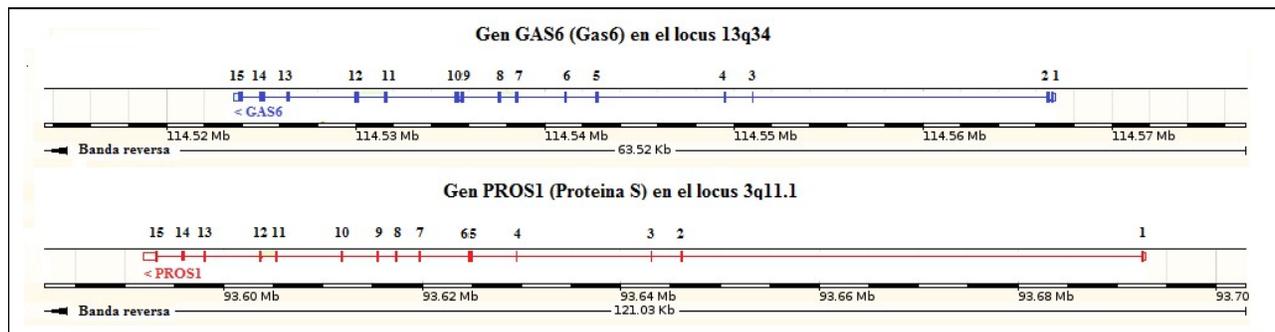


Figura 3. Estructura genómica de los genes que codifican Gas6 y Proteína S. En azul se destacan los 15 exones de *GAS6*, distribuidos a lo largo del gen, y en rojo los 15 exones de *PROS1*. Los ejes de ambas figuras indican la longitud en miles de pares de bases (Mb) del gen, en sus correspondientes cromosomas (Tomado de *the Ensembl Project*).

Los exones de *PROSI* que constituyen los diferentes módulos partiendo del extremo N-terminal son: el pre-propéptido, el dominio GLA, una pequeña región sensible a trombina (*thrombin-sensitive region*, TSR), cuatro dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor-like domain*, EGFs) y seis exones que codifican un dominio similar a la globulina de unión a hormonas sexuales (*sex hormone-binding globulin*, SHBG). Este último contiene dos módulos análogos a los dominios globulares de la lámina A (módulos LG) (Rezende, Simmonds et al. 2004; Hafizi and Dahlback 2006; Garcia de Frutos, Fuentes-Prior et al. 2007). Estos dominios también se encuentran en otras proteínas extracelulares como agrina, perlecan o neurexinas (Timpl, Tisi et al. 2000).

El dominio GLA característico de las VKDPs, está codificado por los exones 1 a 3, incluyendo el prepropeptido. El dominio TSR codificado por el exón 4 contiene los lugares de acción de la trombina y el factor Xa para inactivar la proteína S. Los dominios EGF son muy comunes en proteínas extracelulares y transmembrana, y se encuentran frecuentemente organizados en tándem (por ejemplo, en los receptores Notch, y Musk). El dominio SHBG es completamente diferente a la mayoría de las VKDPs de esta familia, porque no tiene actividad enzimática de tipo proteasa de serina. Este dominio presenta tres residuos de asparagina glicosilados (Garcia de Frutos, Fuentes-Prior et al. 2007).

### **Proteína S y su papel en la inflamación y la cascada de coagulación**

La proteína S circula en el plasma a una concentración aproximada de 25 µg/ml, el 40% circula de forma libre, y la restante en forma de complejo junto a C4BP (Dahlback 1991). Es un inhibidor de la cascada de coagulación junto a la proteína C activada, actuando como cofactor en la proteólisis de los factores Va y VIIIa de la coagulación (Walker 1981). Se ha identificado que la proteína S favorece un cambio conformacional en la proteína C que aumenta su eficiencia, para degradar ambos factores de la cascada de coagulación (Yegneswaran, Wood et al. 1997).

La función anticoagulante de proteína S se refleja en un aumento del riesgo de trombosis en pacientes que tienen concentraciones plasmáticas bajas de esta proteína. La trombosis es la formación de un trombo o coágulo en el interior de una vena, lo que resulta en la reducción u

obstrucción del flujo sanguíneo. Se han logrado identificar casi 200 mutaciones en el gen *PROS1*, asociadas con deficiencias de la proteína en el plasma (García de Frutos, Fuentes-Prior et al. 2007). Las mutaciones en heterocigosis en *PROS1*, incrementan el riesgo de trombosis venosa entre 5 y 10 veces (Zoller, García de Frutos et al. 1999). En humanos la deficiencia de proteína S se diagnostica en un 2 % a un 4% de los pacientes con trombosis, mientras que la prevalencia en la población general se encuentra entre el 0,03 y el 0,13% (Rezende, Simmonds et al. 2004; Dahlback 2005; Dahlback and Villoutreix 2005).

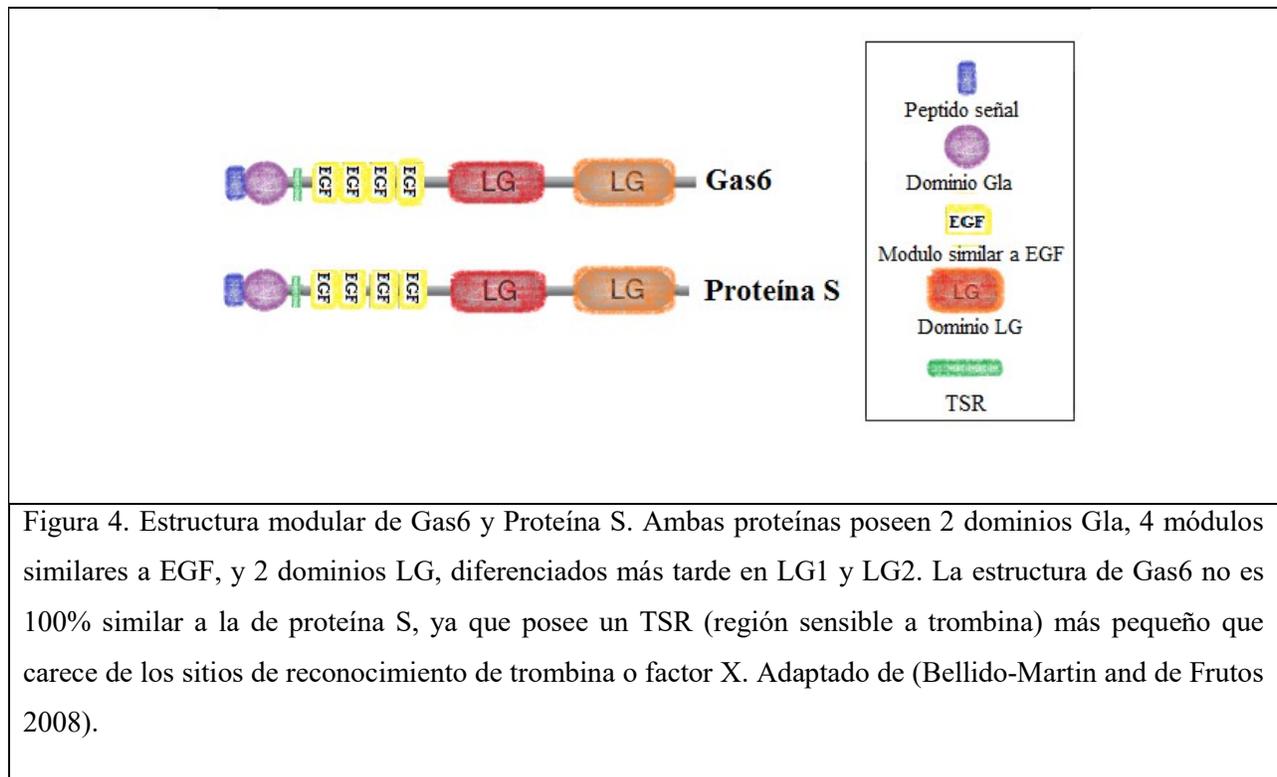
La trombosis y la inflamación son dos mecanismos de respuesta a daño que se encuentran estrechamente relacionados. La interacción de la proteína S con el regulador del complemento C4BP es un ejemplo de esta relación. Otro aspecto en el que proteína S está involucrada es la eliminación de células apoptóticas. Este debe ser un proceso eficiente y oportuno, de lo contrario la exposición del contenido de las células al medio iniciaría un proceso inflamatorio. Se ha evidenciado que la proteína S juega un papel fundamental como componente del plasma sanguíneo para una correcta fagocitosis de estas células moribundas, permitiendo el reconocimiento de las células apoptóticas por parte de los macrófagos mediante su unión a la fosfatidilserina (PS) expuesta en la membrana extracelular de las mismas (Anderson, Maylock et al. 2003). Para que este proceso ocurra, proteína S debe pasar por un proceso de activación oxidativa. Este proceso ocurre cuando se une la proteína a PS, lo que oxida sus residuos de cisteína (Cis), permitiendo su unión covalente mediante puentes disulfuro en dímeros y oligodímeros, los cuales se unen y activan al receptor MerTk en los macrófagos. De esta manera también se regula su actividad, evitando que la proteína S en estado libre sea capaz de activar constantemente monocitos y macrófagos, en circulación y en los tejidos (Uehara and Shacter 2008).

Incluso después de que haya sucedido un episodio inflamatorio, proteína S está involucrada en la fagocitosis de los neutrófilos, en la zona afectada. Esto ha convertido a esta proteína en un importante componente en las estrategias terapéuticas para aliviar enfermedades inflamatorias. De hecho los glucocorticoides, comúnmente usados en síndromes inflamatorios, aumentan la capacidad fagocítica de los macrófagos mediante una inducción de la expresión de proteína S y el receptor MerTk. Esta sobreexpresión estaría involucrada en la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias en estas células (McColl, Bournazos et al. 2009).

## La proteína Gas6

El gen *Gas6* fue identificado por primera vez en 1988 por Schneider y col., en fibroblastos de ratón, en los que se identificaron varios genes sobre expresados en la respuesta celular a la retirada del suero en el medio de cultivo (Schneider, King et al. 1988). Luego en 1993 fue publicada la secuencia parcial del cDNA de Gas6 humano a partir de la librería de cDNA de fibroblastos de pulmón empleando como sonda el cDNA de Gas6 murino. Este cDNA humano tiene 2461 nucleótidos y codifica para una proteína de 678 aminoácidos (Manfioletti, Brancolini et al. 1993). Uno de los aspectos sorprendentes que se descubrió al analizar esta proteína es su similitud con la proteína S, con una identidad del 44% en su secuencia aminoacídica. Por ello, se incluyó en la familia de las VKDPs del plasma. Posteriormente, por medio de hibridación fluorescente *in situ*, ubicaron al gen de Gas6 en el cromosoma 13q34 (Saccone, Marcandalli et al. 1995).

La proteína madura de 630 aminoácidos y 82 kDa tiene un dominio GLA que contiene ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) de 45 aminoácidos en el extremo N-terminal, que interactúa con las membranas plasmáticas.



A diferencia de varias proteínas dependientes de vitamina K que se expresan mayoritariamente en el hígado, Gas6 sólo se expresa en este tejido de manera minoritaria, mientras que se expresa de forma abundante en células del endotelio vascular, en el corazón, en el estómago y en riñones (Manfioletti, Brancolini et al. 1993), en la musculatura lisa vascular (Nakano, Higashino et al. 1995), en las células de la médula ósea (Avanzi, Gallicchio et al. 1997), en el endometrio (Sun, Fujimoto et al. 2003), en pulmones (Marcandalli, Gostissa et al. 1997), y en células reproductivas (Chan, Mather et al. 2000).

Se puede considerar que la función de Gas6 es pleiotrópica, ya que está involucrada en numerosos procesos y tipos celulares, que van desde migración, adhesión, crecimiento, diferenciación, duplicación hasta supervivencia. Además, está involucrada en la homeostasis de diferentes tipos de células, actuando como factor de crecimiento y anti-apoptótico (Hafizi and Dahlback 2006).

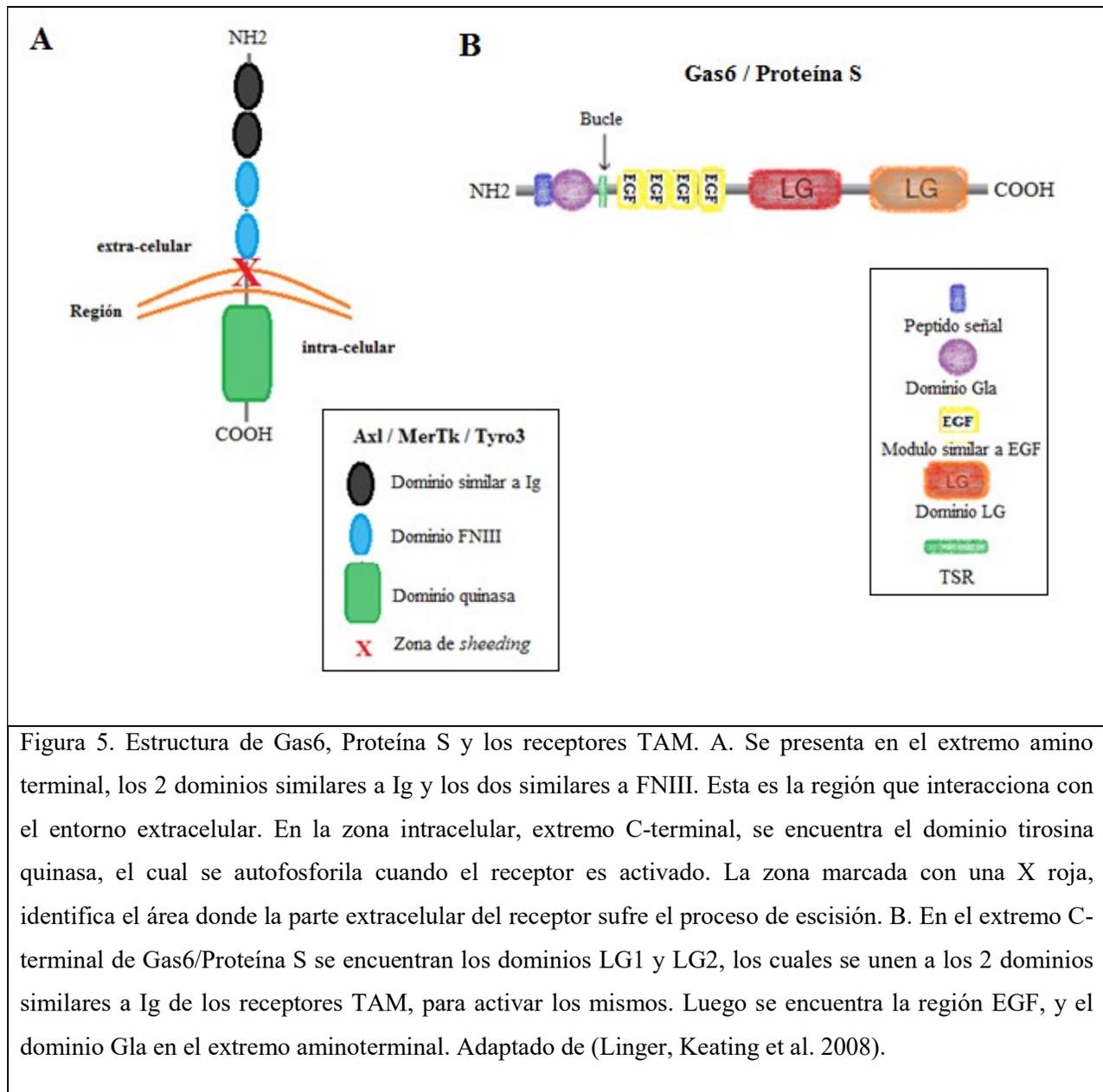
## **Los receptores TAM**

En 1991, Greg Lemke y otros investigadores identificaron un nuevo grupo de genes de tres receptores tirosina quinasa en el sistema nervioso y en células mieloides de leucemia. Esta subfamilia de receptores se denominó posteriormente familia TAM, haciendo referencia a las iniciales de los nombres de sus tres componentes. A este grupo pertenecen los receptores: Axl, conocido también como Tyro-7, Ark y UFO; Tyro3, conocido como Sky, rse, brt, tif; y MerTk, conocido Tyro-12, Mer, v-ryk, RP38 y c-mer. Las diversas nomenclaturas se deben, a que varios grupos de investigación fueron obteniendo diferentes fragmentos de PCR de la región conservada catalítica de la tirosina quinasa, y fueron dando nombres particulares a cada una a medida de que eran identificados, aunque al final se trataba de los mismo fragmentos que componen los tres receptores (Linger, Keating et al. 2008).

Los TAM fueron identificados en 1991, como una subfamilia aparte de los receptores proteína quinasa conocidos hasta entonces (Lai and Lemke 1991). El receptor Axl se descubrió como un gen transformador en pacientes que sufrían de leucemia mieloide crónica (O'Bryan, Frye et al. 1991). Luego en 1992 se aislado el receptor v-ryk (nombre inicial), conocido actualmente como MerTk, como un protooncogen para el virus aviar oncogen v-eyk, y más tarde

en 1993, se aisló el gen de Tyro3 de bibliotecas de cDNA de melanocitos (Linger, Keating et al. 2008). Más tarde entre 1995 y 1997 se identificó al factor de crecimiento Gas6 y a la proteína S como ligandos o activadores del sistema TAM, siendo el primero Axl, y MerTk el último (Ohashi, Nagata et al. 1995; Stitt, Conn et al. 1995; Mark, Chen et al. 1996; Nagata, Ohashi et al. 1996; Chen, Carey et al. 1997), como se comentó anteriormente.

Los receptores TAM son específicos de los cordados, y fueron de los últimos en aparecer en la línea evolutiva de los receptores tirosina quinasa. La región extracelular o dominio de unión al ligando, es la parte N-terminal y está constituida por dos dominios semejantes al de la inmunoglobulina, seguidos por dos repeticiones fibronectina tipo III. Esta combinación de módulos se observa también en la parte extracelular de receptores de adhesión molecular (ICAM) o vascular (VCAM) (O'Bryan, Frye et al. 1991; Graham, Dawson et al. 1994; Mark, Scadden et al. 1994; Chen, Carey et al. 1997). Esta región comparte una identidad de 28-36% de amino ácidos entre los receptores Axl, Tyro3 y MerTk (Chen, Carey et al. 1997). Después se encuentra la región intracelular, el segmento más corto, seguida por el extremo C-terminal intracelular con el dominio catalítico del receptor quinasa. Este esquema se puede evidenciar en la siguiente figura 5.



En el hombre, el peso molecular de estos receptores varía entre 100-140 kDa para Axl y Tyro3, y 160–205 kDa para MerTK. El amplio rango de peso molecular aparente es probablemente debido a las modificaciones post-traduccionales de los receptores, que incluyen glicosilación, fosforilación y ubiquitinación (Linger, Keating et al. 2008). Estos receptores también se pueden encontrar de forma soluble en el plasma, debido al proceso de *shedding* o de proteólisis de su región extracelular. Este concepto se ampliara más adelante.

El receptor Axl es una proteína transmembrana de 894 aminoácidos y su peso aparente en electroforesis de acrilamida está entre 100 y 140 kDa dependiendo del grado de glicosilación de sus 6 posibles sitios de N-glicosilación. El peso de su cadena polipeptídica es 104 kDa (O'Bryan, Frye et al. 1991). Su gen está ubicado en el cromosoma 19 en la región q13.1, y posee 20 exones (Linz, Schleithoff et al. 1993). Se ha identificado en diversos tipos de tejido epitelial y hematopoyético, en tejido muscular cardíaco y esquelético, en plaquetas y también en macrófagos y monocitos, mas no en granulocitos ni linfocitos B o T (Angelillo-Scherrer, de Frutos et al. 2001; Gallicchio, Mitola et al. 2005; Gould, Baxi et al. 2005; Saller, Burnier et al. 2006; O'Bryan, Frye et al. 1991). Participa en diferentes rutas de señalización que incluyen proliferación celular, control de la apoptosis, migración, adhesión y producción de citoquinas. Su forma soluble pesa aproximadamente 64 kDa (Ekman, Stenhoff et al. 2010).

El otro receptor que también pesa entre 100 y 140 kDa es Tyro3, que cuenta con 4 aminoácidos menos que Axl, 890 en total. El receptor en su forma madura pesa 97 kDa, y posee 7 sitios de glicosilación en su región extracelular, lo que puede variar su peso final (Linger, Keating et al. 2008). Se ha localizado su gen en el cromosoma 15 en la región q14, y posee 19 exones (Polvi, Armstrong et al. 1993). En el caso de Tyro3 se ha observado una gran expresión de este receptor en cerebro adulto (Lai and Lemke 1991), ovarios, testículos y riñones (Crosier, Hall et al. 1994), en células endoteliales y plaquetas (Angelillo-Scherrer, de Frutos et al. 2001; Chen, Li et al. 2004; Gould, Baxi et al. 2005). En menor proporción se pueden encontrar en muchos tejidos y células como monocitos, macrófagos, células dendríticas y *natural killer*, pulmones, células epiteliales del ojo. Su función celular es variable, desde la reorganización de la actina, migración y supervivencia celular hasta la eliminación de células apoptóticas. El peso molecular de su forma soluble es de aproximadamente 63 kDa (Linger, Keating et al. 2008).

El último receptor de la familia TAM es MerTk. Este es el de mayor peso molecular del grupo, contando con 999 aminoácidos, y alcanzando un peso aproximado entre 160 kDa y 205 kDa. Posee 14 sitios de glicosilación en su región extracelular, que pueden variar su peso final (Sather, Kenyon et al. 2007). Está ubicado en el genoma humano en el cromosoma 2, en la región q14.1 con 19 exones (Weier, Fung et al. 1999). Su expresión se ha observado principalmente en testículos, ovario, próstata, pulmón, retina y riñón (Goruppi, Yamane et al. 1997). También se expresa en macrófagos, células dendríticas y *natural killer*, megacariocitos y

plaquetas (Linger, Keating et al. 2008). El receptor está implicado en supervivencia celular, producción de citoquinas pro-inflamatorias, fagocitosis de células apoptóticas, migración y reorganización de la actina. La forma soluble pesa aproximadamente 90 kDa (Scott, McMahon et al. 2001; Linger, Keating et al. 2008).

El papel que juegan estos receptores en el organismo es múltiple. Se ha podido identificar su papel en la homeostasis de tejido nervioso en adultos, en el sistema reproductivo y vascular, y especialmente en el sistema inmunitario. Estas son funciones de gran importancia para el mantenimiento del cuerpo, por lo que es fácil imaginar que cualquier defecto en el sistema pueda derivar en enfermedad. Hoy en día las concentraciones de varias proteínas de membrana asociadas con la activación o disfunción endotelial son marcadores diagnósticos reconocidos en la patología cardiovascular (Deanfield, Halcox et al. 2007). Esto permite pensar en la posibilidad de que los receptores TAM puedan desempeñar algún papel diagnóstico también.

## **Afinidad entre Gas6 y proteína S, y los receptores TAM**

Poco tiempo después de la identificación de Gas6 y los receptores TAM a mediados de los años noventa, se estudiaron las afinidades que existen en este sistema ligando receptor. En 1995 Stitt et al. (Stitt, Conn et al. 1995) y Varnum (Varnum, Young et al. 1995) identificaron a la proteína S y a Gas6, como ligandos de Tyro3 y Axl. Observaron que en la línea celular de endotelio bovino (ABAE) inducida por suero fetal bovino en el suero (FBS), que se inducía fuertemente la fosforilación de Tyro3 fosforilado, lo que indicaba que contenía una proteína que activaba al receptor. Mediante una columna cromatográfica que contenía Tyro3-Fc inmovilizado, lograron aislar al ligando de Tyro3, que resultó ser proteína S (75 kDa) cuando analizaron su secuencia. La construcción de Tyro3-Fc, es la resultante de la unión de la fracción extracelular del receptor, con la fracción Fc de la inmunoglobulina humana G1. El mismo procedimiento fue aplicado para Axl, pero en este caso fijaron Axl-FC a una columna cromatográfica, partiendo de la idea de que los receptores TAM tienen una gran homología entre sí. En este caso lograron aislar igualmente una proteína de aproximadamente 75 kDa, sólo que en este caso se trató de

Gas6 Poco después, Godowski et al., estudiaron la capacidad de unión de los ligandos y receptores del sistema TAM empleando proteínas de diversas especies. Partieron de los estudios de Stitt et al. (1995), y observaron que la proteína S bovina era capaz de unirse a Tyro3 humano y murino, mientras que Gas6 no, y recíprocamente que Gas6 humano era capaz de unirse a Tyro3 humano, mientras que la proteína S humana no. Comprobaron también que Gas6 humano es capaz de unirse a Axl humano, y Gas6 bovino a Axl murino. Argumentaron que esto podía deberse a que las interacciones entre ligando-receptor son diferentes en cada especie. A partir de estos experimentos surgieron varias interrogantes sobre el sistema TAM: si proteína S era capaz también de unirse a Axl, si Gas6 era capaz de unirse a Tyro3, y si alguno de los dos ligandos, o ambos, eran capaces de unir al tercer receptor del grupo, MerTk.

En 1996 Mark et al. caracterizaron a Gas6 como ligando de Tyro3 (Rse) y Axl en humanos. También describieron que las regiones Gla y la región de repeticiones EGF, no eran necesarias para la unión del ligando al receptor, ya que vieron que fracciones de Gas6 que sólo contenían los módulos LG1 y LG2, eran capaces de unirse a Tyro3 y a Axl, y que además eran capaces de activar la fosforilación de estos receptores (Mark, Chen et al. 1996). En 1997 Tanabe et al. identificaron también, mediante el uso de librerías de cDNA de rata, que esos módulos eran la parte esencial para la actividad biológica de Gas6, y que la región N-terminal juega un papel modulador en la actividad de la proteína (Tanabe, Nagata et al. 1997). Continuando con esta línea de estudios, se demostró que Gas6 se une a los receptores TAM con el siguiente orden de afinidad:  $Axl \gg Tyro3 > MerTk$ , mientras que la proteína S tiene mayor afinidad por MerTk y Tyro3, que por Axl. Estos experimentos fueron realizados con construcciones de cDNA de las proteínas del sistema TAM de ratones, ratas y humanos (Nagata, Ohashi et al. 1996).

Más tarde en el año 2000 Evenäs et al. estudiaron las afinidades descritas para Gas6 y proteína S con respecto a Axl y Tyro3. Para ello crearon una serie de proteínas quimeras, para evaluar su unión a los receptores. En cada quimera, la región SHBG de la proteína S humana, era remplazada por su homólogo bovino, o por la misma sección correspondiente en Gas6 humano. Observaron que proteína S si era capaz de activar a Tyro3, pero cuando se encuentra en concentraciones superiores a las fisiológicas en plasma. Identificaron también que la primera región G (LG1), contiene residuos fundamentales para la interacción con Tyro3 (Evenas, Dahlback et al. 2000).

En el año 2005 Fisher et al, realizó un estudio sobre la interacción de Gas6 con sus receptores, y que regiones de Gas6 participan en la misma. Para ello utilizó un anticuerpo monoclonal contra Gas6 recombinante, y lo probó con el ligando, y con los segmentos de sus dos regiones cercanas al extremo C-terminal LG1 y LG2, expresadas independientemente. Inicialmente se postuló que la unión de Gas6 a sus receptores era mediante la región LG2. En dicho estudio se comprobó que también la región LG1 en presencia de  $Ca^{2+}$ , pero no LG2, era reconocida por el anticuerpo monoclonal. Esto sugería, que Gas6 tenía una segunda zona de unión a sus receptores. Este resultado lo comprobaron, al evidenciar la unión de los receptores al segmento de la región LG1 que se habían obtenido anteriormente (Fisher, Brigham-Burke et al. 2005).

En un estudio sobre el epitelio pigmentoso de la retina en ratones, donde se ha observado que el receptor MerTk juega un papel importante ya que mutaciones en el mismo se asocian a retinitis pigmentosa, se identificó que proteína S es capaz de unirse a este receptor. Observaron que ratones mutantes carentes de Gas6 no manifestaban degeneración de los foto receptores, lo que sugería que los receptores seguían siendo estimulados por otro ligando, probablemente proteína S. Sugirieron a su vez que proteína S era responsable del proceso de fagocitosis, que en este caso se encarga de eliminar los extremos distales de los foto receptores, lo que favorece su continua regeneración (Prasad, Rothlin et al. 2006).

## Activación de los receptores

La unión del ligando a la región extracelular de los RTKs deriva en cambios conformacionales que inducen y estabilizan la dimerización de los mismos, resultando en un aumento de la actividad quinasa y la autofosforilación de los residuos tirosina. La fosforilación de diferentes residuos tirosina del receptor activado crea en la parte intracelular sitios de unión para proteínas con dominios homólogos a SH2 (*src homology 2 domains*) y de unión a fosfotirosina (*phosphotyrosine binding domain*; PTB) (Lemmon and Schlessinger 2010).

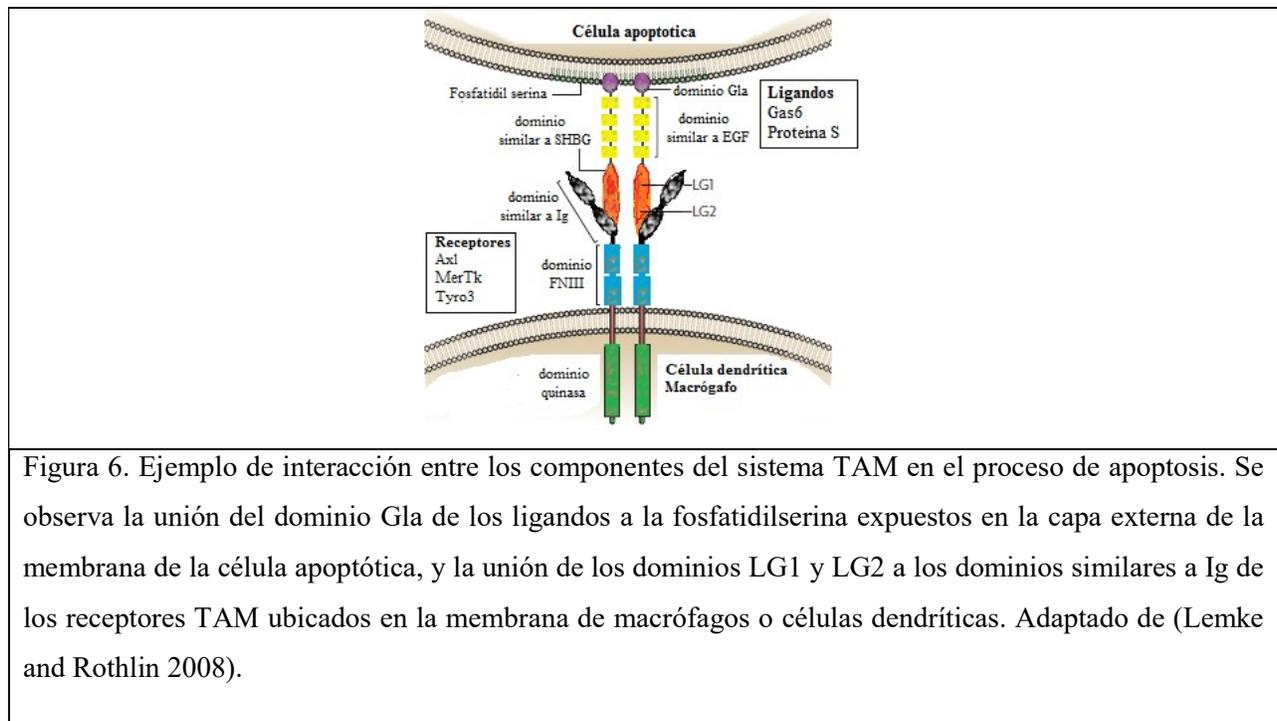


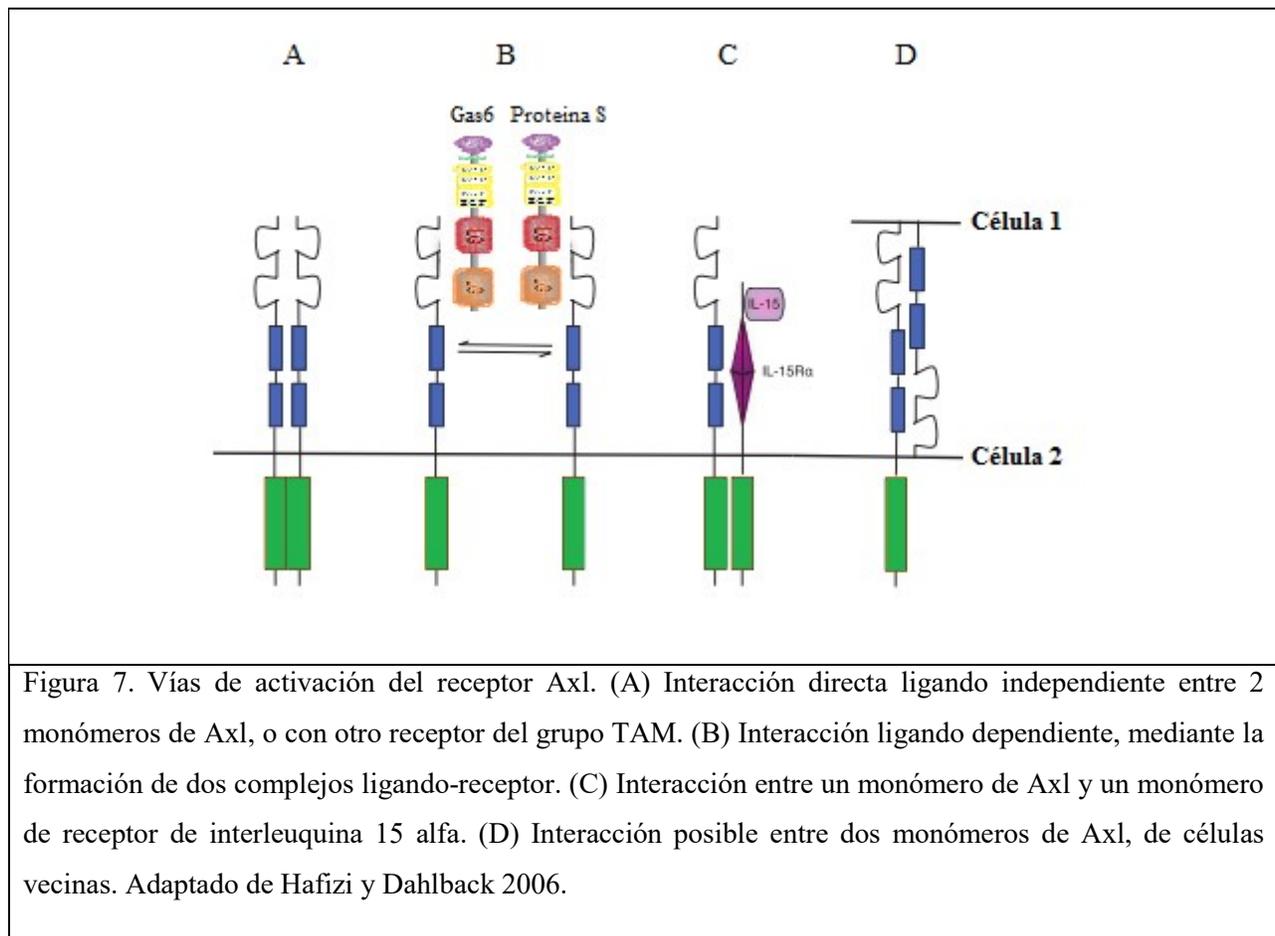
Figura 6. Ejemplo de interacción entre los componentes del sistema TAM en el proceso de apoptosis. Se observa la unión del dominio Gla de los ligandos a la fosfatidilserina expuestos en la capa externa de la membrana de la célula apoptótica, y la unión de los dominios LG1 y LG2 a los dominios similares a Ig de los receptores TAM ubicados en la membrana de macrófagos o células dendríticas. Adaptado de (Lemke and Rothlin 2008).

La activación de los RTKs por medio de su ligando, es un proceso que se ha estudiado ampliamente. La unión del ligando al receptor se realiza en 2 pasos: la formación de un complejo de gran afinidad ligando-receptor, y luego la dimerización de dos complejos ligando-receptor (Schlessinger 2000). También se ha propuesto que los receptores formen heterodímeros con otras moléculas, como en el caso de Axl con el receptor del interferón alfa ( $\text{IFN-}\alpha$ ), o con otros receptores del sistema TAM (Lemke and Rothlin 2008).

En el sistema TAM no sólo se ha visto que Gas6 y proteína S son capaces de activar a Axl, MerTk y Tyro3, sino que además la activación de estos últimos, puede resultar en la inhibición de la unión entre ligando-receptor de otros sistemas. Tal es el caso de la influencia del sistema Gas6-Axl, sobre la inhibición del sistema del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se ha observado que el sistema Gas6-Axl, era capaz de inhibir la fosforilación de uno de sus receptores, el VEGFR-2, evitando así que su unión a su ligando VEGF-A active el mismo. Con estos resultados descubrieron uno de los mecanismos por el cual se regula el proceso de angiogénesis, y como la activación de Axl por Gas6 puede afectar la activación de otros receptores. Recientemente se ha estudiado la interacción entre el ligando VEGF-A y Axl. Ruan y Kazlauskas (2012) investigaron el efecto en la señalización por Axl tras estimulación por VEGF-A, en especial su efecto sobre la vía de PI3K/Akt. Usando cultivos celulares de endotelio cardiaco de ratón mutante para Axl (*knockout*), o modulando la activación de Axl mediante un inhibidor específico (R428), observaron que en ausencia de este receptor de la familia TAM, había una gran disminución de la activación de Akt. También indicaron que VEGF-A era capaz de fosforilar a Axl, mientras que la activación del receptor por Gas6 no activaba a VEGFR-2. Vieron que VEGFR-2 activado actúa mediante SFK (proteína de la familia de las quinasas Src), para promover la autofosforilación de Axl independientemente de su unión a un ligando. Axl, una vez fosforilado, es capaz de activar la vía de Akt, lo que resulta en la promoción del proceso de angiogénesis, contribuyendo así con las funciones del sistema VEGF en el mismo proceso (Ruan y Kazlauskas 2012).

También se ha observado que debido al carácter homofílico de la región extracelular de los receptores, estos pueden unirse al ubicarse en células vecinas, resultando en agregación celular. Este fenómeno se observó, cuando se transfectaron células S2 de *Drosophila melanogaster* con Axl murino, produciendo una sobreexpresión del receptor (Bellosta, Costa et al. 1995). Este estudio permitió concluir a su vez que para la agregación celular, no se requiere del dominio quinasa del receptor. Más tarde en 1997, McCloskey et al. reportaron que la agregación celular efectivamente ocurre en células de mamífero, pero que es mediada por Gas6. Mediante el uso de células mieloides murinas que sobre expresaban Axl (32D-Axl), y la adición de Gas6, fueron capaces de observar agregados de estas células. El caso contrario ocurría, cuando bloqueaban a Gas6 mediante la adición de la fracción extracelular de Axl, la cual secuestraba o

bloqueaba al ligando. Observaron además, que células mutantes de 32D, con formas del receptor Axl incapaces de activar su región quinasa, formaban igualmente agregados celulares. Incluso observaron que las células 32D-Axl una vez unidas a Gas6, también eran capaz de formar agregados junto a las células 32D normales. Describieron también que la unión del ligando al receptor es dependiente de la región Gla y EGF, y que esta es dependiente de  $Ca^{2+}$ , y que la activación del receptor es dependiente de las regiones LG1 y LG2 (McCloskey, Fridell et al. 1997).



Se ha observado que la familia TAM es capaz de sufrir una dimerización y una autofosforilación ligando independiente, posiblemente después de una sobreexpresión de los receptores. Se ha encontrado que las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* ROS), promueven la fosforilación de Axl en células de la musculatura lisa vascular (VSMCs) en ausencia de Gas6. Por ello sugieren que la activación ligando independiente de Axl podría ser

más típica durante estados fisiopatológicos con incrementos en estrés oxidativo y expresión en exceso de los receptores (Konishi, Aizawa et al. 2004).

## **Formas solubles de los receptores TAM**

Uno de los descubrimientos a destacar sobre los receptores TAM, es que se han encontrado en forma soluble en el plasma sanguíneo. El primero en ser detectado fue Axl, seguido de MerTk y finalmente Tyro3. La forma de Axl soluble fue identificada por primera vez en suero y en medio condicionado de células dendríticas de ratón, compuesta por la región extracelular de la proteína y pesando aproximadamente 65 kDa (Costa, Bellosta et al. 1996). En el 2007 se comprobó la presencia de la forma soluble de MerTk, en ensayos con líneas celular. En ese estudio se reportó que el proceso de *shedding* del receptor, se podía inducir mediante el uso de lipopolisacáridos (LPS) y PMA, por medio de la metaloproteinasa ADAM17 y desintegrina. La forma sMerTk puede pesar entre 125 kDa y 150 kDa dependiendo del tipo celular (Sather, Kenyon et al. 2007). Se ha sugerido que las diferentes metaloproteinasas (ADAMs), juegan un papel fundamental en diferentes enfermedades, al modular la actividad de diversos receptores. Se ha sugerido su implicación en cáncer, controlando los procesos de migración celular y angiogénesis, y en enfermedades crónicas inflamatorias, controlando al factor proinflamatorio TNF $\alpha$  (van Goor, Melenhorst et al. 2009). Luego en 2011 Wu et al. comentaron por primera vez la existencia de la forma soluble de Tyro3 en plasma humano, y su posible implicación en lupus eritematoso sistémico (Wu, Ekman et al. 2011). Se ha sugerido también que se puede obtener los fragmentos solubles de los receptores TAM, mediante un *splicing* alternativo en el RNA mensajero, que no sintetiza la región intracelular del receptor (Sather, Kenyon et al. 2007).

Los investigadores Thorp et al., identificaron que el proceso de *shedding* en MerTk, requiere de ADAM17 y MAPKp38. Mediante el uso de siRNA para silenciar la expresión de ADAM17, comprobaron que esta proteína no solo es la principal responsable de la formación de la forma soluble de MerTk, sino que además es imprescindible para la misma. Identificaron

mediante espectrometría de masas, que el proceso de proteólisis ocurre en el AA prolina 485 del receptor en macrófagos murinos. Al construir un mutante del receptor, que carecía de los amino ácidos del 483 al 488, observaron una disminución en la formación de sMerTk al ser las células estimuladas con PMA. Comprobaron además que estos receptores mutados eran capaces de inducir eferocitosis, incluso en presencia de un promotor de la escisión de MerTk como lo es PMA. Por último observaron que el proceso de *shedding* inducido por LPS, puede ser suprimido por la presencia de bajas concentraciones de NADPH oxidasa 2 (Nox2), lo que suprime a PKC $\delta$ , y en consecuencia inhibe a MAPK p38 (Thorp, Vaisar et al. 2011).

Este proceso se engloba en el fenómeno de *shedding* o escisión extracelular de receptores de membrana. En el año 1987 se empezó a hablar de escisión y liberación de las regiones extracelulares, de proteínas transmembrana. A partir de entonces se dio a conocer que este proceso ocurría, pero el estudio de como el mismo sucede es más reciente. Afecta a una gran variedad de tipos de proteínas que funcionan como ligandos, receptores, moléculas de adhesión celular, coenzimas. Debido al factor heterogéneo del mismo, se cree que existen diferentes mecanismos, por los cuales ocurre este fenómeno de *shedding*. Se ha visto en la mayoría de los casos, que este proceso se puede ver aumentado mediante el uso de ésteres de forbol, y bloqueado mediante el uso de sustancias derivadas del ácido hidroxámico. Dependiendo de la proteína transmembrana afectada por este fenómeno, se observaran diferentes consecuencias del mismo sobre el medio y la biología celular (Arribas and Merlos-Suarez 2003).

El caso concreto de los TAM, es la escisión de las proteínas receptoras de membrana. En este caso se da la liberación de la región extracelular de unión al ligando al medio en forma soluble, pudiéndose ver afectados receptores en hormonas, factores de crecimiento, y citoquinas. El segmento del receptor transmembrana e intracelular se mantienen intactos, e incluso pueden ser capaces de traducir señales intracelulares. En el caso de los TAM, el proceso de *shedding* es de tipo antagonista por dos vías, evita la activación natural del receptor por medio de sus ligandos Gas6 y proteína S, ya que la región de unión al mismo ya no está presente en la célula diana; y porque la fracción soluble del receptor es capaz de unirse a Gas6, evitando su unión posterior a los receptores TAM. Esta información no se ha asociado a proteína S. Un caso similar se ha descrito para el receptor de la hormona de crecimiento (GHR). En este caso también la fracción libre extracelular GH es capaz de unirse a la proteína de unión GH (GHBP), evitando la

función de la misma al competir con GHR, aumentado a su vez la vida media de GHBP (Arribas and Merlos-Suarez 2003).

El proceso ha sido descrito también en plaquetas, como una forma de modular su actividad. Se ha comentado que la escisión de los receptores específicos de plaquetas, la glicoproteína (GP)V que se une a colágeno, y la GPIb $\alpha$  que se une al factor von Willebrand, no solo inhibe la función de estos receptores, sino que además forma fragmentos proteolíticos que pudiera ser utilizados como biomarcadores o como moduladores plasmáticos (Qiao, Shen et al. 2010).

La forma soluble puede secuestrar a su ligando en sangre, evitando que este también cumpla sus funciones. (Ekman, Stenhoff et al. 2010). De esta manera se logra una inhibición doble en el sistema TAM, ya que no sólo el receptor ya no es activo, sino que además secuestra a Gas6 y evita que éste active los demás receptores TAM. Este complejo no se ha estudiado ni para Tyro3, ni para MerTk, aunque probablemente sAxl es el ligando más relevante de Gas6 en la sangre, ya que Tyro3 tiene una concentración menor y MerTk una menor afinidad por Gas6.

Se ha descrito para el receptor Axl el proceso de ubiquitinación, en donde el receptor es removido de la membrana e internalizado en la célula. Valverde et al. describieron este fenómeno, indicando que Axl puede ser internalizado debido a una estimulación sucesiva por parte de su ligando Gas6. De esta manera el receptor sería inhibido por su propio ligando (Valverde 2005; Mishra, Wang et al. 2012).

## **Vías de señalización del sistema TAM**

Los primeros estudios realizados para conocer las vías de señalización del sistema TAM se realizaron sobre los receptores, ya que en su momento no se conocían los ligandos de los mismos. Para ello se usaron receptores quimera FMS-MerTk (Ling and Kung 1995) y EGF-Axl (Fridell, Jin et al. 1996). Entre los primeros estudios identificaron cascadas de señalización para MerTk y Axl, las cuales activaban las vías de PI3K, Ras y ERK. También identificaron que variaciones en la región extracelular del receptor, tienen un impacto significativo en las diferentes vías de señalización, al comparar los efectos del receptor quimera de Axl con su homólogo nativo (Hafizi and Dahlback 2006; Linger, Keating et al. 2008). Posteriormente se identificó a Gas6 como ligando de Axl y Tyro3, como se comentó anteriormente, y los estudios continuaron sobre esa base. A continuación se presentan cronológicamente las vías de señalización identificadas para cada receptor de la familia TAM en los últimos años.

## **Vías de señalización de MerTk**

Los primeros estudios realizados con la quimera de MerTk sobre fibroblastos NIH3T3, elucidaron 3 vías iniciales para la activación de este receptor: PI3K/Akt, fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), y ERK. Estudios posteriores identificaron a Gas6 como ligando de Mer (Nagata, Ohashi et al. 1996) y confirmaron que la activación dependiente de ligando estimulaba la fosforilación de ERK1/2 (Chen, Carey et al. 1997). En el caso de PLC $\gamma$ , describieron que la fosforilación y activación de esta enzima de membrana pudiera ocurrir mediante la unión directa de su dominio SH2 a la región endógena de fosfo-MerTk (Todt, Hu et al. 2004). Este mismo mecanismo se propuso como medio de activación de la vía de PI3K por parte de MerTk (Sen, Wallet et al. 2007).

El efecto final de estas 3 principales vías de señalización varía dependiendo del tipo de célula donde se encuentren y de su entorno. En células de leucemia por ejemplo, la activación del receptor estimula la fosforilación de Akt, ERK1/2 y p38 MAPK, resultando en una reducida apoptosis sin que al parecer afecte a su proliferación (Guttridge, Luft et al. 2002). El hecho de que diferentes vías de señalización converjan en la misma reacción de supervivencia, les da a las células una gran ventaja frente a linfocitos no cancerígenos.

En experimentos con las quinasas Raf (proto-oncogen serina) se ha demostrado que estas pueden actuar como un paso anterior en la activación de la ruta de MAPK/ERK y esta a su vez activar p90RSK. Esta acción resulta en la transcripción de la interleuquina 8 pro-inflamatoria (IL-8). Al incubarse las células con un inhibidor de la quinasas de la MAPK/ERK (MAP2K1 o MEK), se observó un descenso en la producción de IL-8, mientras que si se incubaba la misma célula con un inhibidor de PI3K, aumentaba la producción de IL-8 (Wu, Robinson et al. 2004). Los autores Wang et. Al (Wang, Zeigler et al. 2007), sugirieron también que la vía de señalización de PI3K/Akt podría atenuar el efecto de la vía de MAPK/ERK mediante la fosforilación e inhibición de Raf. De esta manera se sugirió que MerTk tiene la capacidad tanto de estimular, como de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias.

Se ha reportado que Gas6 es capaz de inhibir la expresión de los factores proinflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-1, a través del receptor MerTk en monocitos y macrófagos, controlando la respuesta inmune innata. El grupo de Camenisch y col. observaron mediante el uso de ratones MerTk *knockout*, que este receptor juega un papel importante en la regulación de la vía de producción de TNF- $\alpha$  para atenuar la posibilidad de un shock endotóxico mediante el estímulo de LPS (Camenisch, Koller et al. 1999). Por otra parte el grupo de Alciato et al., identificaron que la vía por la cual sucedía este proceso, era mediante el factor Akt y su respectiva fosforilación, y que además la activación de PI3K es relevante para que este proceso suceda. Identificaron también que GSK3 $\beta$ , un modulador de la respuesta pro/anti inflamatoria, era fosforilado mediante la activación de PI3K/Akt. Esta vía de señalización termina con la inhibición de NF- $\kappa$ B, y su habilidad para unirse al ADN en el núcleo. De esta manera demostraron que Gas6 junto a MerTk, son capaces de inhibir la secreción de citoquinas en macrófagos, activando la vía antiinflamatoria de PI3K/Akt/ GSK3 $\beta$  (Alciato, Sainaghi et al. 2010). En cambio, otros estudios han observado mediante la expresión de CD8-MerTk (quimera) en células pro-linfocitos B, que su activación resulta en la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B vía PI3K/Akt. También se evidenció la activación de p38/MAPK y de la MAP2K1/MEK1, resultando en la protección celular ante procesos de apoptosis (Verma, Warner et al. 2011).

Durante el proceso de eliminación de células apoptóticas, pueden ocurrir daños o alteraciones en los tejidos adyacentes a estas. Por esta razón, cuando ocurre la interacción entre macrófagos y células apoptóticas, se secretan factores como el de crecimiento endotelial vascular

(VEGF) y de crecimiento hepatocítico (HGF), para reparar el tejido dañado. En 2012 Park et al., realizaron ensayos con cultivos de líneas de macrófagos (RAW 264.7) y células sanas y apoptóticas (Jurkat), modificados por la presencia de anticuerpos contra los receptores TAM y Gas6, así como siRNA contra los receptores también. Reportaron que el bloqueo de MerTk y de Gas6, y no de Axl y Tyro3, suprimía la expresión del factor HGF. En un estudio anterior de estos mismos autores (Park, Choi et al. 2011), se identificó que las células apoptóticas estimulaban la producción de HGF mediante la vía de señalización de las quinasas RhoA/Rho, PI3K/Akt y las MAP quinasas ERK y JNK.

También en el año 2012, Linger et al. identificaron una nueva vía de señalización que favorecía la supervivencia de células tumorales de pulmón (NSCLC). Identificaron nueve proteínas intracelulares fosforiladas en la línea celular de cáncer Colo699, entre las que destacaban MSK1/2, CREB y ATF1. Lo mismo ocurría cuando las células eran estimuladas con la presencia de Gas6. Este estudio sugiere que la inhibición de MerTk induce el proceso de apoptosis, por medio de la inhibición de los mecanismos de señalización de supervivencia mediados por Akt, CREB, Bcl-xL, Bcl-2 y survivina. Identificaron el mismo caso para Axl, pero en menor medida (Linger, Cohen et al. 2012). Este es otro claro indicio, de que los receptores TAM son un importante blanco de estudio, para la modulación o control de enfermedades.

Recientemente en el estudio de Lee et al. (Lee, Han et al. 2012), se asoció la vía de señalización de STAT1 con MerTk. Utilizaron ratones BALB en condiciones libres de patógenos, para ver el efecto que tenía la inducción de LPS en pulmones sobre la respuesta inflamatoria, y su respectivo daño en el tejido. Es conocido que los receptores TAM inhiben la respuesta inflamatoria, mediante la vía de STAT1 y la producción de proteínas supresoras de las señales de citoquinas (SOCS1 y 3), que son supresores de los receptores semejantes a Toll (TLR) (Rothlin, Ghosh et al. 2007), promotores estos de la respuesta inflamatoria. Observaron un aumento en la fosforilación de STAT1, y en la expresión de mRNA de SOCS1 y SOCS3 en el tejido pulmonar de los ratones, 4 y 24 horas después de haber sido tratados con LPS. Confirmaron el rol de MerTk en este proceso, empleando anticuerpos específicos para este receptor, al observar un efecto adverso en la fosforilación de STAT1 y la correspondiente expresión de SOCS1 y 3. De esta manera estos investigadores identificaron una nueva vía de

señalización de MerTk, que confirma su importante rol en la modulación de la respuesta inmune innata y en la inflamación.

Se han propuesto vías atípicas de señalización entre MerTk y el citoesqueleto de actina. Este estudio se realizó empleando el sistema de interacción entre proteína quiméricas en levadura (*yeast two-hybrid system*). En este sistema se identificó la interacción entre MerTk y Grb2, SHC y Vav1, que son reguladoras de la reorganización de la actina antes mencionada (Mahajan and Earp 2003). Este descubrimiento sugiere que MerTk es capaz de afectar la morfología de las células mediante su influencia sobre la actina, facilitando la fagocitosis de las células apoptóticas. Otro estudio sugiere que MerTk regula la actina del citoesqueleto por la vía de PLC $\gamma$ 2 y Src, favoreciendo también la exposición de las células apoptóticas a los macrófagos (Todt, Hu et al. 2004).

En la figura siguiente se puede visualizar las vías de señalización del receptor MerTk cuando es activado por sus ligandos.

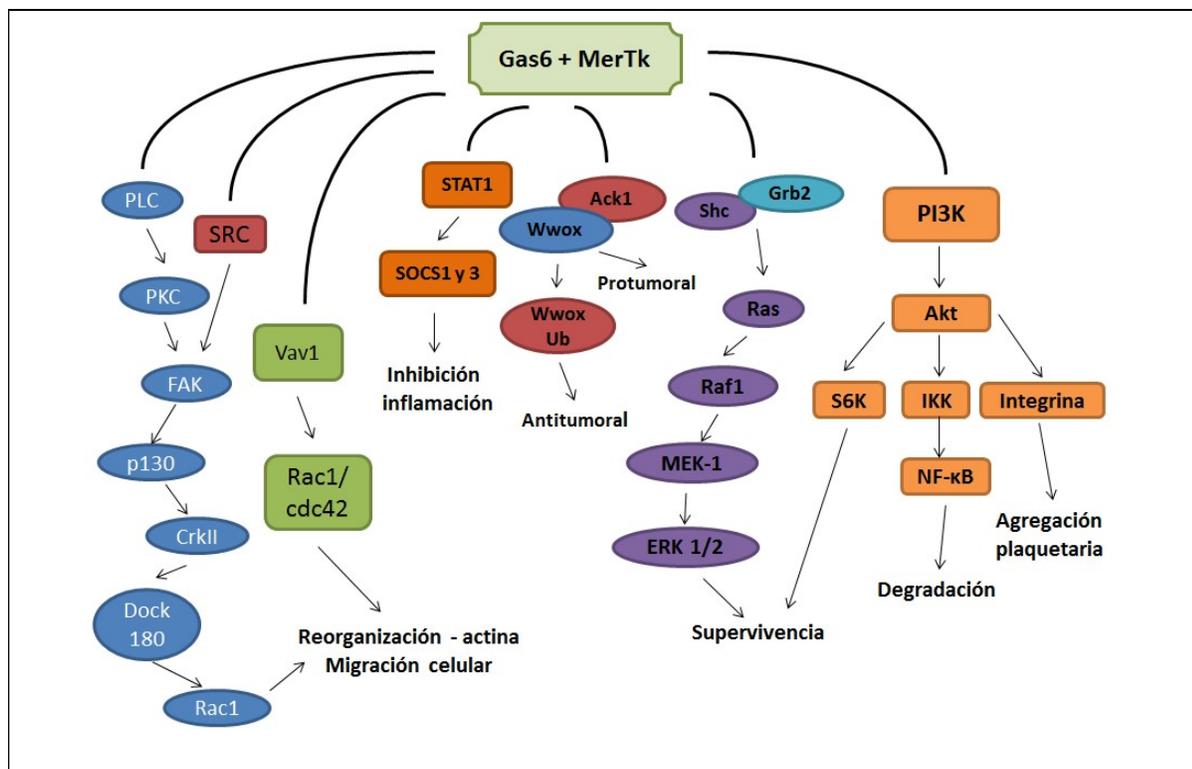


Figura 8. Principales vías de señalización de MerTk. Destacan la vía de Akt, Ras y Ack1/Wwox, ya que las 3 diferentes vías favorecen la supervivencia celular. La vía de Ack1/Wwox, también puede derivar en la degradación celular, cuando Wwox es ubiquitinizada. 2 vías diferentes que activan Rac1, reorganizan la actina y favorecen la migración celular. La vía de agregación plaquetaria se da mediante Akt y las integrinas de membrana. Adaptado de (Linger, Keating et al. 2008).

Se ha estudiado también el papel de MerTk en el aumento de la supervivencia celular mediante vías de señalización atípicas, como la de ACK1 que induce la fosforilación, ubiquitinación y degradación de Wwox, una proteína supresora de tumor (Mahajan, Whang et al. 2005; Mahajan and Mahajan 2010; Verma, Warner et al. 2011). Su supresión podría resultar en una señal de supervivencia de células cancerígenas.

## Vías de señalización de Axl

Como se comentó anteriormente, la unión Gas6/Axl favorece el crecimiento y supervivencia de diferentes tipos de células. Estos están posiblemente mediados por las vías de MAPK/ERK y PI3K como en el caso de MerTk. Estudios con receptores quimera EGF-Axl en líneas celulares de leucemia, demostraron que la unión del ligando al receptor estimulo las vías de Grb2, Ras, Raf1, MEK-1 y ERK1/2, que favorecen la proliferación celular (figura 9). Estudios indican que la activación parcial o completa de la vía Ras/ERK es indispensable para la supervivencia celular, y que es mediada por Axl (Linger, Keating et al. 2008).

El receptor también se ha visto involucrado en la activación de la vía PI3K/Akt, que resulta en múltiples vías que convergen en la supervivencia de la célula. Esta vía incluye la fosforilación de NF- $\kappa$ B, aumento de la expresión de proteínas antiapoptóticas como los genes 2 de linfoma de célula B (Bcl-2) y linfoma de célula B extra grande (Bcl-xL), y la inhibición de proteínas proapoptóticas como la caspasa 3 (Verma, Warner et al. 2011).

En este caso la regulación de NF- $\kappa$ B por PI3K/Akt difiere de la vía de activación que se ha observado en MerTk, la cual ha demostrado que inhibe IKK, resultando en la supresión de TNF- $\alpha$ , dependiente de la transcripción de NF- $\kappa$ B. Experimentos sobre fibroblastos de ratón deficientes en Axl (*Axl*  $-/-$ ) estimulados con Gas6, no favorecieron su supervivencia, a diferencia de los fibroblastos *wild-type* que si lo hicieron (Bellosta, Zhang et al. 1997). Más estudios identificaron la misma vía de señalización en otros tipos celulares, como las células epiteliales del glóbulo ocular, células musculares lisas vasculares, neuronas GnRH y oligodendrocitos (Linger, Keating et al. 2008).

La vía de señalización Gas6/Axl también se ha visto involucrada en procesos celulares como la migración de células neuronales y la producción de citoquinas. En el caso de las neuronas GnRH, se ha observado que Axl dirige la migración de estas células desde la placa olfatoria hasta el proencéfalo, mediante vías de señalización como PI3K, Ras, p38 MAPK, que reorganizan la actina. Curiosamente se observó después, que Axl no se encuentra en las neuronas GnRH post migratorias (Allen, Linseman et al. 2002; Nielsen-Preiss, Allen et al. 2007).

En un estudio sobre células de mesotelioma, una forma rara de cáncer que afecta al tejido mesotelial, se identificó que Axl juega un papel importante en la proliferación, migración e

invasión del mismo. Identificaron además una alta tasa de expresión de Gas6 en líneas celulares de mesotelioma y en biopsias de pacientes, mientras que en células controles no se presentaba ni el ligando, ni el receptor citado. Mediante el uso de shRNA contra Axl y Gas6, pudieron regular la fosforilación del receptor, además de evidenciar que rutas de señalización ocurrían en las células cancerígenas. Los investigadores comprobaron, que la vía PI3K/AKT/mTOR y la de RAF/MAPK contribuyen a que Axl desarrolla las propiedades tumorales del tumor al utilizar un inhibidor del receptor (DP-3975) que bloqueaba dichas vías. Notaron además que el uso de shRNA aminoraba la actividad de Axl, y establecía a la célula en una fase G1, disminuyendo su capacidad invasiva y de formación de colonias (Ou, Corson et al. 2011).

También se ha identificado que Axl es capaz de unirse a la tirosina plasmática ACK1, implicada en procesos metastáticos, favoreciendo la migración de células, y activando la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Demostraron que ACK1 requiere un extremo C-terminal, para regular los receptores tirosina quinasa, como ocurre en el caso de Axl. En dicho estudio, Pao Chun et al. observaron que dicha unión entre ACK1 y Axl esta favorecida por la proteína Grb2, que aumenta la eficiencia de la unión. A pesar de que la activación de EGFR promueve la actividad de ACK1, la activación de Axl por medio de Gas6 no tiene el mismo efecto, a diferencia de lo observado en la activación de MerTk. Se ha visto que ACK1 controla los niveles del receptor, debido a que la ausencia de esta tirosina bloquea el efecto de regulación de Axl cuando es activado por Gas6 (Pao-Chun, Chan et al. 2009).

Experimentos sobre células de levadura confirmaron la interacción entre Axl, Grb2 y PI3K, e identificaron 4 nuevas proteínas que interactúan con este receptor: supresor de señales de citoquinas (SOCS)-1, Nck2, proteína de unión Ran en el centro de reorganización de microtúbulos (RanBPM), y C1-TEN (Hafizi, Alindri et al. 2002). Se ha observado que una sobreexpresión de C1-TEN inhibe la vía de Akt, resultando en una disminuida supervivencia, migración y proliferación celular. Esto se puede deber al efecto fosfatasa de C1-TEN que inactivaría Axl. También se ha visto que Axl puede disminuir la producción de citoquinas a través de la interacción con SOCS (Hafizi, Ibraimi et al. 2005).

En la figura siguiente se puede visualizar las vías de señalización del receptor Axl cuando es activado por sus ligandos.

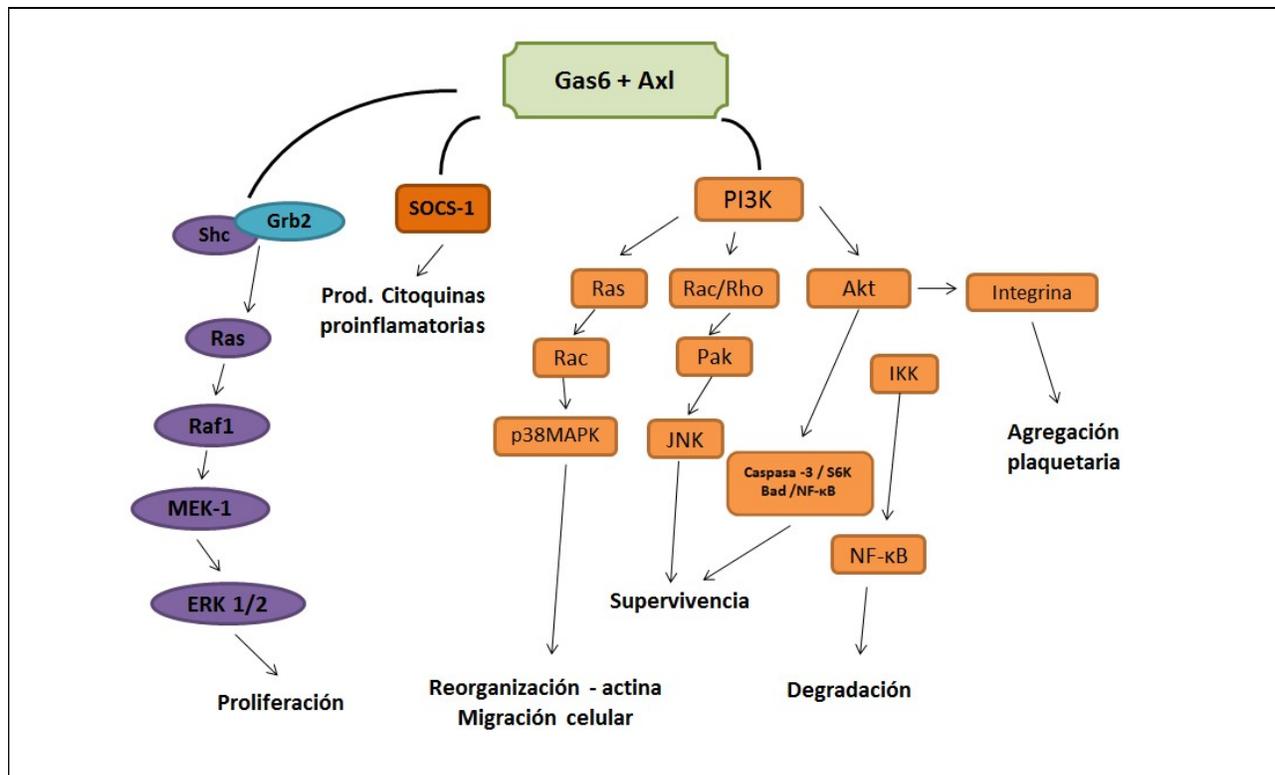


Figura 9. Principales vías de señalización de Axl. Destacan la vía de Akt y Rac, que llegan a la función común de favorecer la supervivencia celular. La vía de Ras también favorece el ciclo celular, actuando directamente en mecanismos de proliferación. El efecto de Axl sobre el sistema inmunitario, se ve conducido por la vía de SOCS-1, que favorece la producción de citoquinas proinflamatorias. La vía de PI3K/Ras, al igual que en MerTk, reorganiza la actina, y favorece la migración celular. Al igual que en MerTk y Tyro3, Axl permite la agregación plaquetaria mediante la interacción con las integrinas. Adaptado de (Linger, Keating et al. 2008).

## Vía de señalización de Tyro3

Este es el receptor menos estudiado de la familia TAM, y sus vías de señalización no se han identificado en detalle. Estudios con células de levadura han identificado una serie de proteínas que pueden interactuar con Tyro3, entre las que se encuentran RanBPM, proteína fosfatasa 1 (PP1), y la subunidad p85  $\beta$  de PI3K. También se han identificado la vía de PI3K y MAPK. Se ha observado a su vez fosforilación de ERK1/2 mediante la estimulación de Tyro3 por Gas6 en osteoclastos de ratón, resultando en reabsorción de hueso (Katagiri, Hakeda et al. 2001).

En modelos de ratón carentes de proteína S, se ha visto que los mismos desarrollan diferentes patologías: coagulopatías embrionarias letales, daños tromboticos e isquémicos, perturbación de la barrera cerebro-vascular (*BBB*), hemorragias intracerebrales. En 2010 Zhu et al. querían esclarecer el mecanismo por el cual carencias de proteína S, podían afectar la *BBB*, por lo que estudiaron el hipotético efectos que los receptores TAM podían tener el mismo. Usando un modelo de *BBB* con células endoteliales cerebrales humanas, querían esclarecer si la proteína S podía afectar la integridad de esta barrera encefálica. Usando siRNAs, anticuerpos y células endoteliales de cerebro de ratón mutados para los tres receptores, observaron que Tyro3 mediaba la propiedad vasculoprotectora de proteína S. Observaron que la activación de Tyro3 por este ligando, activaba a su vez al receptor esfingosina 1 fosfato (S1P1), que es responsable de unirse a la esfingosina 1 fosfato, lo que al final permite rearrreglos citoesqueléticos dependientes de Rac1, para mantener la integridad de esta membrana (Zhu, Wang et al. 2010). De esta manera comprobaron el papel que puede jugar la proteína S y su unión al receptor Tyro3 en el mantenimiento de la *BBB* y la protección del sistema nervioso central.

Se ha descrito que la proteína S es capaz de proteger a las neuronas de daños excitotóxicos, por medio de la activación de Tyro3 y la vía de señalización de Akt. Usando cultivos de neuronas de ratones deficientes de la tirosina quinasa Akt, Zhong et al. observaron que proteína S era capaz de estimular la fosforilación de Bad y Mdm2, dos sustratos de la vía de Akt, que en neuronas sobrestimuladas incrementa la producción de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, dos factores antiapoptoticos, y la inhibición de p53 y Bax, dos factores proapoptoticos. Observaron además que solo el receptor Tyro3 es responsable de este proceso, al ver que en neuronas carentes de este

receptor no ocurría el proceso, a diferencia de neuronas que carecían de Axl o MerTk, donde seguía sucediendo el mismo (Zhong, Wang et al. 2010).

En el estudio realizado por Guo et al. en 2011, querían estudiar cómo evitar los efectos secundarios que causa el uso de la proteína activadora de plasminógeno (tPA), después de su aplicación en pacientes que han sufrido un accidente cerebro vascular. Entre los efectos negativos de esta terapia destacan el aumento de riesgo de sangrado intracerebral, y daño neurológico si es aplicado entre 3-4 horas después del daño cerebral. La meta era el uso de agentes neuroprotectores, que ayudaran a disminuir la toxicidad en estas importantes células. Utilizaron como factor protector a proteína S, debido a que protege a las neuronas en caso de lesiones por isquemia e hipoxia (Zhong, Wang et al. 2010). Usando cultivos de neuronas, identificaron que la proteína S era capaz de conferir protección a las neuronas, al evitar que se inicie el proceso de apoptosis mediado exclusivamente por el receptor Tyro3. Confirmaron que se activaba la vía de Akt, y que esta fosforilaba FKHRL1, un miembro de los factores de transcripción de la familia, que disminuye la expresión de FASL e inhibe a la caspasa 8, siendo ambos factores proapoptóticos (Guo, Barrett et al. 2011).

Otra vía de señalización de Tyro3 fue identificada mediante el estudio de la transformación de melanocitos en melanomas, una forma agresiva de cáncer de piel. El grupo de investigadores Zhu et al., identificaron al receptor Tyro3 como modulador de la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), el cual controla la expresión de genes importantes para el desarrollo, función y supervivencia de los melanocitos. Los investigadores observaron que Tyro3 favorecía la obtención de la isoforma MITF-M, la cual se expresa principalmente en melanocitos y células de melanoma pigmentadas, mediante la sobreexpresión del factor de transcripción SOX10. Llegaron a esta conclusión, al observar altos niveles de SOX10 en el núcleo de células de melanoma de ratón (B16-F0), cuando el receptor estaba sobreexpresado. También observaron que al inhibir SOX10 mediante siRNA y al no afectar los patrones de Tyro3, se veía una reducción en los niveles de MITF-M (Zhu, Wurdak et al. 2009).

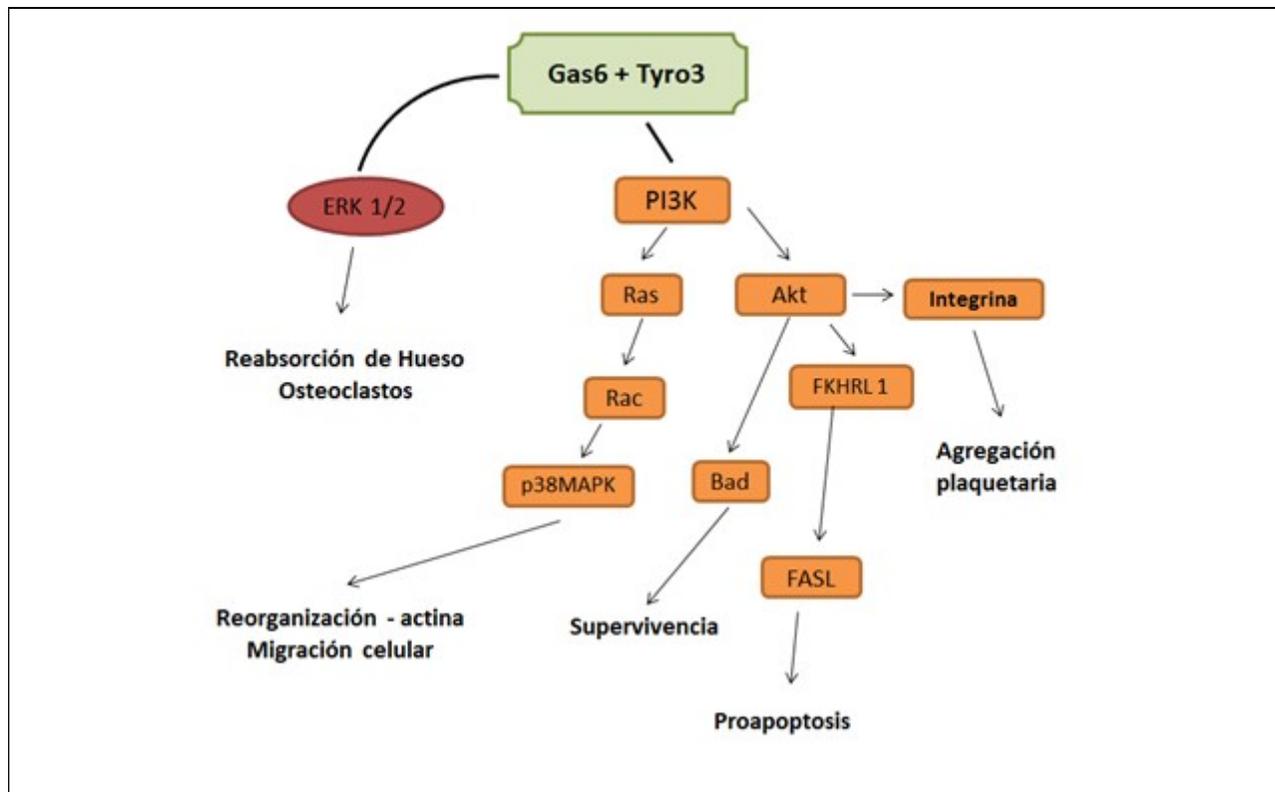


Figura 10. Principales vías de señalización de Tyro3. En este caso se ha descrito la estimulación del receptor por parte del ligando proteína S. En este caso la vía de Akt, al igual que en MerTk y Axl, favorecen la supervivencia celular, pero también activan la vía proapoptótica mediante FASL. La vía de PI3K, al igual que en los receptores hermanos, permite la reorganización de la actina y la migración celular. En este caso aparece una nueva función que es la reabsorción de hueso en los osteoclastos, mediante la vía de ERK ½. El proceso de agregación plaquetaria ocurre igual que en MerTk y Axl, mediante la activación de integrinas a través de Akt. Adaptado de (Linger, Keating et al. 2008).

## El Cáncer

El crecimiento y el desarrollo celular es un proceso delicado y sofisticado, que está regulado cuidadosamente. En organismos jóvenes en desarrollo, la tasa de multiplicación celular excede la de muerte, lo que permite el crecimiento. En individuos adultos se alcanza un estado estable, donde las tasas de muerte y proliferación celular están equilibradas. Dependiendo del tipo celular, su vida media varía, por lo que las tasas de crecimiento y muerte son diferentes. Algunos leucocitos tienen una tasa alta de reposición, mientras que otros como los hepatocitos y neuronas tienen vidas mucho más largas. La regulación de ambos procesos es específica, y eficiente. Cuando alguna célula escapa al delicado proceso de regulación y se desarrolla al margen de las demandas del organismo puede tener consecuencias patológicas, desarrollando lo que se conoce como tumor (Hanahan and Weinberg 2000).

Las masas tumorales suelen aparecer con frecuencia en animales y seres humanos de edad avanzada, y en su mayoría no representan riesgo para el huésped, ya que son pequeñas y localizadas, conociéndose como tumores benignos. Están caracterizados por tener una composición celular similar a tejidos normales, y se comportan como tales. Este tipo de tumor sólo puede llegar a amenazar la vida de los afectados, si su tamaño afecta las funciones normales o si secreta cantidades excesivas de sustancias biológicas como algunas hormonas (Hanahan and Weinberg 2000).

Existe otro tipo de células que forman tumores malignos o cancerígenos, que se caracterizan por una tasa de crecimiento y división superior a las células normales. La mayoría de estos tumores desarrolla la capacidad de invadir tejidos circundantes, el torrente sanguíneo, y finalmente se alojan en tejidos y órganos distantes del sitio de origen, fenómeno conocido como metástasis. Este proceso es de gran relevancia clínica, ya que es el causante del 90% de las muertes por cáncer. La principal diferencia entre los tumores malignos y los benignos es su capacidad de diseminación e invasión (Li, Ye et al. 2009).

Se puede desarrollar cáncer en la mayoría de los aproximadamente 300 tipos celulares, habiéndose identificado aproximadamente 200 tipos diferentes de cáncer. Normalmente las células se clasifican según su origen embrionario, y los tumores siguen esta clasificación: carcinomas si derivan del endodermo o el ectodermo y sarcomas, si provienen del mesodermo. Mientras la mayoría de los tumores crecen como masas sólidas, las leucemias son una clase de sarcomas derivadas de células sanguíneas que se encuentran en suspensión, al igual que los linfomas, que se desarrollan a partir de linfocitos (Hanahan and Weinberg 2000).

En el año 2000 Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000) publicaron un resumen de las características más relevantes del cáncer, en el que destacaron 6 funciones celulares que pueden ser clave para el desarrollo de la enfermedad: vías de señalización de auto-crecimiento, insensibilidad ante señales de inhibición de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial ilimitado de replicación, proceso de angiogénesis sostenida y capacidad invasiva y metástasis. Como hemos visto en las anteriores secciones, el sistema TAM interviene en al menos cuatro de estas funciones (crecimiento, apoptosis, angiogénesis e invasión y metástasis), lo que sugiere que puede tener un papel en el desarrollo del cáncer (Gustafsson, Martuszewska et al. 2009; Li, Ye et al. 2009; Zhu, Wurdak et al. 2009; He, Zhang et al. 2010; Linger, Keating et al. 2010; Rankin, Fuh et al. 2010; Ye, Li et al. 2010; Ou, Corson et al. 2011; Verma, Warner et al. 2011; Korshunov 2012; Linger, Cohen et al. 2012; Mishra, Wang et al. 2012).

Recientemente se ha discutido la ampliación de los 6 parámetros necesarios para el desarrollo del cáncer a 7, con la incorporación de la inflamación tumoral (Schmidt, Ben-Batalla et al. 2012). Se han identificado diferentes tipos de células asociadas a este proceso en pacientes con cáncer, principalmente macrófagos, que junto a las células T componen la mayoría de las células inmunitarias en el microambiente tumoral (Mantovani, Allavena et al. 2008; Grivennikov, Greten et al. 2010; Qian and Pollard 2010). En este proceso inflamatorio, se ha descrito un papel fundamental del sistema TAM. Se ha visto que los macrófagos relacionados con tumores (*tumor associated macrophages*, TAMs), expresan mayores niveles de Gas6 que otros ubicados en otras partes del organismo, como pulmones. En experimentos con macrófagos mutantes para Gas6 (*knockout*), se ha visto una reducida capacidad de estimular la proliferación de células tumorales por parte de estos (Loges, Schmidt et al. 2010). Como indican los autores de

la revisión de Schmidt et al., los macrófagos parecen jugar un papel tipo “ying and yang” en tumores, estimulando la proliferación de células tumorales, y dirigiendo también el sistema proinflamatorio para eliminarlas. Asociado a esto, se ha identificado el rol de Gas6 y el sistema TAM, como promotores de la actividad tumoral por medio de los macrófagos asociados a tumores, aunque aún falta por estudiar los mecanismos asociados a este proceso (Schmidt, Ben-Batalla et al. 2012).

## **Procesos claves para el desarrollo del cáncer**

Las células normales requieren de señales externas de factores de crecimiento para estimular su división que son transmitidas desde el exterior al interior mediante receptores transmembrana. Las células cancerígenas logran alcanzar un estado de crecimiento descontrolado, en parte debido a que no requieren de los estímulos o señales externas. Esto se puede deber a que generan sus propias señales, o a que logran intervenir en el sistema de señalización activando las vías pro mitóticas, de tal manera que consiguen proliferar descontroladamente sin estímulos o amplifican el más mínimo que puedan percibir (Hanahan and Weinberg 2000).

La mayoría de los receptores de señales de crecimiento tienen actividad quinasas, por lo que pudiera considerarse que los receptores TAM pueden actuar como receptores de factores de crecimiento. En el tejido normal existen diversas señales anti proliferativas, que mantienen controlados los mecanismos de proliferación y crecimiento. Funcionan de manera opuesta a los factores de crecimiento descritos anteriormente. El crecimiento puede ser bloqueado por estas señales de dos maneras: o las células son estimuladas para salir del ciclo de proliferación, para entrar en un estado de reposo reversible; o bien pueden renunciar completamente a este, entrando en estados post mitóticos donde las células adquieren rasgos de diferenciación específicos (Hanahan and Weinberg 2000). La habilidad de las células tumorales de expandirse no sólo depende de su capacidad proliferativa, sino también de su capacidad de evitar la vía de muerte programada o apoptosis. Diversos estudios han demostrado que prácticamente todos los tipos

celulares pasan por este mecanismo de regulación. Este proceso depende de dos tipos de componentes celulares: los sensores, y los efectores. De esta manera se detectan e identifican células que por diversos motivos deben morir, y luego pasan al proceso de eliminación (Hanahan and Weinberg 2000).

La suma de los tres procesos anteriores, permitiría pensar que la célula puede replicarse infinitamente si reciben las señales adecuadas, pero esto no es así. Estudios han identificado en células de mamíferos medios de regulación independientes de señales externas, que limitan su multiplicación indefinida (Hanahan and Weinberg 2000). Se han identificado dos vías por las cuales las células pueden replicarse ilimitadamente: mediante el mantenimiento adecuado de la longitud de los telómeros mediante la enzima telomerasa, que garantiza el mantenimiento integro de la información genética (Hayflick 2000); y mediante la evasión del proceso de senescencia celular, que es el mecanismo natural que tienen las células para envejecer y morir, debido acortamiento de telómeros, daños por fármacos, mutaciones, entre otros (Hayflick 1997).

La proliferación y función celular requieren de oxígeno y nutrientes, que son suministrados por el sistema vascular. De igual manera ocurre con las células cancerígenas, en cuyo caso requieren de más sustancias para mantener sus funciones biológicas debido a su agresiva tasa de proliferación. De esta manera los tumores requieren del proceso de angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos, para el mantenimiento de su creciente número de células y su respectiva demanda de nutrientes (Hanahan and Weinberg 2000). Se sabe que el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF), tiene un rol en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Como se presentó en el apartado de activación de los receptores, se ha visto que el complejo Gas6/Axl es capaz de inhibir la función del receptor VEGF, al evitar su activación por parte de su ligando (Gallicchio, Mitola et al. 2005), así como se ha reportado que estimula la fosforilación ligando independiente de Axl por medio de VEGF-A, que a su vez activa la vía de Akt, la cual promueve el proceso de angiogénesis (Ruan and Kazlauskas 2012). Esta es otra evidencia más de como el sistema TAM, puede influenciar el desarrollo del cáncer.

En el último estadio de desarrollo de los tumores, estos adquieren la capacidad de invadir y colonizar nuevos tejidos adyacentes o distantes, lo que se conoce como metástasis. Como en la

formación de la masa tumoral primaria, este proceso requiere de los otros cinco procesos para ser efectivo. Se trata de un proceso complejo, que no se conoce completamente, y que involucra diferentes procesos celulares (Hanahan and Weinberg 2000; Rankin, Fuh et al. 2010; Korshunov 2012; Mishra, Wang et al. 2012). El receptor del sistema TAM más estudiado en este proceso es Axl. Se ha observado su sobreexpresión en células altamente metastáticas (He, Zhang et al. 2010), y se ha observado que este receptor deja de estar regulado por Gas6 bajo condiciones de hipoxia (Mishra, Wang et al. 2012), favoreciendo la proliferación del tumor. También se ha reportado, que el proceso de *shedding* sobre el receptor MerTk, estimula el proceso de formación de endotelio en el tumor, al bloquear a Gas6, el cual inhibe este proceso (Png, Halberg et al. 2012).

Dentro de los procesos claves para el desarrollo del cáncer, se ha estudiado en los últimos 10 años el efecto del proceso inflamatorio en esta enfermedad. Se ha logrado identificar que las células T y los receptores TAM son las células del sistema inmune más abundantes en el microambiente de los tumores. Debido a la plasticidad de los macrófagos, se han clasificados los mismos en M1 y M2, según su efecto proinflamatorio o antiinflamatorio, respectivamente. Los primeros son los responsables de la respuesta inmune tipo I, y son activados por productos microbianos, interferón  $\alpha$  y los receptores tipo Toll (TLR). Son los responsables de liberar altos niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1-6-12-23) y del factor de necrosis alfa de tumor (TNF- $\alpha$ ). Exhiben así un fenotipo proinflamatorio, que permite la respuesta antitumoral, mediante la activación de las células inmunes, y la fagocitosis de las células cancerígenas. Por el caso contrario, los macrófagos M2 son activados por las citoquinas antiinflamatorias T *helper* 2 (Th2), como la IL-4-10-13 e incluso la IL-6. Esto deriva en la regulación negativa de la expresión de MHCII e IL-12, adquiriendo un fenotipo antiinflamatorio. Además expresan citoquinas proangiogénicas, como VEGF y EGF. De esta manera suprimen el proceso inflamatorio, y promueven la remodelación del tejido y la progresión tumoral (Schmidt, Ben-Batalla et al. 2012).

Como se comentó en la descripción del sistema TAM, el mismo puede actuar en modelos proinflamatorios y antiinflamatorios, por lo que su presencia puede favorecer tanto la vía de los macrófagos M1, como la de los M2. A pesar de que se requieren más estudios para definir el rol del sistema TAM en este caso, se ha descrito que los miembros del sistema han tenido un efecto

inmunosupresor y procancerígeno en tumores murinos y humanos, favoreciendo su progresión (Schmidt, Ben-Batalla et al. 2012). La información que se ha ido recolectando sobre este tema sugiere que el sistema TAM tiene un papel importante en la determinación del tipo de respuesta inmunitaria en cáncer.

## **Efecto de Gas6 en cáncer**

A partir de la información expuesta anteriormente sobre las funciones del sistema TAM, es posible pensar que este subgrupo de proteínas tirosina quinasa tiene influencia sobre el cáncer. Por una parte, la implicación de Gas6 en la regulación de la homeostasis celular por su actividad antiapoptótica y mitogénica. De hecho, la vía de Akt activada por la señal de Gas6-Axl es una de las más prometedoras en cuanto a su posible modificación terapéutica en cáncer (Luo, Manning et al. 2003). Por otra, los receptores de la familia de Axl confieren a las células propiedades de adhesión específicas. Además, Gas6 y Axl tienen un papel en la formación de capilares sanguíneos funcionales a través de la diferenciación de pericitos y en la formación de capilares estancos (Collett, Wood et al. 2003; Lutgens, Tjwa et al. 2008).

Finalmente, la participación en la regulación de la inflamación puede ser importante para el desarrollo tumoral. En los últimos 10 años se ha avanzado mucho en el conocimiento del efecto de la respuesta inflamatoria en el cáncer, lo que amplía los conocimientos de esta enfermedad y sus diferentes mecanismos de acción (Coussens and Werb 2002; Schmidt, Ben-Batalla et al. 2012). La metástasis es un proceso que inicia respuestas inflamatorias que son esenciales en los procesos de vascularización y crecimiento del tumor. En este contexto, la función de Gas6 podría ser importante para modular las características de adhesividad, supervivencia, y vascularización de las células metastáticas, así como controlar la respuesta inmunitaria innata. Más adelante en la tabla I, se presentan los tipos de cáncer en donde Gas6 ha sido investigado.

## **Efecto de los receptores TAM en cáncer**

Además de estas evidencias experimentales sobre el papel de Gas6 en procesos implicados en el desarrollo del cáncer, existen abundantes estudios sobre la expresión de Gas6 y sus receptores en este grupo de patologías. Axl, Gas6 y en algunos casos Tyro3 y proteína S se han encontrado en cáncer de pulmón, donde la expresión elevada de Axl se ha asociado con las características altamente metastáticas de ciertos cánceres de pulmón y con las propiedades de adhesión de estas células tumorales (Wimmel, Rohner et al. 1999; Wimmel, Glitz et al. 2001; Nakano, Tani et al. 2003; Vaughan, Singh et al. 2012). Otros estudios han evaluado la expresión de los componentes del sistema Gas6/ProS-TAM en carcinomas de riñón (Chung, Malkowicz et al. 2003); en carcinoma de tiroides (Ito, Ito et al. 1999; Ito, Nakashima et al. 2002), cáncer de mama (Berclaz, Altermatt et al. 2001; Zantek, Walker-Daniels et al. 2001; Meric, Lee et al. 2002); cáncer gástrico (Lin, Li et al. 1999; Wu, Li et al. 2002); cáncer de colon (Craven, Xu et al. 1995) y melanomas (Easty, Ganz et al. 1993; Demarest, Gardner et al. 2013). La expresión de Axl también se ha encontrado aumentada en leucemias, incluyendo leucemia mieloide aguda (Neubauer, Fiebeler et al. 1994; Neubauer, Burchert et al. 1997; Dirks, Rome et al. 1999; Rochlitz, Lohri et al. 1999); , y en leucemias eritro-megacariocíticas, pero en general no en leucemias de origen linfoide. En algunos de estos estudios, la expresión de los receptores de la familia Axl se asociaba significativamente con un peor pronóstico de la enfermedad como por ejemplo en cáncer gástrico y leucemia mielocítica aguda (Lin, Li et al. 1999). Recientemente también se ha asociado una sobreexpresión de Axl y su ligando Gas6, con el desarrollo de schwannomas o tumores de las células de schwann (Ammoun, Provenzano et al. 2013), ampliando el efecto que puede tener este receptor en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

A continuación en la tabla I, se resumen los diferentes estudios sobre la expresión de los receptores y ligando del sistema TAM, en diferentes tipos de cáncer.

<b>Tipos de cáncer</b>	<b>Axl</b>	<b>MerTk</b>	<b>Tyro3</b>	<b>Gas6</b>	<b>Prot. S</b>	<b>Referencia</b>
Adenocarcinoma	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	(Cui, Han et al. 2012; Ishikawa, Sonobe et al. 2012(Gustafsson, Bostrom et al. 2009))
Carcinoma de células renales	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	(Chung, Malkowicz et al. 2003; Gustafsson, Bostrom et al. 2009; Gustafsson, Martuszevska et al. 2009)
Colon	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<u>(Craven, Xu et al. 1995)</u>
Gástrico	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	(Wu, Li et al. 2002; Sawabu, Seno et al. 2007)
Glándula Pituitaria	N.D.	+	N.D.	N.D.	N.D.	<u>(Evans, Young et al. 2001)</u>
Glioblastoma	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	(Vajkoczy, Knyazev et al. 2006; Hutterer, Knyazev et al. 2008)
Hígado	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	(He, Zhang et al. 2010; Xu, Chan et al. 2011)
Leucemias	+	+	+	+	N.D.	(Crosier, Hall et al. 1995; Challier, Uphoff et al. 1996; Brandao, Migdall-Wilson et al. 2011; Dufies, Jacquel et al. 2011)
Leucemias linfoides	N.D.	+	N.D.	+	N.D.	(Graham, Salzberg et al. 2006; Brandao, Migdall-Wilson et al. 2011)
Linfoma de células del manto	N.D.	+	N.D.	N.D.	N.D.	<u>(Ek, Hogerkorp et al. 2002)</u>
Mamas	+	+	N.D.	+	N.D.	(Zhang, Knyazev et al. 2008; Linger, Keating et al. 2010; Mackiewicz, Huppi et al. 2011; Vuoriluoto, Haugen et al. 2011)
Melanoma	+	+	+	+	N.D.	(van Ginkel, Gee et al. 2004; Gyorffy and Lage 2007; Sensi, Catani et al. 2011(Zhu, Wurdak et al. 2009))
Mielomas múltiples	N.D.	N.D.	+	+	N.D.	<u>(De Vos, Couderc et al. 2001)</u>
Mesotelioma	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<u>(Pinato, Mauri et al. 2013)</u>
Osteosarcoma	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	<u>(Russell, Taichman et al.2013,</u>

						<u>Nakano, Tani et al. 2003</u> )
Ovario	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	(Sun, Fujimoto et al. 2004; Macleod, Mullen et al. 2005; Rankin, Fuh et al. 2010)
Próstata	+	+	N.D.	+	N.D.	(Sainaghi, Castello et al. 2005; Shiozawa, Pedersen et al. 2010; Mishra, Wang et al. 2012; Paccez, Vasques et al. 2012)
Pulmón	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<u>(Wimmel, Glitz et al. 2001; Shieh, Lai et al. 2005)(Vaughan, Singh et al. 2012)</u>
Tumores del sistema nervioso (schwanomas, meningiomas, ependioma)	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<u>(Ammoun, Provenzano et al. 2013)</u>
Tiroides	+	N.D.	+	+	N.D.	(Ito, Ito et al. 1999; Ito, Nakashima et al. 2002; Avilla, Guarino et al. 2011)
Uterino	+	N.D.	+	+	N.D.	<u>(Sun, Fujimoto et al. 2003)</u>

Tabla I. Expresión de los receptores TAM en diferentes tipos de cáncer. Con un símbolo (+) se indica la presencia de dicho receptor en las células cancerígenas indicadas en la mayoría de los casos, mientras que N.D. indica que no se ha determinado su presencia en los diferentes tipos de cáncer citados.

## Estudios experimentales del sistema TAM en cáncer

La presencia de Axl en cáncer de próstata ha sido confirmada, así como su sobreexpresión ha sido descrita como factor transformador en algunos tipos de célula. Partiendo de estas afirmaciones, Sainagui et al. querían evaluar el posible efecto que tenía el ligando de Axl, Gas6, sobre la proliferación y supervivencia de líneas celulares de este tipo de cáncer (Sainaghi, Castello et al. 2005). Comprobaron que las líneas celulares DU 145 y PC-3 expresan Axl mRNA, y que Gas6 estimulaba a Axl, al evidenciar la presencia del receptor fosforilado en muestras

donde se ha añadido el ligando. Comprobaron además que la vía de señalización resultante de la estimulación de Axl por Gas6 es la de Akt y MAPK, al evidenciar la presencia de estas proteínas fosforiladas en los extractos celulares. La activación de esta vía de señalización por Gas6 favorece la capacidad proliferativa de las células cancerígenas. Comprobaron también que la ruta que emplea Gas6 para aumentar la supervivencia de las células no es por la vía de inhibición de la apoptosis, ya que no evidenciaron cambios en este proceso cuando se añadía Gas6 exógeno a cultivos células expuestos a privación de factores de crecimiento (Sainaghi, Castello et al. 2005).

Se ha reportado que Axl también está sobreexpresado en la mayoría de las líneas celulares de glioma, siendo los glioblastomas multiformes la forma más común y agresiva de cáncer de cerebro. Además se ha asociado esta característica con un aumento de las propiedades invasivas de las células cancerígenas, así como la supresión de Axl detiene la migración de las células de glioma, en modelos de ratón, así como en muestras patológicas (Vajkoczy, Knyazev et al. 2006; Hutterer, Knyazev et al. 2008). El grupo de Hutterer, investigó la situación de Axl y Gas6 evidenciando que en muestras de gliomas, había expresión de Axl y Gas6 a nivel proteico y de mRNA, y que en muestras de pacientes con glioblastomas multiformes una mayor expresión de Axl y coexpresión de Axl/Gas6 está asociada con una mayor progresión del tumor en el tiempo y una menor supervivencia. Estos investigadores también evidenciaron una alta capacidad migratoria de las células de estos tumores, al observar patrones de movilización en ensayos de inmunohistoquímica con muestras de pacientes de glioma con respecto a Axl. Con este estudio sugirieron que el sistema Gas6/Axl, puede ser un buen blanco para desarrollar nuevas terapias contra el tratamiento de gliomas (Hutterer, Knyazev et al. 2008).

En el año 2009 Zhu et al. no solo identificaron una nueva vía de señalización para Tyro3, como se mencionó anteriormente en el correspondiente apartado, sino que además identificaron como este receptor favorece el desarrollo de cáncer. Vieron como en melanomas malignos, que representan la forma más agresiva de cáncer con 75% de las muertes causadas por cáncer de piel, Tyro3 favorece la expresión de diferentes isoformas del factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF), el cual está involucrado en el desarrollo de melanocitos y osteoclastos, y cuya expresión se encuentra incrementada en melanomas. La isoforma M de MITF puede afectar el desarrollo de los melanocitos al inducir diferentes factores de transcripción, como es el caso de

SOX10. Observaron además en muestras de tejido de melanoma, que al avanzar los estadios de la enfermedad, se obtenían mayores niveles de expresión de Tyro3, en comparación a tejido sano. Un aumento en los niveles del receptor, se correspondían también con altos niveles de MITF-M presente en el mismo tejido. Destacaron que en dichas muestras no se observaron cambios en la expresión de Axl ni MerTk, lo que atribuye a Tyro3 un papel protagónico dentro del sistema TAM en este tipo de cáncer (Zhu, Wurdak et al. 2009). Para comprobar el efecto directo de Tyro3 sobre la proliferación y supervivencia de melanomas, evaluaron el efecto que tenía silenciar el gen de Tyro3 mediante siRNAs sobre líneas celulares de este tipo de cáncer. Observaron una disminuida tasa de proliferación y una mayor sensibilidad a fármacos como cisplatino y docetaxel, aunque no evidenciaron mayores diferencias con el uso de temozolodina (Zhu, Wurdak et al. 2009). Con estos experimentos, los investigadores comprobaron que la sobreexpresión de Tyro3 favorece el desarrollo y proliferación de melanomas, y propusieron que agentes capaces de bloquear su función, pueden ser terapéutico para esta enfermedad.

También en el año 2009, Gustafsson et al. quisieron profundizar en el papel que ejercen Gas6 y Axl en el carcinoma de riñón. Este grupo de investigadores, evidenciaron una relación entre patrones de expresión de Axl y Gas6 y la supervivencia de los pacientes. Observaron que pacientes con altos niveles de mRNA de Axl, presentaban una baja tasa de supervivencia de 25% al final del estudio, mientras que aquellos con bajos niveles del receptor, poseían una tasa de supervivencia del 70%. Incluso cuando estos últimos también poseían altos niveles de mRNA Gas6, la tasa de supervivencia aumentaba un poco más (Gustafsson, Martuszevska et al. 2009). En líneas celulares de carcinoma de riñón (ccRCC 786-O), modulando la expresión de Axl mediante siRNA, y añadiendo Gas6 exógeno, evidenciaron que limitaban la capacidad migratoria de las células, mientras que la presencia o ausencia del receptor, no afectaban los resultados significativamente. Al probar la viabilidad de la línea celular, solo observaron disminución en la misma con la adición de Gas6 al medio, mientras que el bloqueo de Axl no mostró diferencias. En los ensayos de capacidad invasiva, no observaron diferencias al añadir Gas6, ni al bloquear la expresión de Axl (Gustafsson, Bostrom et al. 2009).

La línea celular utilizada por estos investigadores, se caracteriza por no expresar la proteína von Hippel-Lindau (VHL), una proteína supresora de tumores. Incluso al adicionar VHL exógeno a las células estudiadas, los investigadores no evidenciaron mayores diferencias

en la expresión de mRNA de Axl ni de Gas6 con respecto a las células sin estímulo. Pero al analizar subclonajes de las células reconstituidas con VHL, observaron una disminución considerable de la expresión a nivel proteico de Axl, mas no en los niveles de mRNA, a casi la mitad. Al analizar otras líneas celulares de carcinoma de riñón con defectos en VHL, también observaron altos niveles de Axl. Con esto sugirieron entonces que, la pérdida de expresión de VHL permite un aumento en la expresión de Axl. Al añadir Gas6 por 6 horas a la línea celular empleada, observaron una disminución en los niveles de Axl tiempo-dependiente. Con estos experimentos, Gustafsson et al. sugieren que Gas6 puede tener un papel protector en la enfermedad, mientras que no identifican un papel claro de Axl en la disminución de la tasa de supervivencia de la enfermedad. Los autores sugieren que el efecto de Axl como factor protumoral se ve potenciado por la ausencia de VHL en las células de carcinoma de riñón (Gustafsson, Bostrom et al. 2009).

Usando un modelo de ratón mutante para Gas6 (Gas6 *-/- knockout*), los investigadores Loges et al., querían estudiar el papel que desempeña esta proteína en cáncer y ayudar a elucidar el efecto de Gas6 sobre leucocitos, los cuales pueden jugar un rol importante en la progresión tumoral. Como se comentó anteriormente, se ha visto que los macrófagos pueden jugar un papel determinante en los tumores, al promover o suprimir su desarrollo, según su fenotipo M2 o M1 respectivamente (Mantovani and Sica 2010). Debido a que Gas6 se expresa en las células hematopoyéticas (Avanzi, Gallicchio et al. 1997), querían evaluar el posible efecto de Gas6 en modular la progresión de tumores. En los experimentos con diferentes modelos de tumor en ratones, describieron que aquellos que carecían de Gas6 mostraban una reducción en la tasa de progresión y metástasis tumoral de entre un 35% y 55%. En estudios *in vitro*, con dosis exógenas de Gas6 recombinante, observaron que esta proteína favorecía la progresión de las células tumorales. Mediante el análisis de varias citoquinas y su efecto en la producción de Gas6 en macrófagos diferenciados, observaron que IL-10 y M-CSF estimulaban la producción del ligando. Por último, confirmaron el papel que juega Gas6 en la progresión de tumores en ratones. Practicaron el trasplante de médula ósea sana, a ratones Gas6 *knockout*, y evidenciaron un crecimiento del tumor asociado a la recuperación de la producción de esta proteína en leucocitos infiltrados en las zonas intratumorales (TAMs). En el caso contrario, cuando trasplantaron medula ósea de ratones Gas6 *knockout* a ratones silvestres, observaron una reducción en la tasa de crecimiento tumoral. Estos autores también fueron los primeros en evidenciar que la ausencia

de Gas6 no limita el proceso de angiogénesis en estadios sanos o de enfermedad (Loges, Schmidt et al. 2010).

En el año 2010 Gjerdum et. al, analizaron presencia de Axl en cáncer de mamas, y observaron que éste está asociado a un mal pronóstico, y que además su expresión es más elevada en tumores metastáticos que en carcinomas de mamas primarios. Al estudiar el papel de Axl en la capacidad invasiva de líneas celulares de cáncer de mama, observaron que este es muy importante, al ver como este proceso se veía disminuido cuando el receptor era bloqueado mediante shRNA. Analizaron la influencia de factores pro EMT en el aumento de expresión de Axl, al inducir la expresión de estos en células (MCF10A) mediante construcciones retrovirales. Observaron también, que células que expresan factores de transcripción en la transición epitelio-mesenquima (EMT) tenían altos niveles de Axl. Por último, los investigadores evaluaron el efecto de Axl en la capacidad de desarrollar metástasis, al inyectar ratones con células tumorales y con células tumorales que no expresaban Axl, mediante el uso de shRNA. Durante las nueve semanas que duro el experimento, no evidenciaron metástasis en los ratones con las células tumorales mutadas, mientras que si en aquellos sin mutación de Axl. También evidenciaron una menor tasa de crecimiento tumoral en los ratones con las células tumorales Axl *knockout*, pero las mismas formaron al final grandes tumores primarios, al igual que sus homólogos (Gjerdrum, Tiron et al. 2010). Esta es una importante investigación, donde se evidencio el importante efecto que tiene Axl, sobre el diagnóstico y la progresión del cáncer de mamas.

## **El proceso de metástasis**

El proceso de metástasis se describe como el último estadio de desarrollo del cáncer, donde las células tumorales se expanden del órgano o tejido de origen, y colonizan órganos distantes, usando el sistema sanguíneo y linfático como medio de expansión. Es uno de los procesos cancerígenos más difíciles de estudiar, debido a que un número reducido de células participa en él, sumado a la dificultad de poder tener acceso a los sitios anatómicos donde ocurre el proceso. Este mecanismo de expansión del tumor requiere de una serie de procesos celulares de invasión-migración, además de que las células involucradas deben ser capaces de proliferar,

sobrevivir y adherirse al nuevo tejido invadido. Solo un número pequeño de células tumorales tienen esta capacidad, por lo que el proceso es generalmente ineficiente e impredecible (Sahai 2007). Para entender este proceso, es crucial el conocimiento de los mecanismos por los cuales las células salen del tumor primario, logran invadir el sistema linfático y sanguíneo, y posteriormente invaden nuevos tejidos.

### **El efecto de Gas6 y Axl en la metástasis**

De los tres receptores pertenecientes al sistema TAM, Axl es el que ha sido más estudiado en este proceso. El efecto de la sobreexpresión del receptor en diferentes tipos de cáncer, lo convierte en un buen candidato para el estudio de su efecto en la metástasis. Se ha demostrado su efecto a favor de este proceso en estudios con células de hepatocarcinoma de ratón (He, Zhang et al. 2010). En este caso evidenciaron que células cancerígenas con alta capacidad metastática, contenían mayores niveles de Axl, que aquellas que se caracterizaban por tener menor capacidad metastática. Estas observaciones las llevaron a cabo mediante el estudio del perfil de expresión génica de Axl de ambas líneas celulares (Hca-F y Hca-P). Incluso llegaron a reducir la capacidad migratoria y proliferativa de las células con alta tasa de metástasis, mediante el uso de siRNA dirigidos a bloquear este receptor (He, Zhang et al. 2010). Este estudio sugiere así, que Axl tiene un papel importante en el proceso de metástasis del hepatocarcinoma de ratones.

En el mismo año 2010, Gjerdrum et al., investigaron el proceso de metástasis mediante el mecanismo de transición epitelio-mesenquima (EMT), que permite a las células endoteliales convertirse en células migratorias. En dicho proceso las células alteran su perfil de expresión genética, disminuyendo los mecanismos que permiten su adhesión a otras células, y favoreciendo cambios en el citoesqueleto que facilitan su movilidad y migración. Debido a la alta tasa de metástasis del cáncer de mamas, y la expresión de Axl en tejido embrionario, decidieron estudiar el efecto de este receptor en cáncer de mamas (Gjerdrum, Tiron et al. 2010).

En el caso de la metástasis en el cáncer de ovario de humanos, se observó que Axl no se expresaba en el epitelio de la superficie del ovario, mientras que en tumores en el primer y

segundo estadio de desarrollo, presentaban una tinción positiva para la presencia del receptor en un 73% de los casos en este tejido (Rankin, Fuh et al. 2010). Esto demuestra una diferencia significativa entre el tejido sano y el cancerígeno, y sugiere un efecto de Axl en el desarrollo de la enfermedad. Este equipo quiso estudiar con esto el posible efecto que podía tener el bloqueo del receptor, en el progreso de la metástasis. Para ello usaron ratones inmunosuprimidos inoculados con células metastáticas SKOV3ip.1, y tratados con Axl soluble mediante un sistema de adenovirus, que estimulaba la producción de este fragmento del receptor en el hígado con el fin de secuestrar al ligando (Gas6) en plasma y evitar así la estimulación del receptor. Con este experimento no solo evidenciaron una disminución en la invasión de otros tejidos por parte de las células tumorales, sino que además observaron una disminución del tamaño y número de los tumores (Rankin, Fuh et al. 2010).

En un estudio sobre el comportamiento de Gas6 y Axl en cáncer de próstata bajo condiciones de hipoxia, se reveló que el receptor deja de estar regulado por su ligando en este caso, favoreciendo la sobreexpresión del receptor. Se propone además, que en estas regiones se inicia y se favorece el proceso de migración e invasión de las células tumorales, permitiendo la metástasis. Se demostró también, que Gas6 tiene un efecto supresor sobre la expresión de Axl, y que este proceso se revierte en ambientes hipóxicos (Mishra, Wang et al. 2012).

Recientemente los investigadores Png et al. estudiaron el efecto que tenía un pequeño fragmento de RNA o microRNA (miRNA), descubierto por ellos, en el proceso de metástasis tumoral, concretamente el del miR-126. Observaron que la implantación de células de cáncer de mama con la variante *knockout* de este fragmento de RNA en ratones inmunosuprimidos, aumentaba significativamente la colonización metastática de los pulmones, cerebro, entre otros, mientras que las variantes de las células sin modificar, mientras que no se observaba un aumento significativo en la proliferación *in vitro* de las células, ni en el volumen de los tumores mamarios. En las células tumorales sin la inhibición de miR-126, observaron menor invasión en órganos y tejidos por parte de las células tumorales, y un menor número de nódulos metastáticos. Al restablecer la expresión de miR-126 en células metastáticas trasvasadas al pulmón, disminuía la capacidad de las mismas de colonizar nuevos tejidos. Estos primeros experimentos sugirieron que este fragmento de RNA suprime el inicio del proceso de metástasis y de colonización (Png, Halberg et al. 2012). Siguiendo con sus estudios, observaron que aquellas células metastáticas

con la variante miR-126 *knockout*, presentaban mayor densidad de vasos sanguíneos en zonas de los pulmones, que las células controles, indicado por la mayor densidad de células endoteliales. Al realizar un estudio de transcripción, para evaluar el efecto que tiene miR-126, observaron que la expresión de 8 genes era suprimida. Observaron que aquellos pacientes que mostraban sobreexpresión de estos genes, tenían mayor posibilidad de desarrollar metástasis. Dentro de estos genes se encontraba *MERTK* (Png, Halberg et al. 2012). Los investigadores observaron que el *knockout* de *MERTK*, en líneas celulares metastáticas de pulmón, suprimió la capacidad de estas de reclutar células endoteliales, mientras que su sobre expresión produjo el resultado contrario. Sin embargo observaron que el bloqueo de este gen, no disminuía la proliferación de las células cancerígenas. Notaron además que la expresión de MerTk en tejido tumoral era mayor en aquellos pacientes en estadios III y IV, que en aquellos en I y II. Con esto concluyeron que miR-126 tiene efecto sobre la expresión de *MERTK*, y que este gen es requerido para el reclutamiento endotelial y la colonización metastática. Observaron que la adición de Gas6, potenciaba el efecto de miR-126 al reducir el reclutamiento de células endoteliales *in vitro*. Observaron que la formula soluble de MerTk estaba presente en cultivos de células metastáticas, y que su concentración aumentaba con la inhibición de miR-126. Partiendo de este resultado, los investigadores propusieron que el *shedding* del receptor favorecía el reclutamiento de células endoteliales, al unirse e inhibir a Gas6. También observaron que la adición de Gas6 recombinante al medio, reducía el reclutamiento de células endoteliales por parte de las líneas celulares metastáticas. Y que la supresión de *MERTK* por parte de miR-126, reduce el efecto que tiene Gas6 en reducir el reclutamiento de células endoteliales (Png, Halberg et al. 2012).

Estos son los experimentos más relevantes, que sustentan la idea de que el sistema Gas6/TAM juega un papel muy importante en el proceso de metástasis y que además pudiera ser utilizado como blanco terapéutico, para aumentar la esperanza de vida de las personas que padecen esta enfermedad.

## **El cáncer de Colon**

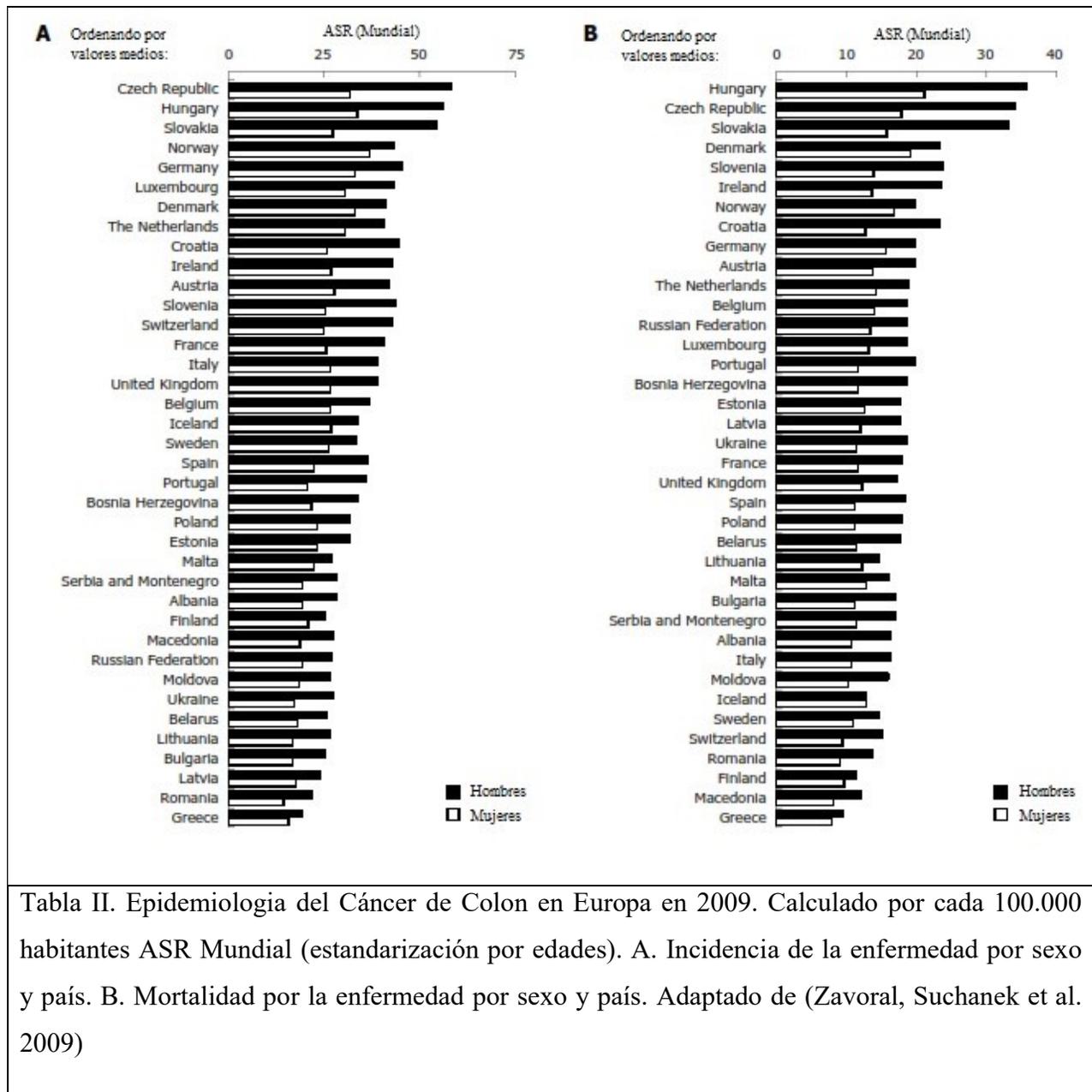
El cáncer de colon es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células o neoplasia, en el colon, recto y apéndice intestinal. Se cree que su desarrollo se inicia a manera de adenoma, que es un tumor benigno que estructuralmente se asemeja a una glándula (pólipo de colon), y con el paso del tiempo se desarrolla como masa tumoral.

### Incidencia

A nivel mundial es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia, y el cuarto en tasa de mortalidad, registrándose en 2008 1.2 millones de casos nuevos y 609.000 muertes. Según proyecciones poblacionales, la incidencia de esta enfermedad podrá aumentar en un 80% hasta los 2.2 millones de nuevos casos anuales (Jemal, Bray et al. 2011).

En Europa se diagnostican cada año más de 400.000 casos nuevos de cáncer de colon, el 13,6% de todos los casos de cáncer, y se registraron más de 207.000 muertes por esta enfermedad en el año 2009 (Zavoral, Suchanek et al. 2009). La enfermedad afecta principalmente a personas entre los 60 y los 74 años de edad en un 60% de los casos. Afecta más a hombres que a mujeres, y aproximadamente en un 80% más a caucásicos que a otros grupos étnicos (Chagpar, Xing et al. 2012). La mayoría de los pacientes suelen sucumbir por el proceso de metástasis que sufre el tumor al hígado (McLeod and Murray 1999).

En la siguiente tabla II se presentan los valores de incidencia y mortalidad por cáncer de colon en la comunidad Europea en el año 2009:



### Estadios de desarrollo: diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico típico de esta enfermedad es mediante colonoscopia, tomando siempre una muestra del tejido sospechoso para un análisis de su composición celular. Un diagnóstico oportuno, puede derivar en una cirugía, que puede resultar en la cura del paciente en un 90% de los diagnósticos (Instituto Nacional para la Salud, NIH USA). Tumores en regiones cercanas también pueden ser diagnosticados mediante técnicas de imágenes como la tomografía computarizada en el caso de carcinoma renal.

Hoy en día se están concentrando esfuerzos para lograr un diagnóstico prematuro a nivel genético efectivo contra el cáncer de colon. Se ha calculado que la heredabilidad de la enfermedad ronda el 35%, lo que sugiere que factores externos o ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Diferentes estudios han atribuido diferencias en los loci 8q24, 11q23 y 15q13 en americanos de ascendencia europea, y en los loci 8q24 y 20p12 en Afroamericanos, un aumento en el factor de riesgo para desarrollar cáncer de colon (He, Wilkens et al. 2011). Aún falta información para poder llegar a un diagnóstico más preciso a nivel genético de esta enfermedad.

El tratamiento básico de la enfermedad es mediante la práctica de cirugía, extirpando el tumor, seguido de quimioterapia y radioterapia según el estadio de la enfermedad (Chagpar, Xing et al. 2012). Para un diagnóstico y tratamiento más efectivo, el cáncer se ha estratificado en cuatro estadios básicos que se presentan a continuación:

#### Estadio 0.

En este estadio se hayan células anormales en las membranas más internas del recto. Estas células anormales pueden desarrollarse en cáncer, e invadir el tejido normal circundante. Esta fase también es conocida como carcinoma *in situ*. En este caso el tratamiento típico es quirúrgico, ya que las células se encuentran localizadas.

#### Estadio I

En este caso ya el cáncer se ha formado y ha atravesado diferentes capas de membrana, hasta alcanzar la capa interna del recto, pero no ha atravesado la capa más externa o la parte exterior del recto. Este estadio se conoce como A de Dukes. El tratamiento propuesto para este estadio es quirúrgico. Si el cáncer es intervenido en este paso, se tiene un 90% de posibilidades de cura y supervivencia más allá de 5 años.

## Estadio II

En esta fase el cáncer se ha extendido a la parte externa del recto, y ha invadido otros tejidos. En esta etapa no se han invadido los nódulos linfáticos. Este estadio corresponde a la fase B de los estadios de Dukes. Aquí se sugiere igualmente la práctica de una cirugía para extirpar las células tumorales si el tumor es de bajo riesgo, mientras que si ya se clasifica como de alto riesgo, la cirugía debe estar acompañada de quimioterapia. La probabilidad de sobrevivir en este estadio bajo el tratamiento adecuado es de un 70% aproximadamente, un poco menor que en el estadio anterior.

## Estadio III

En el presente estadio el cáncer se ha extendido hasta los nódulos linfáticos, pero no ha invadido otras partes del cuerpo. El protocolo de tratamiento en este caso incluye cirugía y quimioterapia en conjunto. Si los afectados son tratados en este estadio, los pacientes tienen una probabilidad aproximada del 50% de sobrevivir más allá de 5 años. Este estadio también es conocido como el estadio C de Dukes.

## Estadio IV

En esta última etapa el cáncer ha realizado el proceso metástasis, y se ha extendido a otros órganos y tejidos como el hígado, pulmones, ovarios. En este caso se sugiere el tratamiento con quimioterapia, y dependiendo de la extensión del tumor se puede practicar una cirugía. Los que padezcan esta enfermedad en este punto, tienen un 7% de probabilidad de sobrevivir más allá de los 5 años si son tratados. Esta última fase también se conoce como el estadio D de Dukes.

Debido a los estudios que se han expuesto anteriormente, se formuló la hipótesis de que Gas6 y los receptores TAM pudieran tener un efecto en el cáncer de colon. La disponibilidad de diferentes tipos de muestras de pacientes de colon, obtenidas del Instituto Catalán de Oncología Cáncer (ICO), permitió la realización de dichos experimentos.

## Lupus

El lupus es una enfermedad autoinmune sistémica compleja, que afecta diversidad de órganos, especialmente la piel, las articulaciones, los riñones y la sangre. Se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos contra diferentes nucleoproteínas. El término Lupus Eritematoso fue introducido por primera vez por Cazevane en el siglo XIX para describir las lesiones en la piel características de esta enfermedad. Poco después fue descrita como una enfermedad sistémica, y no únicamente dermatológica por Kaposi (Smith and Cyr 1988; Mevorach 2003).

Debido a su baja prevalencia en la población, el lupus es una enfermedad considerada rara. En Europa puede afectar a 1 de cada 2500 personas, aunque es más frecuente en aquellos de raza no europea, sobre todo afro-americanos, hispanos, y nativos americanos. Afecta más a mujeres en edad fértil que a hombres, en una proporción de 9 a 1 (Guerra, Vyse et al. 2012). Las personas más susceptibles de manifestar la enfermedad tienen entre 15 y 35 años, pudiendo sufrir varios episodios sintomáticos a lo largo de la vida. Los pacientes pueden experimentar periodos de manifestación de la enfermedad con diferentes intensidades, y periodos sin síntomas o signos de la enfermedad (Maidhof and Hilas 2012).

## Tipos de Lupus

Existen principalmente cuatro tipos de lupus:

Neonatal o lupus eritematoso pediátrico (NLE): es una forma rara de lupus que se presenta en neonatos. Se cree que su desarrollo parte del paso de anticuerpos de la madre al hijo a través de la placenta. La enfermedad solo se desarrolla en el 1-2% de los casos que presentan auto anticuerpos maternos. Presentan comúnmente problemas cardiacos, en el hígado y piel. En algunos casos los síntomas y signos desaparecen espontáneamente después de entre 4 y 6 meses (Hon and Leung 2012).

Lupus eritematoso discoideo (DLE): se manifiesta como una dermatitis crónica fotosensible, que puede desarrollarse en lupus eritematoso sistémico, o ser parte de los síntomas de ésta. Se cree que su origen es genético, ya que afecta principalmente a mujeres afro-americanas, entre 15 y 35 años de edad. El diagnóstico se realiza mediante biopsia del tejido que presenta erupciones. Su tratamiento se basa en el uso de bloqueadores solares, corticoides y agentes antimaláricos para prevenir y controlar las manifestaciones clínicas (Prystowsky and Gilliam 1975; Maidhof and Hilas 2012).

Lupus inducido por fármacos (DIL): se manifiesta por el uso de drogas que desarrollan una respuesta autoinmune. Pueden llegar a reportarse entre 15000 y 30000 casos de este tipo de lupus al año en Estados Unidos de América, representando aproximadamente un 10% de todos los casos diagnosticados. Se pueden ver afectados diferentes órganos, y su manifestación suele desaparecer al detenerse el uso de la droga responsable como son procainamida, hidralazina, penicilamina, quinidina, minociclina, isoniazida, metildopa, fármacos anti TNF, entre otras. Se han identificado más de 80 drogas que favorecen el desarrollo de este tipo de Lupus, y su número sigue aumentando (Vedove, Del Giglio et al. 2009; Dalle Vedove, Simon et al. 2012; Maidhof and Hilas 2012).

Lupus eritematoso sistémico (SLE): es el tipo de lupus más común. Se diferencia de los demás casos ya que se manifiesta en diferentes órganos. Se diagnostican aproximadamente 100 personas con SLE por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos de América. En el 50% de los casos más graves, los enfermos presentan problemas renales desarrollando nefritis, siendo éstos los casos con peor pronóstico (D'Cruz, Khamashta et al. 2007; Maidhof and Hilas 2012).

## **Diagnóstico del lupus**

El diagnóstico y evaluación de la actividad de la enfermedad, son necesarios para un tratamiento oportuno y efectivo. Existen dos puntos importantes, que mantienen a investigadores y médicos en constante búsqueda y mejora de los medios de evaluación del lupus. La naturaleza multifactorial de la enfermedad y sus episodios de manifestación, y la ausencia de un estándar

único, que permite su evaluación, así como la ausencia de un biomarcador efectivo y específico, han dificultado el diagnóstico del lupus. Existen dos tipos de medición de la actividad de lupus: sistemas de evaluación global de la actividad de la enfermedad, como en el caso del Consenso Europeo de medición de la actividad de lupus (ECLAM), y el índice de actividad de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (SLEDAI); y un sistema de evaluación individual sistema/órgano, como el caso del clásico grupo de evaluación de Lupus de las islas Británicas (BILAG) (Romero-Díaz, Isenberg et al. 2011).

El índice SLEDAI fue desarrollado en Canadá, y tiene 24 componentes de los cuales 16 son clínicos, y los 8 restantes se basan en análisis de laboratorio: orina, hematuria, proteinuria, piuria, disminución de componentes del complemento, aumento de la unión a DNA, trombocitopenia y leucopenia. Una manifestación es registrada si se han presentado síntomas en los últimos 10 días, sin importar su severidad y si los mismos han empeorado o mejorado. Una calificación de  $\geq 6$ , es consistente con la manifestación activa de la enfermedad requiriendo tratamiento (Bombardier, Gladman et al. 1992; Yee, Isenberg et al. 2008). Después de su implementación se vio que este índice destaca la aparición recurrente o nueva de manifestaciones clínicas, y no evalúa correctamente los síntomas constantes. Debido a esto, el sistema de evaluación se sometió a revisión y modificación dando origen al índice SLEDAI-2000 (Gladman, Ibanez et al. 2002). Este último genera una puntuación global de la enfermedad que va de 1 a 8. Hoy en día se utiliza más comúnmente el índice SLEDAI original, ya que el segundo no ha podido ser validado del todo (Yee, Isenberg et al. 2008).

Perteneciendo al mismo grupo del índice de evaluación anterior se encuentra el sistema ECLAM. Permite evaluar la actividad de la enfermedad a lo largo del último mes. La actividad del lupus es dividida en 10 órganos/sistemas, además de la velocidad de sedimentación glomerular. Su evaluación se basa en la evolución de los cambios en las manifestaciones clínicas, y evalúa 33 criterios de la enfermedad. Su escala de evaluación va de 0 a 17.5. El problema que tiene este método, es que no detecta cambios en la severidad de la enfermedad a lo largo del tiempo (Romero-Díaz, Isenberg et al. 2011). Este índice es usado por su simplicidad en la evaluación de los pacientes, y porque está basado en 12 de los parámetros más conocidos de la actividad de la enfermedad.

El índice BILAG fue desarrollado con la intención de curar la enfermedad por parte de los médicos, al permitir seguir la variación de las manifestaciones clínicas. Tiene una organización ordinal por escalas, y no posee un índice global de la enfermedad (Hay, Bacon et al. 1993; Isenberg, Rahman et al. 2005). A lo largo de su utilización se identificaron varias deficiencias por miembros del BILAG, por lo que sometieron al índice a una revisión extensiva, dando origen al sistema BILAG-2004. Se basa en una escala de evaluación de 9 sistemas: constitucional, mucocutáneo, neuropsiquiátrico, gastrointestinal, oftalmológico, renal y hematológico. Evalúa la actividad de la enfermedad en las últimas 4 semanas, y categoriza la enfermedad en 5 niveles, de la A a la E. El grado A representa el mayor índice de actividad de la enfermedad, haciendo necesario el uso de inmunosupresores. El grado B una actividad moderada de la enfermedad, sugiriendo el uso de bajas dosis de corticoides, esteroides tópicos, inmunosupresores tópicos, anti-maláricos o drogas no esteroideas antiinflamatorias. El grado C indica un estadio medio, mientras el D indica que no hay manifestación de la enfermedad pero que si ha habido episodios de manifestación anteriormente. Por último el grado E indica que no se presenta ni se ha manifestado la enfermedad anteriormente (Yee, Isenberg et al. 2008).

El Colegio Americano de Reumatología (ACR) también posee un índice de evaluación de pacientes con lupus, el cual no es el más ampliamente utilizado. En 1997 se realizó una revisión de los criterios de evaluación de SLE de este gremio, desarrollado en 1982. En este caso si el paciente da positivo a 4 o más de los siguientes 11 criterios de evaluación, se puede diagnosticar Lupus en estos pacientes con 95% de especificidad y un 85% de sensibilidad (Maidhof and Hilar 2012). Los 11 criterios propuestos para el diagnóstico del lupus por el Colegio Americano de Reumatología son: enrojecimiento en las mejillas (sarpullido de la mariposa); sarpullido discoidal. Se evidencia como sarpullido en forma de ovalo en áreas expuestas al sol; Serositis o pericarditis (inflamación de la membrana alrededor de los pulmones y el corazón respectivamente), úlceras orales, artritis, fotosensibilidad, desórdenes hematológicos, desórdenes hepáticos, presencia de auto anticuerpos, identificación de algún desorden inmunológico, presencia de algún desorden neurológico como convulsiones y psicosis.

Se han realizado diferentes estudios comparativos entre el índice SLEDAI y el BILAG, con el fin de poder establecer un criterio único, que sea efectivo para diagnosticar correctamente

la enfermedad. Al parecer el sistema SLEDAI-2000 es el menos eficiente para la identificación de la actividad de la enfermedad requiriendo tratamiento, comparado con el BILAG-2004 que evalúa 97 factores vs 24 del primero. El sistema SLEDAI-2000 falla en la identificación de algunas manifestaciones clínicas como neuropatía periférica, mielopatía, alveolitis intestinal y anemia hemolítica. Tampoco permite evaluar una mejoría o empeoramiento de los síntomas, ya que solo evalúa su presencia o ausencia (Yee, Isenberg et al. 2008). Por esta razón Yee y col., que evaluaron estos dos índices de evaluación de la enfermedad, prefieren el sistema BILAG-2004 sobre el SLEDAI-2000 para el diagnóstico del lupus.

Hoy en día se practican exámenes de laboratorio, en donde se analiza la presencia de anticuerpos antinucleares (ANAs). Este procedimiento también se utiliza de manera rutinaria para el diagnóstico de otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. Esta técnica permite identificar problemas a nivel inmunológico. Los anticuerpos más estudiados de este grupo, son aquellos que reconocen directamente el DNA, los cuales están presentes en un 70% de los casos de lupus diagnosticados. Para un diagnóstico efectivo, éste debe estar apoyado por otras técnicas como estudios dermatológicos y hemolíticos.

## **Tratamientos actuales**

A continuación se presenta la tabla III con un resumen de los principales tipos de medicamentos, su mecanismo de acción y efectos adversos de los mismos, utilizados para tratar el lupus. Ninguno de estos tratamientos cura en totalidad a los afectados con la enfermedad, pero reducen sus síntomas. De estos tratamientos destaca belimumab, que fue aprobado por la FDA en marzo de 2011, y que es la primera droga aprobada contra la enfermedad en 56 años, cuando aprobaron hidroxiclороquina y corticosteroides para el tratamiento (Maidhof and Hilas 2012).

Tipo de Droga	Drogas utilizadas	Mecanismo de acción	Efectos adversos
NSAIDS Drogas antiinflamatorias no esteroideas		Bloquea la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de enzimas ciclooxigenasa. Produce efectos anti-inflamatorios, analgésicos y antipiréticos	Irritación y sangrado gastrointestinal, toxicidad renal y hepática, hipertensión
Anti-maláricos	Hidroxicloroquina	Parecen intervenir en la activación de los linfocitos T, e inhibir receptores similares a Toll	Debilitamiento muscular
Esterocorticoides	Prednisona y Metilprednisolona IV	Diversos efectos sobre el sistema inmune. Bloquea la activación de citoquinas, inhibe las interleuquinas y TNF	Aumento de peso, hipertensión, hiperglicemia, osteoporosis, cataratas, debilitamiento muscular, aumenta riesgo de infección y glaucoma
Inmunosupresores	Ciclofosfamida, Azatiopina, Micofenolato	Diversos efectos supresores del sistema inmune. Disminuye la proliferación de células B y T, ruptura de DNA y RNA	Toxicidad hepática, disfunción renal, infertilidad, aumenta riesgo de infección y cáncer
Anticuerpos monoclonales	Belimumab IV	Inhibe la supervivencia de células B y reduce su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos.	Nauseas, diarrea, nasofaringitis, insomnio, migrañas, gastroenteritis, diversas infecciones

Tabla III. Medicamentos comúnmente utilizados para el tratamiento del lupus, sus mecanismos de acción y efectos adversos. Adaptado de (Maidhof and Hilas 2012).

## Posibles causas de la enfermedad

A pesar de que ha aumentado el interés mundial por esta enfermedad y su estudio, el origen y la biología de la misma no se conocen con detalle. Aun así, se han descubierto factores tanto genéticos como ambientales que favorecen su manifestación.

## **Factores genéticos**

A nivel genético se ha identificado una mayor susceptibilidad entre personas emparentadas, calculándose una heredabilidad del 66%, y una tasa de concordancia de entre 24-56% en gemelos monozigóticos, y de entre 2-4% en gemelos dizigóticos. Incluso en un estudio realizado en hijos de madres con lupus, se detectaron ANAs que en 27% de 195 casos, aunque no hubieran desarrollado la enfermedad todavía (Murashima, Fukazawa et al. 2004). Diferentes estudios de asociación genética, han identificado más de 30 loci implicados en la enfermedad. La mayoría de estos loci están asociados a diferentes mecanismos celulares, entre los que destacan la apoptosis, la respuesta inmune innata, la ubiquitinación y la fagocitosis (Guerra, Vyse et al. 2012). Se ha observado que variantes en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) y de los receptores Fc $\gamma$ R, muestran predisposición a desarrollar SLE (Deng and Tsao 2010).

En los procesos de fagocitosis, una de las mutaciones más influyentes se da en el locus *ITGAM*, del gen de la integrina M alfa. En los estudios de asociación genética, observaron una mayor asociación con la enfermedad en el polimorfismo (SNP) rs9888739 (T). También se han visto modificaciones en el locus Fc $\gamma$ R de los genes de los receptores Fc $\gamma$ , que reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas G, en concreto polimorfismos en *FCGR2A*, *FCGR2B*, y *FCGR3A* con SLE (Guerra, Vyse et al. 2012).

Se ha descrito que la ubiquitinación regula factores de transcripción, y la actividad de quinasas intracelulares. Se han observado cambios genéticos relacionados con este proceso, que se asocian con la enfermedad. En el locus *TNFAIP3* del gen de la proteína de inducción del factor de necrosis tumoral, que codifica la enzima A20 que modifica los patrones de acción de la ubiquitina, que a su vez luego modifica los objetivos de degradación proteómica y la finalización de la respuesta pro-inflamatoria del factor kappa-B nuclear (NF- $\kappa$ B). Se ha asociado este locus con diferentes enfermedades autoinmunes, siendo la variante rs2230926 (C) la que ha mostrado mayor asociación con SLE (Deng and Tsao 2010).

En el lupus se ha observado que los linfocitos T tienen una inapropiada migración tisular, un incremento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, y activación de células dendríticas (DC) y de linfocitos B. Entre los loci relacionados con SLE, se han identificado *ETSI* y *IKZF1*. Son factores de transcripción que regulan el desarrollo y diferenciación de los linfocitos. El primero ha sido relacionado con una regulación negativa de la diferenciación de las células B y de la proliferación de células T coadyuvantes (*helper*) 17 ( $Th_{17}$ ). En este caso los pacientes de SLE mostraron bajos niveles de *ETSI*, lo que debe producir una diferenciación anormal de las células B a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina, y a que haya un aumento de células  $Th_{17}$ , lo que aumenta la inflamación. La variante de este locus con mayor asociación con SLE es la rs6590330 (A). En cuanto a *IKZF1*, se ha observado que en pacientes con lupus, existen bajos niveles de la misma en los linfocitos de la sangre periférica. Este factor es importante para la diferenciación de los linfocitos, así como se ha visto asociado con la activación de *STAT4*, que es otro locus de riesgo para SLE. La variante con mayor asociación con SLE en este gen, es la rs4917014 (C) (Guerra, Vyse et al. 2012).

Se ha visto que la región del MHC tiene la mayor asociación genética con esta enfermedad. Estudios han implicado los locus de HLA-DRB1\*3:01 y HLA-DRB1\*15:01 con SLE. Este complejo está formado por 250 genes, divididos en 3 clases (I, II y III). Se han observado diferentes cambios en este grupo de genes de MHC en lupus, que están relacionadas con cambios en esta región del genoma. La variante más significativa asociada con la enfermedad es la rs3135394 (G), llegando a tener un valor  $p < 2.8 \times 10^{-60}$  (Guerra, Vyse et al. 2012).

### **Factores hormonales**

Se ha planteado que las hormonas también puedan tener algún efecto en el desarrollo de la enfermedad. Esta idea parte de una mayor manifestación de la enfermedad en mujeres, sugiriendo que estrógenos, progesterona, testosterona y prolactina puedan tener un efecto sobre la enfermedad. Incluso se ha podido identificar que hombres que padecen el síndrome de Klinefelter, que poseen un cromosoma X adicional, tienen 14 veces más incidencia de SLE

(Scofield, Bruner et al. 2008). A pesar de las pruebas que apoyan esta idea, aun no se han realizado estudios que la corroboren a nivel molecular (Maidhof and Hilas 2012).

### **Abuso de medicamentos y agentes externos**

Como se indica en los tipos de lupus, existe una variante inducida por drogas. Se ha sugerido que el uso o abuso de estas sustancias por largos periodos de tiempo, puede favorecer el desarrollo de auto anticuerpos, propiciando el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por último se ha sugerido que factores ambientales como rayos UV o virus, pueden activar factores que causen un desorden a nivel inmunológico, finalizando en la producción de auto anticuerpos (Mevorach 2003).

### **Defectos en la apoptosis**

Se sabe que los nucleosomas cuando son liberados al medio, son reconocidos como auto antígenos por parte de los linfocitos T (Mohan, Adams et al. 1993). Esta es una de las características típicas del lupus, de ahí que se puedan identificar anticuerpos contra DNA en muestras de plasma de estos pacientes. Pensando en que existe un defecto en la fagocitosis o eliminación de células apoptóticas, se podría intuir que esto aumentaría los niveles de nucleosomas y otras partículas en el medio, permitiendo su identificación como autoantígenos incrementando además la respuesta inflamatoria, la cual no ocurre normalmente en la eliminación programada de células. De esta manera podemos esperar de que a partir de este proceso defectuoso, haya un descontrol en el sistema inmunológico, permitiendo que los anticuerpos no identifiquen correctamente las células propias del organismo, desarrollando un desorden autoinmune como en el caso del lupus.

El sistema de muerte celular programada, ha mostrado tener un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis celular de los tejidos. Se ha visto que alteraciones en este sistema puede derivar en diferentes enfermedades como cáncer, desordenes neurodegenerativos y síndromes autoinmunes. La palabra apoptosis fue sugerida por Kerr,

Wyllie y Currie en 1973, es de origen Griego, y significa la “la caída de las hojas”, en alusión a la muerte planificada de las células. El proceso de apoptosis está controlado por un gran número de señales celulares, que pueden tener origen extracelular, toxinas, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento; o intracelular, en respuesta a estrés producido por calor, radiación, glucocorticoides, infecciones virales, hipoxia, falta de nutrientes. La apoptosis se induce por dos vías, la extrínseca y la intrínseca. La primera es mediante factores de necrosis de tumores (familia del TNF). La segunda vía es mediante los productos de la familia de genes Bcl-2, que producen factores que estimulan la supervivencia o la muerte celular. Estos factores permiten la permeabilización de la membrana de las mitocondrias, que resulta en la salida de proteínas que regulan la fase de degradación de la apoptosis (Mevorach 2003).

Una vez que la célula ha recibido el estímulo para iniciar el proceso de apoptosis, se inicia la degradación de los diferentes organelos de la misma, por medio de caspasas proteolíticas. La célula entonces empieza a cambiar su morfología, encogiéndose y adquiriendo una forma esférica, debido a la degradación del citoesqueleto, la cromatina y los organelos se condensan, el núcleo se fragmenta en pequeños nucleosomas por la degradación del ADN, y por último la célula se fragmenta en vesículas llamadas cuerpos apoptóticos. Luego ocurre el proceso de eferocitosis, que es la eliminación de las vesículas por células fagocíticas. Las células apoptóticas son identificadas por moléculas fagocíticas, siendo la fosfatidilserina (PtdSer) una de las más comunes, que son ubicadas en la membrana extracelular cuando las células sufren el proceso de apoptosis (Rothlin and Lemke 2010). Estas moléculas marcan las células apoptóticas, para que sean absorbidas por los macrófagos por una vía no inflamatoria, después de que las células son identificadas por su citoesqueleto (Mevorach 2003). Se sabe que Gas6 y la proteína S, mediante el dominio GLA, permiten la unión de PtdSer con sus proteínas asociadas (Huang, Rigby et al. 2003), lo que le confiere una función importante al sistema TAM para la eliminación de células apoptóticas.

Otra vía de eliminación de las células apoptóticas, es mediante necrosis o vía no programada de muerte celular. En este caso se observa un deterioro de la membrana celular, permitiendo la liberación de diferentes componentes intracelulares, como fragmentos de ADN y organelos, al medio exterior. Esto estimula la producción de citoquinas inflamatorias y de interferón-alfa ( $IFN\alpha$ ), promoviendo que los linfocitos no identifiquen moléculas propias y la

producción de auto-anticuerpos. Este proceso ocurre cuando hay un daño muy severo e irreparable en la célula, como en el caso de isquemias, traumatismos, infecciones, sustancias tóxicas, o cuando la vía de apoptosis no ocurre normalmente (Mevorach 2003; Guerra, Vyse et al. 2012). Es en este proceso donde se cree que se inicia la respuesta autoinmune.

## **Receptores TAM en el lupus**

En el año 1999, Lu et al. estudiaron los efectos de ratones simples, dobles y triple *knockout* para los 3 receptores de la familia TAM. Aquellos ratones que carecían de los 3 receptores, no mostraban diferencias con los silvestres en las primeras 4 semanas de vida, confirmando que los receptores TAM no son esenciales en el desarrollo embrionario. Vieron que los ratones con cualquier combinación de simple y doble mutantes, eran viables y fértiles, mientras los triples mutantes machos no poseían esperma maduro, debido a una progresiva muerte de las células germinales (células de Sertoli). Con este estudio evidenciaron por primera vez, que los ratones triple *knockout* mostraban múltiples defectos en órganos, anormalidades neurológicas y déficits fisiológicos. Mostraban una histología alterada y una elevada tasa de degeneración celular y apoptosis. Observaron también que los ratones triple mutantes adultos desarrollaron ceguera (Lu, Gore et al. 1999).

Luego en el año 2001 los investigadores Lu y Lemke dieron un paso adelante para estudiar el efecto de los receptores TAM en el sistema inmunológico. Observaron que los órganos linfoides periféricos tenían un tamaño y peso normal, así como las células de origen mieloide y linfóide no presentaban características anormales. Pasado el mes de vida, los ratones triple *knockout* empezaron a desarrollar un bazo y nódulos linfáticos más grandes que los silvestres, llegando a alcanzar un tamaño 10 veces mayor en el caso del bazo. El crecimiento aumentado de los órganos linfáticos periféricos, se atribuyó a una hiperproliferación de células B y T. Incluso identificaron colonias ectópicas de linfocitos en casi todos los órganos del cuerpo adulto. Observaron también que los mutantes empezaron a desarrollar autoinmunidad, manifestando los ratones síntomas después de las 4 semanas de vida, los cuales eran muy semejantes a los de enfermedades autoinmunes humanas como artritis reumatoide y SLE. Los

ratones evidenciaron trombosis y hemorragias en varios tejidos, que es asociado a la presencia de anticuerpos contra fosfolípidos en síndromes humanos autoinmunes. Otro aspecto relevante que observaron, fue la presencia de altos títulos de anticuerpos contra antígenos nucleares, como nucleoproteínas y ADN de doble cadena, típico de enfermedades autoinmunes (Lu and Lemke 2001). Con este estudio se planteó la hipótesis de que Gas6 y los receptores TAM pueden jugar un papel en la enfermedad de lupus.

Al mismo tiempo, Scott y colaboradores investigaron el posible efecto que tenía el receptor MerTk en la fagocitosis y la eliminación de células apoptóticas. Estos investigadores observaron anteriormente que ratones MerTk *knockout* eran hipersensibles al efecto de lipopolisacáridos (LPS), por lo que probaron en este estudio, que este receptor tenía un efecto negativo en la producción de citoquinas. Sumado a esto, evidenciaron que Gas6 interviene en la unión entre macrófagos y fosfatidilserina (Scott, McMahon et al. 2001).

También confirmaron el efecto de MerTk sobre la eliminación de células apoptóticas, al suministrar dexametasona a ratones MerTk *knockout* y silvestres, observando en los primeros más de 32% de células apoptóticas, comparado a 4% en los controles. Demostraron también que los macrófagos carentes de MerTk, tenían una marcada deficiencia en el proceso de fagocitosis comparados con los ratones silvestres. Observaron además que los ratones carentes de MerTk, presentaron un aumento de un 50% en sus niveles de auto anticuerpos pasados los 4 meses de edad (Scott, McMahon et al. 2001).

### **Estudios en pacientes de lupus**

Existen diferentes estudios que han evaluado el efecto del sistema TAM en esta enfermedad. Partiendo de la información suministrada anteriormente, varios investigadores han tratado de establecer el posible efecto del sistema TAM en el lupus, así como su posible uso diagnóstico como biomarcador de la actividad de esta patología.

En el año 2010 Suh y col., estudiaron el efecto de Gas6 y proteína S en esta enfermedad. Mediante la técnica de ELISA, evaluaron las concentraciones de estos ligando en muestras de plasma, tanto de pacientes como de controles para poder establecer comparaciones. Observaron que la concentración de proteína S libre, se veía reducida en pacientes de lupus, especialmente en aquellos con desórdenes neurológicos, serológicos, hematológicos e inmunológicos. En cuanto a Gas6 no observaron una diferencia significativa entre ambos, pero si una concentración levemente mayor en pacientes que en controles (Suh, Hilliard et al. 2010). Complementando la información que ya se había presentado sobre los valores del ligando en esta enfermedad, se evaluó también la presencia de sAxl en pacientes de lupus. El grupo de Ekman y col. en 2011 analizaron las concentraciones de estas proteínas en un grupo de pacientes de lupus. Demostraron que los niveles tanto de Gas6 como de sAxl, se correlacionan con el índice de SLEDAI. Notaron además que los valores de estas proteínas eran significativamente mayores en aquellos pacientes que presentaban altos títulos de anticuerpos contra DNA. Partiendo de sus resultados, los investigadores propusieron que Gas6 y sAxl pudieran ser utilizados como biomarcadores de la actividad de lupus (Ekman, Jonsen et al. 2011). También en 2011, se realizó el primer estudio de MerTk y Tyro3 en pacientes de lupus, el cual complemento la información existente sobre la presencia de los receptores solubles TAM en esta enfermedad. Nuevamente mediante la técnica de ELISA, los investigadores estudiaron las concentraciones solubles de estos receptores, y los compararon con la progresión de la enfermedad en varios pacientes con lupus. Relacionaron altos niveles de MerTk, con un mayor índice de actividad (SLEDAI) en la enfermedad. Observaron que en los casos donde existía lupus nefritis y mayores títulos de anticuerpos contra DNA, era donde había mayores niveles de este receptor en forma soluble. Para el caso de sTyro3, también observaron diferencias, habiendo mayores concentraciones de esta proteína en pacientes de lupus que en controles (Wu, Ekman et al. 2011). Con este estudio se comprobó la influencia que pueden tener ambos receptores del grupo TAM en la enfermedad.

Recientemente Hyoun-Ah y col., han estudiado la proposición de utilizar Gas6 como marcador de la actividad de lupus en pacientes de Corea del Sur. Han realizado mediciones de Gas6 en pacientes y en controles, y han comparado los resultados con otros medios de diagnóstico utilizados, como títulos de anticuerpos contra DNA, análisis de los niveles del complemento 3 y 4, el ratio de sedimentación de eritrocitos (ESR). Observaron una sensibilidad

del 72,7% y una especificidad del 84%, cuando utilizaron el análisis ROC (característica operativa del receptor). Usando este mismo test, los valores de Gas6 obtuvieron la mayor puntuación (0,763), lo que ubicaba a este ligando como un buen índice de diagnóstico de esta enfermedad (Kim, Nam et al. 2013). Partiendo de estos resultados, los investigadores concluyen que efectivamente Gas6 es un buen marcador biológico para monitorear la actividad de la enfermedad, y la respuesta de los pacientes a tratamiento.

El hecho de que el sistema TAM cumpla funciones importantes dentro del proceso de fagocitosis y por ende en la apoptosis, y teniendo los mismos un importante papel en el desarrollo de lupus, se pudiera sugerir que cualquier defecto en este puede desencadenar problemas inflamatorios e inmunológicos que pueden derivar en esta enfermedad

En el año 2013 se publicó un estudio en donde se midió en el sistema sanguíneo las formas solubles de los receptores MerTk y Axl en pacientes de SLE, los cuales fueron pareados con muestras de individuos sanos, con el fin de conocer como estas moléculas se relacionan con los perfiles de esta enfermedad. Al realizar una comparación pareada en edad, sexo y etnia entre 45 pacientes y 45 muestras controles en plasma, los investigadores no observaron mayores diferencias en los niveles de sMerTk y de sAxl (Zizzo, Guerrieri et al. 2013). Pero al realizar una comparación entre aquellos pacientes con un índice SLEDAI  $\geq 6$  con los controles, evidenciaron un aumento en los niveles de sMerTk en la circulación de los pacientes, asique como evidenciaron una mayor concentración de esta proteína soluble en aquellos pacientes que presentaban daño renal, así como en pacientes que presentaban altos títulos de anticuerpos contra ADN de doble banda (anti-dsDNA). Al ser comparaciones con los ligandos del sistema TAM, observaron que sAxl está relacionado con los niveles de Gas6, mientras que sMerTk estaba inversamente relacionado con los niveles de proteína S en su forma libre. En general solo observaron un aumento significativo en los niveles de sMerTk en aquellos pacientes con anti anticuerpos característicos de la enfermedad de Lupus, como lo son los anti ADN, anti ribonucleoproteínas, anti-Ro.

Estos investigadores también quisieron analizar el estado de los monocitos/macrófagos de pacientes en cuanto a la liberación de sAxl y sMerTk, para poder saber que pasa a nivel

inmunológico. Observaron una abundante liberación de sMerTk en macrófagos expuestos al factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF) e interleuquina 10 (IL-10) o a glucocorticoides, y una disminución cuando los macrófagos estaban en condiciones M1 por medio del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). En contraste observaron, que los niveles de sAx1 no se veían afectados por el estado de polarización de los macrófagos, ya sea M1 o M2. Por primera vez Zizzo y col. describen a sMerTk como biomarcador de la activación de M2c y confirmaron la correlación entre el índice SLEDAI y los niveles de sMerTk reportados en nuestro artículo sobre Lupus (Recarte-Pelz, Tassies et al. 2013). Con este estudio los autores de este estudio sugieren la existencia de una relación entre la homeostasis de monocitos/macrófagos M2c anti inflamatorios y esferocíticos, y la patogénesis de la forma humana de SLE.

En el año 2014 Zhu y col. estudiaron la expresión y el significado clínico de las diferentes formas de MerTk en pacientes con SLE. Para ello analizaron la expresión del receptor TAM en la superficie monocitos/macrófagos CD14+ mediante la técnica de citometría de flujo, los niveles de sMerTk mediante ELISA y los niveles de mRNA mediante RT-PCR. Observaron que los niveles del receptor se veían incrementados tanto en plasma, como en la superficie de CD14+ en pacientes de SLE en comparación con pacientes sanos. En cuanto a los niveles de mRNA de *MERTK*, los investigadores no observaron diferencias significativas (Zhu, Sun et al. 2014). Los investigadores sugieren que los restos de células apoptóticas y una activación continuada de IFN tipo I en pacientes de SLE, van a favorecer el aumento de la expresión de MerTk como medio de activación de la vía inmunosupresora, y que por ello observaron un aumento en los niveles de esta proteína en la superficie de macrófagos (CD14+) y en su forma soluble en plasma.

Observaron también, que este aumento de MerTk en plasma y en macrófagos ocurrió a pesar de que había una disminución significativa de ADAM17. Sustentan este hecho con el aumento significativo de la expresión de MerTK en general, y a que el proceso de *shedding* no fue inhibido del todo. Zhu y col. también observaron una relación entre los niveles de este receptor del grupo TAM en su forma soluble y el índice SLEDAI de los pacientes. Observaron a su vez, que aquellos pacientes con el mayor índice SLEDAI, con presencia de autoanticuerpos y lupus nefritis, presentaban la mayor concentración de sMerTk en plasma del grupo estudiado. Así, como también observaron que los pacientes más graves presentaban mayor cantidad del

receptor en los macrófagos. Partiendo de los resultados de sus estudios, Zhu y col. también sugieren que el aumento en la expresión de MerTk puede ser utilizado como biomarcador, para indicar el nivel de actividad y gravedad de los pacientes con SLE.

## **Insuficiencia cardiaca**

A nivel mundial es conocido que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte. Una de las diversas afecciones del corazón es la insuficiencia cardiaca, que se caracteriza por la pérdida de la capacidad para bombear sangre eficientemente de este órgano. Puede deberse a diferentes motivos, y la consecuencia es la reducción de la actividad física y mental, deteriorando significativamente la calidad de vida (Ramani, Uber et al. 2010; Manzano, Escobar et al. 2012).

Según la Sociedad Europea de Cardiología, que incluye en su área de influencia a más de 900 millones de personas en 51 países, esta enfermedad afecta aproximadamente a 15 millones de personas, 23 millones en el mundo (Gaggin and Januzzi 2013). Tiene un factor de prevalencia de entre 2% y 3%, en la población general, pero llega a ser de entre un 10% y un 20% en personas mayores de 75 años (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008).

## **Diagnóstico**

El diagnóstico temprano y la clasificación del daño cardiaco son muy importantes para un tratamiento efectivo, y una mejora en la prognosis. Este proceso es normalmente difícil, debido a síntomas no específicos y a la falta de un protocolo estándar para el correcto diagnóstico (Palazzuoli, Gallotta et al. 2010). Diferentes estudios demuestran que los diagnósticos actuales a menudo son inadecuados, particularmente en mujeres, ancianos y personas obesas (Manzano, Escobar et al. 2012). La primera persona en reflejar este problema fue Sir Thomas Lewis en 1933, cuando comento que era esencial el reconocimiento temprano de la deficiencia cardiaca, para tratar la enfermedad eficazmente. Normalmente son los síntomas los que dan una idea sobre el padecimiento de la enfermedad, ya que es la causa de que los afectados busquen ayuda médica. Los principales son fatiga, cansancio y falta de aliento. Debido a lo común de estos síntomas, es difícil para los médicos diferenciar la insuficiencia cardiaca de una patología

pulmonar, por ejemplo. Para poder diagnosticar problemas cardiacos a partir de estos síntomas se requiere de experiencia y habilidad (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Manzano, Escobar et al. 2012).

Es importante destacar, que un diagnóstico temprano de la enfermedad, puede evitar complicaciones futuras de la misma, mejorando la calidad de vida de las personas afectadas a largo plazo. Un simple cambio de dieta o de estilo de vida, pueden ser decisivos, si son practicados de manera temprana. Por esta razón se han buscado diferentes formas de hacer diagnósticos precisos y concluyentes, con el fin de tratar a los afectados de manera rápida y efectiva. Entre los métodos utilizados hoy en día para el diagnóstico de la enfermedad encontramos: electrocardiograma, placa de rayos X de pecho, y diversas pruebas de laboratorio, destacado entre estas últimas la medición de troponina, triiodotironina, pro-BNP y BNP en la sangre.

En la próxima tabla IV se presentan un índice de valoración de la efectividad de las diferentes técnicas de diagnóstico aportada por la Sociedad Europea de Cardiología.

	Diagnóstico de la Enfermedad	
	Apoya la presencia	Dificulta el diagnóstico
<b>ECG</b>		
-Normal	-	++
-Anormal	++	+
-Disritmia	+++	+
<b>Examen Laboratorio</b>		
-Elevado BNP/NT-proBNP	+++	+
-Bajo/normal BNP/NT-proBNP	+	+++
-Disfunción renal	+	+
-Elevación media de troponina	+	+
<b>Placa de rayos X de pecho</b>		
-Congestión respiratoria	+++	+
-Capacidad reducida de ejercicio	+++	++
-Función pulmonar anormal	+	+

+ = baja importancia; ++ = media importancia; +++ = alta importancia

Tabla IV. Diferentes métodos diagnósticos de la insuficiencia cardiaca, y su efectividad para descartarla de otras enfermedades, como problemas pulmonares, infarto, problemas renales.

### **Péptido natriurético cerebral o BNP**

Uno de los parámetros de diagnóstico más ampliamente usado en laboratorio, es la medición del péptido natriurético cerebral o péptido natriurético tipo B (BNP). Se trata de una hormona de 32 aminoácidos secretada fundamentalmente en los ventrículos, en respuesta a un estrechamiento excesivo de las células del músculo en cuestión. En los cardiomiocitos se sintetiza un pre-propeptido (preproBNP) de 134 aminoácidos, el cual luego se divide en un péptido señal y en un pro-péptido de 108 aminoácidos, proBNP, que también es usado como

biomarcador de insuficiencia cardiaca. Durante la secreción proBNP se divide en una proporción 1:1 en la fracción activa BNP, que corresponde al fragmento C terminal, y en la inactiva NT-proBNP de 76 aminoácidos correspondiente al fragmento N terminal (Levin, Gardner et al. 1998). Sus niveles en plasma pueden llegar a ser muy altos, cuando existe algún problema cardiaco (Palazzuoli, Gallotta et al. 2010). Su nombre deriva del hecho de que la proteína fue inicialmente aislada de un extracto de cerebro porcino, pero en los humanos es producida principalmente en los ventrículos del corazón (Bhalla, Willis et al. 2004).

Esta proteína es un potente natriurético, diurético y vaso relajador. Promueve la relajación vascular, baja la presión sanguínea, e inhibe la síntesis de moléculas vaso-constrictoras como la angiotensina II y la aldosterona. A su vez coordina la homeostasis de fluidos y electrolitos a través de su actividad en el sistema nervioso central y tejido periférico (Bhalla, Willis et al. 2004). Diferentes estudios, siendo el del grupo de Espinter Davis et. al en 1994 el primero en hacerlo (Davis, Espiner et al. 1994), sugieren el uso de los valores de BNP en sangre, para diagnosticar correctamente la insuficiencia cardiaca. Este valor se utiliza ampliamente hoy en día.

A pesar de que varios estudios demuestran que BNP es un marcador con alta sensibilidad y especificidad, su aplicación está limitada en la práctica clínica por la falta de un rango normal y universal de los valores de la proteína en plasma en diferentes condiciones (Tsuchida and Tanabe 2008). Se ha visto que los valores de BNP aumentan con la edad, y que las mujeres son más propensas a tener mayores niveles de la proteína que los hombres. Además, se han observado diferentes valores según la raza, teniendo los Afro-americanos y los Hispanos mayores valores de BNP que los Caucásicos. Se han evaluado varios casos, donde los valores de BNP son alterados debido a otras afecciones, tal es el caso de disfunción renal, pacientes en procesos de diálisis, infarto de miocardio, hipertensión pulmonar primaria, síndrome coronario agudo, anemia, enfisema pulmonar agudo e insuficiencia cardiaca congestiva del lado derecho del corazón, y en el caso de personas obesas los valores de BNP son menores (Palazzuoli, Gallotta et al. 2010). Sumando a esto hay que destacar que la vida media de BNP es de 22 minutos; lo que obliga a que las muestras sean recogidas en hielo, para una medición correcta de los niveles de la

misma; o congeladas, para un posterior análisis sin alteraciones en los niveles reales de la proteína en la muestra de plasma tomada (Bhalla, Willis et al. 2004).

Existen discrepancias en el valor límite de normalidad, que algunos sitúan en 100 pg/ml, mientras que otros en 200 pg/ml. En general se considera que valores por debajo de los 100 pg/ml tienen poca probabilidad de desarrollar insuficiencia cardiaca (Escobar, Santiago-Ruiz et al. 2011), entre 100-400 pg/ml los pacientes deben seguir un control más estricto por el aumento de riesgo, y aquellos con valores por encima de los 500 pg/ml ya se consideran personas afectadas por un problema cardiaco (Palazzuoli, Gallotta et al. 2010).

### **Fragmento propéptido NT-proBNP**

El fragmento inactivo NT-proBNP también es usado como parámetro diagnóstico de insuficiencia cardiaca. En 1997 se estudió el uso de este péptido para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca, obteniendo valores elevados de la proteína en pacientes con daños cardiacos, y aumentando los mismos con la progresión de la enfermedad (Hunt, Richards et al. 1997). Se ha logrado estratificar los valores de NT-proBNP según grupos de edades, para obtener un diagnóstico más preciso, ya que los valores de la misma se pueden ver afectados de igual manera que en el caso de BNP. Quedando los valores límites plasma para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca en 450, 900 y 1800 ng/ml para grupos de edad <50, 50-75, y 75> años respectivamente. Quedando entonces aquellos pacientes con valores inferiores a 300 ng/ml fuera de la posibilidad de tener insuficiencia cardiaca en el 98% de los casos, y con un valor independiente de la edad de 900 ng/ml tiene la sensibilidad, la especificidad, y la predicción positiva equivalente a un valor de 100 ng/ml para BNP (Januzzi, Chen-Tournoux et al. 2008).

### **Troponina**

La troponina cardiaca es otro biomarcador que se estudia a nivel plasmático, para evaluar el daño cardiaco. Se trata de una proteína globular de alto peso molecular, presente en el músculo

estriado y el cardiaco, y controla la interacción mediada por calcio entre la actina y la miosina, que resulta en la contracción y relajación muscular. El complejo de la troponina está formado por 3 subunidades: troponina C, que se enlaza con el calcio; troponina I, que inhibe la unión actina-miosina; troponina T, la cual une el complejo mediante la unión con tropomiosina y facilita la contracción (Daubert and Jeremias 2010). La troponina C se expresa en células musculares cardíacas y del esqueleto, mientras que la secuencia de aminoácidos de la troponina I y T son específicas del músculo cardíaco. A partir de esta diferencia se estableció un ensayo rápido y cuantitativo para evaluar niveles de estas proteínas en el suero. Cuando se produce un daño en los cardiomiocitos, como en el infarto de miocardio, estas células liberan troponina al sistema sanguíneo. La sensibilidad de la troponina T puede llegar hasta un 100% después de 6-12 horas de haber sufrido un infarto. Para el diagnóstico concreto de la insuficiencia cardíaca, se ha observado que los niveles de troponina T no se ven afectados por infarto del miocardio, lo que permite que pueda establecerse como biomarcador (Tucker, Collins et al. 1997; Panteghini, Pagani et al. 1999; Omland, de Lemos et al. 2009; Guzman and Quiroga 2010).

### **Triyodotironina del suero**

Se trata de una hormona secretada por el tiroides, cuyas funciones afectan casi todos los procesos fisiológicos básicos, desde el crecimiento y desarrollo, pasando por el metabolismo, y regulando la temperatura corporal y el ritmo cardíaco. Específicamente en el corazón la triyodotironina o T3, incrementa la fuerza cardíaca al aumentar ritmo cardíaco y la fuerza de contracción (Gomberg-Maitland and Frishman 1998; Klein and Ojamaa 1998). Se ha demostrado en modelos animales, que esta hormona promueve el transporte de iones sodio, potasio y calcio, a través de los canales de la membrana plasmática de los miocitos cardíacos, mediante mecanismos genómicos y no genómicos (Walker, Crawford et al. 1994), resultando en el incremento de la presión sistólica y la disminución de la presión diastólica.

El estado hipotiroideo o una disminución de los niveles de T3 en sangre, se han asociado con una disminución en el volumen sistólico, rendimiento y contracción cardíaca, así como un aumento en la resistencia vascular, derivando en insuficiencia cardíaca. Se ha comprobado que

en la enfermedad existe una falla en el metabolismo de la hormona tiroidea, y que además este estado se agrava con la misma. El deterioro cardiaco se traduce en una disminución de los niveles de T3 (Ascheim and Hryniewicz 2002), deteriorando así las funciones sistólicas del corazón. Los niveles normales de T3 en sangre se encuentran entre 87-178 ng/dl aproximadamente. Selvaraj y col. en 2012 en un estudio con 89 pacientes con insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada, observaron que por el aumento de una unidad en el logaritmo de BNP, había una disminución de 4,7 ng/ml en T3. A su vez, se ha visto también que paciente con problemas funcionales en la tiroides, presentan elevados niveles de proBNP, lo que sugiere que puede haber una relación directa entre T3 y la expresión génica de BNP en miocitos, independiente de la insuficiencia cardiaca (Selvaraj, Klein et al. 2012).

El uso de este biomarcador de insuficiencia cardiaca, debe estar entonces condicionado, por un análisis endocrino del paciente, para evitar interpretación equivocada de los resultados de laboratorio, y por ende un tratamiento inadecuado. Este aspecto representa un inconveniente para el uso de esta hormona, como factor diagnóstico de la insuficiencia cardiaca.

De igual manera se recomienda que la medición de estos valores en plasma, estén acompañados de otras técnicas de diagnósticos, para lograr una evaluación más precisa del paciente. Entre las técnicas descritas anteriormente, se sugiere un estudio de valores de BNP junto a una ecocardiografía, logrando ambas en conjunto un diagnóstico muy acertado (Manzano, Escobar et al. 2012).

### **Nuevos marcadores de insuficiencia cardiaca**

La búsqueda de nuevos marcadores biológicos para esta enfermedad que sean sensibles, específicos y fácil de medir, sigue activa. Un grupo de nuevas proteínas se ha propuesto como biomarcadores, para identificar la aparición de las diferentes patologías que participan en el desarrollo de la insuficiencia cardiaca. Entre estas se pueden destacar:

Péptido natriurético pro atrial de la región media (MR-proANP): su producción aumenta a medida que se estrechan las paredes atriales en la insuficiencia cardiaca. Su medición es difícil, ya que la proteína tiene una vida media de 2-5 min (Gaggin and Januzzi 2013).

Pro adrenomedulina de la región media (MR-proADM): es un péptido con efectos vasodilatadores. Se ha encontrado en el corazón, y se cree que ayuda a incrementar la contractibilidad miocárdial. En pacientes con insuficiencia cardiaca sus valores se han visto aumentados, y se relacionan con una disminuida fracción de eyección del ventrículo izquierdo y la presencia de disfunción diastólica. Ha mostrado ser un biomarcador a corto plazo de gran efectividad, de 90 días a 1 año. Requiere más estudios para mostrar su capacidad diagnóstica (Gaggin and Januzzi 2013).

ST2 soluble (sST2): el marcador más semejante a sAx1, es un miembro de la familia de los receptores de interleuquina 1. El ligando de este receptor es la interleuquina 33 (IL-33), la cual se une a ST2 en respuesta a un daño cardíaco, con el fin de preservar la función del corazón. La forma soluble del receptor bloquea la unión de IL-33 a su receptor, lo que expone al corazón a un mayor estrés (Shah, Chen-Tournoux et al. 2009). Se trata así de uno de los biomarcadores más prometedores para el diagnóstico de esta enfermedad.

Factor de diferenciación de crecimiento GDF-15: estos factores de crecimiento tienen funciones en el desarrollo, teniendo GDF-15 un rol en la regulación de las vías inflamatorias y de apoptosis, cuando existe un daño a tejidos o se desarrolla una patología. Los valores de GDF-15 se ha visto elevados tanto en infarto de miocardio como en insuficiencia cardiaca (Gaggin and Januzzi 2013). Su posible uso como biomarcador no se ha establecido, por lo que su uso para tal fin debe seguir estudiándose.

Galectina-3: es un producto de macrófagos, de la familia de las lectinas, y se encuentra en diferentes células y superficies de tejidos. Su función está asociada a la cascada de inflamación después de un daño cardíaco, y a las vías que regulan la contracción cardíaca. Se observaron mayores niveles de galectina-3 en pacientes de insuficiencia cardiaca que en controles, pero su uso como diagnóstico fue eclipsado por pro-BNP. A pesar de esto, mostro una gran habilidad

para predecir la mortalidad a 60 días del diagnóstico. De igual manera que para otros biomarcadores, se ha sugerido su uso en conjunto a sus homólogos, para poder garantizar datos más confiables (Gaggin and Januzzi 2013).

## **Gas6 y el sistema TAM en la insuficiencia cardiaca**

Por diferentes estudios publicados, se sabe que Gas6 y el sistema TAM desempeñan diferentes funciones en el sistema vascular, y que uno de los tejidos donde más se expresa el receptor Axl es en el tejido cardíaco, según los perfiles de expresión del *Geneatlas dataset*. Se ha evidenciado que proteína S es un regulador negativo de la cascada de coagulación, y que Gas6 está involucrado en la homeostasis vascular, específicamente en la proliferación, apoptosis, eferocitosis, migración de leucocitos, y secuestro y migración plaquetaria. Gas6 también es responsable de activar diferentes tipos de células, desde las plaquetas hasta las células endoteliales y de la musculatura lisa (Laurance, Lemarie et al. 2012). Diferentes haplotipos del gen de Gas6 están asociados a ictus (Munoz, Obach et al. 2007) y a arteriosclerosis carótida (Hurtado, Abasolo et al. 2010), así como modula la formación de trombos plaquetarios y la homeostasis de la pared vascular (Maree, Jneid et al. 2007). Niveles altos de Gas6 en plasma, han sido asociados también con la enfermedad tromboembólica venosa (Blostein, Rajotte et al. 2011). Partiendo de estos estudios, se sabe el efecto que puede tener Gas6 sobre diversos factores vasculares, aunque aún no se han conducido estudios sobre los efectos de este en el desarrollo de la enfermedad de insuficiencia cardíaca.

Se sabe que el sistema regula la homeostasis de la musculatura lisa (Korshunov, Mohan et al. 2006), la función plaquetaria y la estabilización de trombos en ratones (Angelillo-Scherrer, de Frutos et al. 2001). Se conoce que Axl favorece la formación del endotelio tubular a través del sistema de angiopoyetina y de DKK3 (Li, Ye et al. 2009) y se ha observado que polimorfismos de MerTk y Tyro3 están asociados con arteriosclerosis carótida, siendo factores de protección y de riesgo respectivamente (Hurtado, Munoz et al. 2011).

A pesar de estos numerosos estudios del sistema TAM sobre el sistema vascular, poco se conoce del papel que el mismo puede desempeñar en una enfermedad tan importante como lo es la insuficiencia cardíaca. En un estudio sobre cultivos de fibroblastos cardíacos *in vivo*, observaron por primera vez que Gas6 es un potente factor de crecimiento y supervivencia de este tipo de células. Observaron también que puede favorecer el proceso de modelación del corazón, a través de los fibroblastos cardíacos que secretan grandes cantidades de colágeno fibrilar, el cual pudiera formar parte de una función sanadora ante un infarto de miocardio, restableciendo la integridad de la zona afectada (Stenhoff, Dahlback et al. 2004). El conocimiento sobre el posible papel del sistema TAM en la insuficiencia cardíaca aún es desconocido, lo cual a aumentó nuestra curiosidad por el tema.

Tanto en ratones como en humanos, los genes del sistema GAS6/ProS-TAM se expresan en tejido cardíaco y, específicamente en los cardiomiocitos (Su, Wiltshire et al. 2004). Esto permite plantear la hipótesis de que algún defecto en este órgano, como el caso de la insuficiencia cardíaca, puede reflejarse o afectar los niveles del sistema TAM.

## **Posibilidades diagnósticas y terapéuticas de la regulación del sistema TAM**

Desde su descubrimiento hace dos décadas, los estudios sobre Gas6 y sus receptores han demostrado su papel en crecimiento celular, supervivencia y respuesta inflamatoria. La presencia y posible papel en células cancerosas y tumores, enfermedad vascular e inflamatoria, permite concluir que este sistema juega un papel importante en el desarrollo y proliferación de estos síndromes. Partiendo de la información presentada, se quiso estudiar la posibilidad de que Gas6 y sus receptores TAM puedan convertirse en marcadores moleculares, que pudiesen ayudar al diagnóstico e identificación del cáncer de colon, lupus eritematoso sistémico e insuficiencia cardíaca.

## **II. HIPÓTESIS**

Estudiar el posible rol diagnóstico que puedan desempeñar los ligandos y receptores del sistema TAM en cáncer de colon, lupus e insuficiencia cardíaca.

## **III. OBJETIVOS**

- 1 Analizar el posible papel de Gas6, Tyro3, Axl y MerTk como marcadores para la identificación temprana del cáncer de colon, así como en Lupus, enfermedad marcada por un componente inflamatorio, y en insuficiencia cardíaca. Para ello, los subobjetivos fijados son:
  - a. Calibrar el test de Elisa para la determinación de Gas6, Tyro3, Axl y MerTk en plasma.
  - b. Analizar la concentración de Gas6, Tyro3, Axl y MerTk en plasma, para establecer una comparación entre pacientes y controles sanos.
  - c. Analizar el genotipo de Gas6 y de los receptores TAM respecto a marcadores genéticos de tipo SNP en pacientes y controles, para identificar si existe asociación genética entre alguno de estos marcadores y la enfermedad.
  
- 2 Analizar la expresión de Gas6 y los receptores TAM en mucosa colónica normal y tumoral. Para ello, los subobjetivos fijados son:
  - a. Cuantificar el mRNA de Gas6 y los receptores TAM mediante PCR real-time y el uso de sondas TaqMan.

- b. Determinación de la concentración proteica de Gas6 y Tyro3 por medio de la técnica de inmunohistoquímica, para poder establecer una comparación entre muestras control y tumoral.

## IV. RESULTADOS

### Resumen del artículo sobre el sistema TAM en Lupus.

A continuación se presenta la publicación científica titulada “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”, donde se exponen los resultados obtenidos del análisis de los niveles de Gas6 y proteína S, y sus respectivos receptores en forma soluble sAxl, sMerTk, sTyro3, en muestras de plasma de controles y de pacientes de lupus. Se analizaron además las posibles asociaciones genéticas entre variantes de los genes de estas proteínas y la presencia de la enfermedad.

A Gas6 y proteína S se les ha atribuido un papel en la reparación de tejidos dañados, así como su interacción con los receptores TAM en la eliminación de las células apoptóticas y en la regulación del sistema inmunitario innato, como también ha mostrado que su deficiencia en ratones favorece el desarrollo de patologías semejantes a las encontradas en pacientes de lupus.

Para dicho estudio se compararon 50 muestras de controles sanos, con 50 muestras de pacientes de lupus en diferentes estadios de la enfermedad, pareadas en sexo y edad, y de la misma zona geográfica. Se analizaron algunos de las variantes genéticas de *GAS6* y los genes de los receptores TAM definidos en anteriores estudios. A nivel proteico se analizaron las concentraciones de Gas6, la forma soluble de los receptores (sAxl, sMerTk, sTyro3), y tanto la forma total como la libre de la proteína S en plasma.

Entre los resultados significativos obtenidos en el estudio destacan que los niveles de Gas6 fueron mayores ( $32.3 \pm 1.5$  vs  $27.2 \pm 1.08$  ng/ml) y los de proteína S libre menores ( $67.6 \pm 3.34$  vs  $101 \pm 2.07$  ng/ml), en pacientes de lupus que en controles. Dichos resultados se correlacionaron correctamente con la clasificación SLEDAI de los pacientes, donde en los peores casos se encontraron mayores niveles de Gas6 y menores niveles de proteína S en su forma libre.

Adicionalmente las concentraciones de los receptores TAM en su forma soluble en plasma, fueron más elevados en los pacientes de lupus que en los controles sanos: sAx1,  $34.8 \pm 14.3$  vs  $25.9 \pm 15.3$  ng/ml; sMerTk,  $21.2 \pm 10.8$  vs  $17.4 \pm 12.1$  ng/ml; sTyro3,  $3.62 \pm 1.13$  vs  $1.65 \pm 0.93$  ng/ml. A nivel genético varios SNPs mostraron correlación con la concentración plasmática de la proteína. En el caso de MerTk en el intron 1 (c.61+2737G>A), la concentración de la proteína en plasma aumento cuando se estaba en presencia de la variante AA en pacientes. Para el intron 8 de GAS6 también para la variante AA+AG, se observó la mayor concentración proteica en plasma. En el caso de sAx1, se observó un aumento en la concentración de la proteína en plasma, cuando se estaba en presencia de la variante AG del intron I18. En el análisis de los SNP de sTyro3 no se observó ninguna relación entre variantes genéticas y la concentración de la proteína en plasma.

En resumen, el presente estudio estableció una correlación entre el sistema TAM y la actividad de la enfermedad. Se observó una asociación entre niveles de las proteínas en plasma y algunas variantes en los genes de estas proteínas, así como mayores niveles de los receptores en su forma soluble y de Gas6 en pacientes de lupus que en controles. En cambio, se detectaron menos niveles de proteína S en forma soluble en pacientes de lupus en correlación con controles sanos, lo que puede ser indicativo de que la falta de esta proteína pueda afectar la regulación adecuada del sistema inmunitario, patología característica de esta enfermedad.

### **Artículo I. 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 Research Theraphy. 2013 Mar 12;15(2):R41.

*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.*

Recarte-Pelz P, Tàssies D, Espinosa G, Hurtado B, Sala N, Cervera R, Reverter JC, de Frutos PG.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

## 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

Pedro Recarte-Pelz<sup>1†</sup>, Dolors Tàssies<sup>2†</sup>, Gerard Espinosa<sup>3</sup>, Begoña Hurtado<sup>1</sup>, Núria Sala<sup>4</sup>, Ricard Cervera<sup>3</sup>, Joan Carles Reverter<sup>2</sup> and Pablo García de Frutos<sup>1\*</sup>

### Abstract

**Introduction:** Growth arrest-specific gene 6 protein (GAS6) and protein S (ProS) are vitamin K-dependent proteins present in plasma with important regulatory functions in systems of response and repair to damage. They interact with receptor tyrosine kinases of the Tyro3, Axl and MerTK receptor tyrosine kinase (TAM) family, involved in apoptotic cell clearance (efferocytosis) and regulation of the innate immunity. TAM-deficient mice show spontaneous lupus-like symptoms. Here we tested the genetic profile and plasma levels of components of the system in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), and compare them with a control healthy population.

**Methods:** Fifty SLE patients and 50 healthy controls with matched age, gender and from the same geographic area were compared. Genetic analysis was performed in GAS6 and the TAM receptor genes on SNPs previously identified. The concentrations of GAS6, total and free ProS, and the soluble forms of the three TAM receptors (sAxl, sMerTK and sTyro3) were measured in plasma from these samples.

**Results:** Plasma concentrations of GAS6 were higher and, total and free ProS were lower in the SLE patients compared to controls, even when patients on oral anticoagulant treatment were discarded. Those parameters correlated with SLE disease activity index (SLEDAI) score, GAS6 being higher in the most severe cases, while free and total ProS were lower. All 3 soluble receptors increased its concentration in plasma of lupus patients.

**Conclusions:** The present study highlights that the GAS6/ProS-TAM system correlates in several ways with disease activity in SLE. We show here that this correlation is affected by common polymorphisms in the genes of the system. These findings underscore the importance of mechanism of regulatory control of innate immunity in the pathology of SLE.

### Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterized by an impairment of the regulation of the immune system [1]. This is reflected in hyperactivity of lymphocytes, the production of pathogenic auto-antibodies, and the formation of immune complexes, which can lead to multi-organ damage. Although the exact aetiology is not known, one of the

possible triggers of this autoimmune reaction is a deficit in the process of efferocytosis, the clearance of apoptotic cells [2]. Under normal circumstances, apoptotic cells are engulfed by macrophages and other phagocytosing cells using specific mechanisms, different from those of phagocytosing bacteria and other corpuscles [3]. This provides a clearance of possible auto-antigens in the early phase of cell death without inducing inflammation or the immune response. In SLE, however, the clearance of apoptotic cells by macrophages is impaired, which may allow apoptotic cells to serve as immunogens for the

\* Correspondence: [pablo.garcia@csic.es](mailto:pablo.garcia@csic.es)

† Contributed equally

<sup>1</sup>Department of Cell Death and Proliferation, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IBB-CSIC, IDIBAPS), C/ Roselló 161 6<sup>a</sup>, Barcelona, 08036, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



induction of autoreactive T and B cells and drive the production of auto-antibodies [4].

The reasons for the defective clearance of apoptotic cells in SLE are not clear. The past decade has provided significant evidence that the complement cascade, immunoglobulin (Ig) M or pentraxins as serum amyloid P-component and C-reactive protein, contribute to the clearance of apoptotic bodies. Macrophages recognize apoptotic cells through an array of surface receptors [3]. Among them, the Tyro3, Axl and MerTK (TAM) tyrosine kinases play an especially important role in the clearance of apoptotic cells by macrophages and dendritic cells [5]. Mice lacking the three TAM receptors rapidly develop lupus-like symptoms, being the MerTK receptor the most potent mediator in this instance [6-8]. The main ligands that bind to and activate the TAM family of receptors are growth arrest-specific 6 (GAS6) and protein S (ProS), which are also capable of binding to negatively charged residues exposed early in apoptosis on the membrane surface of the apoptotic cell [9].

GAS6 and ProS are 75 kDa multimodular vitamin K-dependent glycoproteins (VKDPs) found in chordates, sharing a 40 to 43% amino acid identity in different species. Their modular architecture is identical, containing an N-terminal  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) domain, interacting with phosphatidylserine containing membranes, followed by four epidermal growth factor-like domains and two laminin globular-like domains that contain the interaction site with TAM receptor tyrosine kinases, the first one having a crucial role [10,11]. GAS6 is expressed in many tissues, including capillary endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and bone marrow cells. Unlike other VKDPs, GAS6 production in the liver is minor, and its concentration in plasma is approximately 1,000-fold lower than that of ProS [12]. ProS has a critical function in regulating coagulation in several critical steps [13]. ProS circulates as approximately 40% free ProS and 60% as a complex with C4b-binding protein (C4BP); only free ProS is active as a cofactor for activated protein C and a ligand for the TAM receptor kinases [14]. Lower free ProS concentration in plasma is associated with an increased risk of deep venous thromboembolism [15].

TAM receptors undergo a proteolytic processing in the cell membrane, leading to plasma circulating levels of extracellular fragments of the receptors (soluble receptors). These forms have been shown to interact with the ligands, modifying their function [16,17]. These soluble fragments could have regulatory functions for the GAS6/ProS-TAM system, as well as being markers of its state of activation.

Recently, several studies have focused on the components of this system in groups of patients with lupus [18-20]. Low values of ProS might have important roles

in the pathogenesis of SLE, and acquired ProS deficiency has been associated with the thrombotic complications often encountered in these patients [21]. In contrast, plasma GAS6 concentration was reported to be elevated in patients with severe sepsis, and septic shock, or inflammatory diseases without infectious agents and severe acute pancreatitis. GAS6 concentration in SLE has been evaluated by two studies, demonstrating either an increased concentration or similar levels in patients with lupus [18,22]. A genetic association of single nucleotide polymorphic variants in the genes of the GAS6/ProS-TAM system has been determined in cardiovascular disease [23-25]. In the present study we correlate the plasma concentration of components of the system with single nucleotide polymorphisms (SNPs) characterized in the GAS6/TAM genes.

## Materials and methods

### Individuals enrolled in the study

Plasma samples from a group of patients with SLE (n = 50) were obtained from the Department of Autoimmune Diseases Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain. A group of healthy individuals (n = 50) without autoimmune disease, bleeding disorders, thrombosis or a history of pregnancy loss was obtained from the Department of Haemostasia and Haemotherapy. The two groups were matched for ethnicity (all Caucasians), age (mean age 40 years) and gender (two men and forty-eight women). Patients with SLE fulfilled the revised criteria of the American College of Rheumatology for the classification of SLE [26]. The main SLE clinical manifestations evaluated in this study were defined according to the American Rheumatism Association glossary committee [27]. Disease activity was scored using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) [28], while the SLE-associated injury was measured by the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR (SLICC/ACR) Damage Index [29]. The present study was approved by the Human Experimental Committee of the Hospital Clinic (Barcelona) and was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all participants.

### Parameter determination in plasma samples

Free and total ProS were determined using standard clinical laboratory methods (Asserachrom Protein S and Asserachrom Free Protein S, Stago, Asnières, France). Values are expressed as percentage of control plasma. The concentration of the vitamin K-dependent ligand GAS6, and the extracellular fractions of the receptors, sTyro3, sAxl and sMerTK were analyzed in plasma from controls and patients by ELISA. For determination of GAS6, the technique described by Alciato *et al.* was

used, with some modifications [30]. Capture and detection polyclonal antibodies were obtained from R&D Systems. The plates were blocked for 1 hour at room temperature with diluent buffer (PBS with 1% bovine serum albumin, pH = 7.4). The plates were washed three times with wash buffer (PBS with 0.05% Tween20). For the determination of sTyro3 and sMerTK in plasma, ELISA was performed using previously matched capture and detection antibodies (Duo Set reagents from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Small modifications were introduced in the protocols of the manufacturer. For sMerTK determination the diluent reagent contained 3% fish gelatin instead of albumin, as indicated by Wu *et al.* [20]. For the determination of sAxl, a polyclonal antibody from R&D systems was used as capture antibody, while a biotinylated antibody was used as detection reagent. Dilutions of plasma samples were adapted for each assay. Standard curves were made by serial dilution of purified proteins in each case. Negative controls were buffer alone and a plasma pool was used as the internal standard of the assays.

#### Genotype determination and analysis

Genomic DNA was extracted from venous blood samples. Genotype determinations were performed as previously described, using quantitative real-time PCR [23]. In *GAS6* [EMBL: ENSG00000183087], we selected rs8191973, rs7331124, rs7323932 and rs8191974 SNPs, which form the haplotype block previously associated with stroke. In *TAM* genes, after a search in the public databases dbSNP, Ensembl and HapMap, we selected eleven SNPs: four in *TYRO3* [EMBL: ENSG00000092445], three in *AXL* [EMBL: ENSG00000167601] and four in *MERTK* [EMBL: ENSG00000153208]. Inclusion criteria were: to include both validated SNPs with minor allele frequency (MAF) > 0.05, which were also potentially functional SNPs (missense, located in putative splice-site sequences or in both 5'-UP and 3'-DS regions) and/or were SNPs that tagged common haplotypes (minor haplotype frequency of 0.05), according to Haploview analysis of HapMap information on these genes. Genotyping was performed by quantitative real-time PCR. SNPs rs8191973, rs7331124, rs7323932, and rs8191974 in *GAS6* and rs869016 in *MERTK*, were genotyped using FRET probes in a LightCycler<sup>®</sup> 480 System (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Amplification primers and probes were designed and synthesized by TIBMOLBIOL (Berlin, Germany). Genotypes of rs2277537, rs16971872, rs2289743, rs12259 in *TYRO3*, rs4802113, rs2304234, rs2304232 in *AXL* and rs10496440, rs7573344, rs17835605 in *MERTK* were genotyped by TaqMan probes in an ABI 7900HT instrument (Applied Biosystems, Paisley, UK), following manufacturer's recommendations. SNP association analysis was performed as reported previously using the

SPSS package and SNPStats web tool. Detailed protocols and information on the SNP selection criteria are provided in Hurtado *et al.* [23].

#### Statistical analysis

Statistical Analysis was performed with Graphpad Prism v 4.02 (Graphpad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Continuous results are expressed as mean  $\pm$  SD, unless indicated otherwise. Comparisons were made with Student's *t*-test for equal variances or the Mann-Whitney test if variances were different. As treatment with oral anticoagulation affects ProS and Gas6 [12,31], we performed comparisons between SLE patients and controls in the whole groups and after excluding patients who were under oral anticoagulation treatment. Comparisons among plasma parameters and SLEDAI were performed using the Kruskal-Wallis test. Correlation among plasma parameters was evaluated with Pearson's linear regression. *P*-values lower than 0.05 were considered statistically significant. The numbers of each genotype observed were compared with those expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium with the chi-squared test.

## Results

### Patients

Fifty patients with SLE were analyzed. The main demographic and clinical characteristics are depicted in Table 1. Of note, five out of twenty-eight patients (18%) with lupus nephritis developed renal failure, defined as glomerular filtration rate < 60 mL/minute per 1.73 m<sup>2</sup>. In addition, five patients (10%) were on oral anticoagulant therapy.

### Plasma values of GAS6/ProS-TAM system parameters in SLE and controls

The different protein components of the GAS6/ProS-TAM system were measured in the samples of 50 SLE patients and 50 age- and sex-matched controls (Table 2). The three soluble forms of the TAM receptors were increased in the 50 patients of SLE compared with age- and sex-matched controls (Figure 1a-c). Soluble Tyro3 had the largest increase in concentration, more than double the concentration of the control group (1.65  $\pm$  0.93 ng/mL in controls versus 3.62  $\pm$  1.13 ng/mL in SLE patients), followed by sAxl (1.3-fold increase), and sMerTK (1.2-fold increase).

In contrast to the receptors, the ligands followed opposite behaviours (Figure 1d-f); while GAS6 values increased 1.2-fold compared to controls, total and free ProS decreased in SLE patients. The decrease was particularly important in free ProS, at more than 30% of the control values. Comparisons were also made after excluding the five patients on anticoagulant therapy, as ProS and GAS6 concentrations are affected by it [12,31], and there were similar significant differences (GAS6 32.2  $\pm$  10.3 ng/mL, *P* = 0.008; total ProS 87.4  $\pm$  16.0% of control plasma; free

**Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls**

	SLE patients (n = 50)	Healthy controls (n = 50)
Demographic characteristics		
Age at study, years, mean ± SD	40.2 ± 10.5	40.3 ± 10.6
Sex, female:male	48:2	48:2
Clinical characteristics		
Arthritis, n (%)	49 (98%)	
Skin involvement, n (%)	41 (82%)	
Glomerulonephritis (class), n (%)	28 (56%)	
	Class IV: 21	
	Class V: 3	
	Class III: 2	
	Class II: 2	
Haematologic involvement, n (%)	21 (42%)	
	Hemolytic anemia 2.2%	
	Thrombocytopenia 34%	
Serositis, n (%)	14 (28%)	
Neurological involvement, n (%)	8 (16%)	
SLEDAI score, mean ± SD (range)	5.92 ± 5.89 (0, 26)	
SLICC score mean ± SD (range)	1.52 ± 1.59 (0, 7)	
Oral anticoagulation, n	5	0

SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics; n, number of patients or controls.

ProS 71.7 ± 21.0% of control plasma,  $P < 0.0001$  in both cases). After applying the Bonferroni correction for multiple comparisons in the plasma measurements, sTyrO3 and free ProS concentrations remained significantly higher in the SLE group compared to controls.

#### Disease activity, severity and plasma values of GAS6/ProS-TAM system parameters

Several measures of the GAS6/ProS-TAM system correlated with the severity of the disease (Figure 2). For instance, when we compared the group of patients with a SLEDAI score lower than 3 ( $n = 18$ ) with those patients with a higher SLEDAI score ( $n = 32$ ), there was a significant difference in GAS6 plasma concentration ( $P = 0.005$ ), with  $27.0 \pm 1.9$  ng/mL in the low-score group and  $35.3 \pm 1.9$  ng/mL in

the high score group (Figure 2A). Indeed, the low SLEDAI-score group had the same GAS6 plasma concentration as the control group. This difference remained significant when the five patients on oral anticoagulants were excluded ( $P = 0.003$ ). In contrast, the TAM receptors had only moderate increases in the high SLEDAI group for sTyrO3 ( $3.2 \pm 1.0$  ng/mL vs  $3.9 \pm 1.1$  ng/mL;  $P = 0.03$ ) (Figure 2B); or no differences for sAxl ( $31.3 \pm 12.0$  ng/mL vs  $36.8 \pm 15.3$  ng/mL;  $P = 0.26$ ) and sMerTK ( $19.2 \pm 10.3$  ng/mL vs  $22.3 \pm 11.0$  ng/mL;  $P = 0.29$ ) (data not shown). ProS parameters were also similar in high and low SLEDAI groups when the five patients who were receiving oral anticoagulation were excluded from the analysis (total ProS  $84.6 \pm 3.4\%$  vs  $91.6 \pm 3.0\%$ ;  $P = 0.13$ ; free ProS  $71.2 \pm 4.5\%$  vs  $72.4 \pm 4.2\%$ ;  $P = 0.8$ ).

GAS6, sMerTK, and sTyrO3 showed a significant positive linear correlation with SLEDAI, but not sAxl (Table 3). While total ProS showed a negative significant correlation with SLEDAI, free ProS values showed no significant correlation. In contrast, no parameter correlated with the SLE-associated injury score, as measured by SLICC, with sMerTK being marginally significant (Table 3).

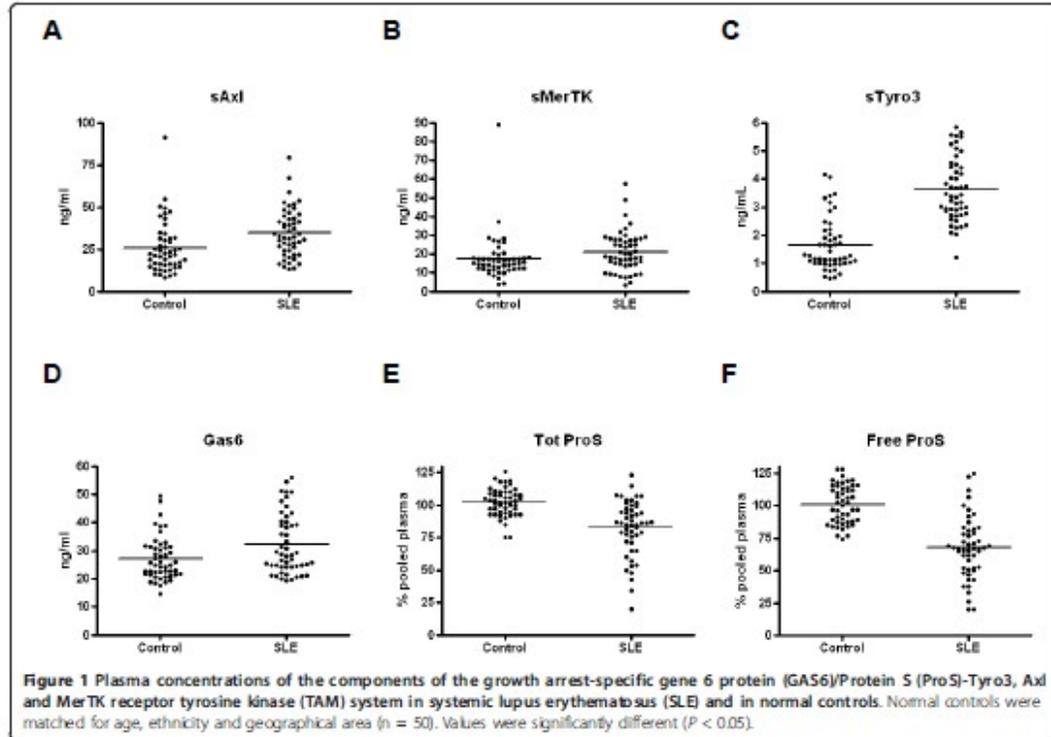
#### Differences in GAS6/ProS-TAM in specific SLEDAI manifestations

Patients with renal failure ( $n = 5$ ) presented higher values of GAS6 ( $42.5 \pm 4.0$  ng/mL vs  $31.2 \pm 1.5$  ng/mL;  $P = 0.023$ ); MerTK ( $31.4 \pm 7.3$  ng/mL vs  $20.1 \pm 1.4$  ng/mL;

**Table 2 Plasma values of the GAS6/ProS-TAM system in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls**

	SLE patients (n = 50)	Healthy controls (n = 50)	P
sAxl, ng/mL	34.8 ± 14.3	25.9 ± 15.3	0.0036
sMerTK, ng/mL	21.2 ± 10.8	17.4 ± 12.1	0.0122
sTyrO3, ng/mL	3.62 ± 1.13	1.65 ± 0.93	< 0.0001*
GAS6, ng/mL	32.3 ± 1.50	27.2 ± 1.08	0.0067
ProS, total, %	82.6 ± 3.03	102.4 ± 1.52	< 0.0001
ProS, free, %	67.6 ± 3.34	101.0 ± 2.07	< 0.0001*

Quantitative variables as expressed as mean ± standard deviation. \*Significant after Bonferroni correction for multiple comparisons.



**Figure 1** Plasma concentrations of the components of the growth arrest-specific gene 6 protein (GAS6)/Protein S (ProS)-Tyro3, AxI and MerTK receptor tyrosine kinase (TAM) system in systemic lupus erythematosus (SLE) and in normal controls. Normal controls were matched for age, ethnicity and geographical area ( $n = 50$ ). Values were significantly different ( $P < 0.05$ ).

$P = 0.024$ ); and Tyro3 ( $4.6 \pm 0.4$  ng/mL vs  $3.5 \pm 0.2$  ng/mL;  $P = 0.031$ ). When the 28 patients with different degrees of glomerulonephritis were excluded from the analysis, all measurements remained significantly different in SLE patients compared to controls, with the exception of sMerTK (not shown). From the rest of the manifestations, only thrombocytopenia showed significant differences in GAS6 values, increasing to  $38.1 \pm 3.5$  ng/mL compared to  $30.0 \pm 1.5$  ng/mL ( $P = 0.017$ ), while signs of haemolytic anaemia increased MerTK values to  $27.3 \pm 3.7$  ng/mL compared to  $19.5 \pm 1.6$  ng/mL in patients without anaemia ( $P = 0.032$ ).

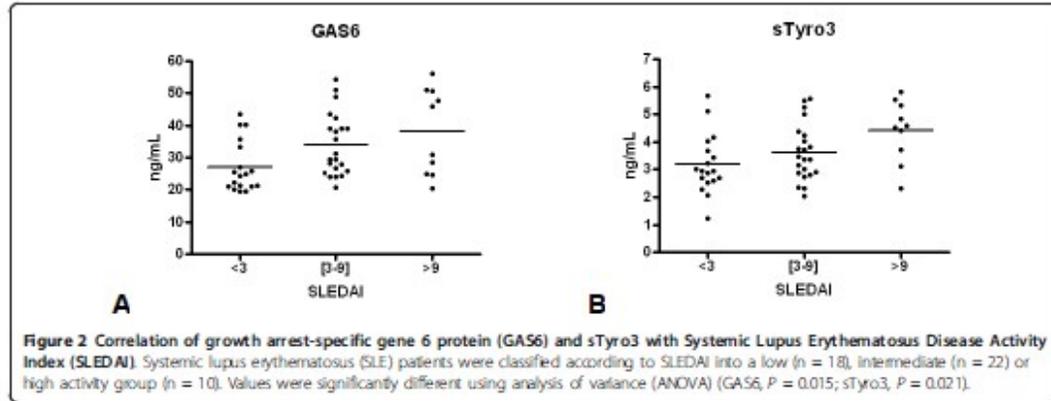
#### GAS6-TAM genetic variants and plasma concentrations in lupus and control patients

Next, we genotyped SNPs of the GAS6/ProS-TAM genes selected from a previously described population of patients with atherosclerotic disease and controls in the same geographical area [23,24]. From those determined, three SNPs showed clear differences among genotypes in their gene product plasma concentrations. For SNP rs869016 in *MERTK* intron 1 ( $c.61 \pm 2737G > A$ ), most of the difference in sMerTK concentration could be attributed to the AA group. The concentration of sMerTK increased from

$12.3 \pm 1.8$  ng/mL in five AA controls to  $29.3 \pm 5.5$  ng/mL in the eight AA homozygote patients. This concentration was significantly higher compared to the AG and GG patients ( $P = 0.019$ ). Genotypes carrying the A allele of GAS6 intron 8 SNP variant (rs8191974) increased from  $26.2 \pm 1.3$  ng/mL in 33 AA  $\pm$  AG controls compared to  $33.1 \pm 1.8$  ng/mL in 31 SLE patients ( $P = 0.002$ ), while there was no difference in the GG group (Figure 3). In the case of *AXL*, the observed increase in sAxI could be attributed to carriers of the G allele ( $24.6 \pm 5.2$  ng/mL in 17 GG  $\pm$  AG controls compared to  $41.2 \pm 3.8$  ng/mL in 19 AG SLE patients), while no differences were observed in the AA genotype between SLE and controls. No differences in plasma concentrations were observed in relation to the other SNPs genotyped.

#### Discussion

The GAS6/ProS-TAM system of vitamin K-dependent ligands and tyrosine kinase membrane receptors could have a prominent role in SLE, based in the observed phenotype of TAM knockout mice models [6,8]. Recent reports have evaluated the plasma concentrations of the soluble forms of the TAM receptors and ligands in SLE [18,20,22]. In the present study we measured all parameters



in a population of SLE patients and compared them with a control population and with the activity of disease. The general pattern of variation of the GAS6/ProS-TAM system parameters in SLE is similar in the studies available, although we found a higher increase in sTyro3 and sAxI, while there was only a moderate increase in sMerTK plasma concentration, in contrast to a previous work [20]. The concentrations of the three receptors were in the ranges reported in most previously published studies, with sTyro3 < sMerTK < sAxI. Remarkably, both ligands, the vitamin K-dependent ProS and GAS6, were significantly different in the control and SLE populations, with higher GAS6 concentration and lower ProS in SLE patients. Previous results found a negative correlation between disease and free ProS, but no significant decrease [18]. GAS6 was found to be increased and correlated with SLEDAI in two studies [22,32], but not in a smaller sample [18]. Most likely, the differences among studies are due to the intrinsic heterogeneity of the populations in each case. Some studies have indicated that specific traits of SLE evaluated in SLEDAI, such as nephritis [20,22] or neurologic disorder [18], affect the values of GAS6 or sMerTK. We confirmed higher values of both GAS6 and sMerTK in patients with

renal failure. In accordance with these findings, higher values of GAS6 have been reported in chronic renal failure [33]. The sMerTK values seem linked to kidney disease, as the increase was mainly in patients with renal failure. This was not the case for the other parameters.

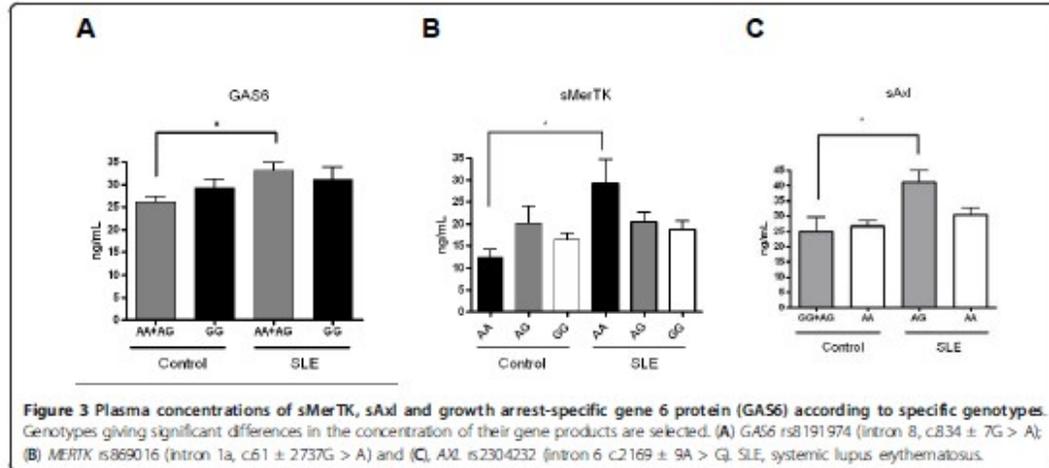
A second source of heterogeneity is the effect of specific genetic factors on the plasma concentrations of GAS6, sAxI and sMerTK. Different populations are likely to present differences in the genetic distribution of the alleles studied, and this could be reflected in the plasma concentrations of the proteins. Indeed certain GAS6 variants have shown considerable differences between populations from Europe and Asia [23,24,34,35]. If some of these variants would have functional consequences, this could be reflected in plasma concentrations of the gene products. Due to the design and sample size of the study, it was not our goal to analyze the SNP distribution in SLE compared to the healthy population. A previous study in a Korean SLE population found no association between the risk of SLE and several *MERTK* polymorphisms, but found an association with leuco- and/or lymphopenia in SLE patients [36]. A recent study of GAS6 SNPs showed linkage with traits of SLE, including vasculitis (rs1803628) and thrombocytopenia (rs8191974), suggesting that larger studies could find associations between these genes and the development of certain disease traits [37].

Several parameters of the GAS6/ProS-TAM system correlated with the activity of disease measured through the SLEDAI score in our study, in line with previous findings [18,20,22]. We found significant positive correlations of SLEDAI with GAS6, sMerTK and sTyro3, similar to Wu *et al.* [20], but contrary to Ekman *et al.* [22], the concentration of sAxI did not correlate with the SLEDAI, while levels were found to be increased in both studies. It is possible that sAxI is correlated only indirectly with the disease activity, and thus this correlation is lost in some populations. It is interesting to note that sMerTK was the only

**Table 3** Linear correlations of plasma values with SLEDAI and SLICC scores

	SLEDAI		SLICC	
	Pearson's <i>r</i>	<i>P</i>	Pearson's <i>r</i>	<i>P</i>
GAS6	0.327	0.021	0.187	0.193
Total ProS	-0.359	0.01	0.050	0.741
Free ProS	-0.233	0.103	0.052	0.735
sAxI	-0.008	0.957	0.185	0.198
sMerTK	0.425	0.002	0.285	0.045
sTyro3	0.437	0.001	0.118	0.414

SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology; GAS6, growth arrest-specific gene 6 protein.



parameter of the system correlated with damage caused by the disease as measured by SLICC.

Although the mechanism and significance underlying the observed differences in SLE patients cannot be inferred from the studies published until now, it is interesting to note that while GAS6 follows the soluble TAM receptors, augmenting SLE, ProS does not. GAS6 forms a stable complex with sAxl in human serum, where sAxl molar concentration is in excess of GAS6, blocking the activity of the ligand [38]. Furthermore, it has been shown that the presence of GAS6 activates the recycling of Axl receptors in the cell membrane [39]. Therefore, the increase observed in sTyro3, sAxl and GAS6 could reflect an increase in TAM regulatory activity due to the inflammation derived from the illness [40]. In this context, it is interesting to note that inflammatory molecules such as bacterial lipopolysaccharide induce TAM shedding [41]. The role of GAS6 activation of Axl and MerTK has been shown to be down-regulatory of the inflammatory innate response for several of its cellular components, including dendritic cells, natural killer cells and macrophages [40].

A second mechanism that could be reflecting the association of GAS6/ProS-TAM measurements and SLE is efferocytosis. Apoptotic cells, if not cleared properly, could release cellular contents that become self-antigens and develop the autoimmune reactions characteristic of pathologies such as SLE [4]. Presence of apoptotic cells in lymphatic tissue and decreased engulfment of apoptotic cells by macrophages and dendritic cells have been reported in SLE patients [42,43]. TAM kinases, and in particular MerTK, is essential in the proper clearance of apoptotic cells [40,44]. Some studies have suggested that the relevant MerTK ligand is ProS [45,46], but GAS6 has also been shown to activate MerTK [47]. ProS concentration is

almost 1,000 times that of GAS6 in serum, and ProS has been shown to be the main serum adjuvant in efferocytosis [48]. The decrease of ProS detected in SLE patients is not large enough to be diagnosed as acquired ProS deficiency, and therefore, it is unlikely to have a strong effect on the risk of thrombosis. Still, it could have important consequences in the case of apoptotic cell clearance, which could be accentuated in SLE macrophages and dendritic cells [42,43,49].

### Conclusions

Here we show the association of several parameters related to the activity of TAM receptors and their ligands in patients with SLE. As suggested by other reports, GAS6 and other components of the system could be good markers of the development of SLE. Further studies with larger populations are needed in order to validate this assumption, as well as to determine the possible genetic components that could be best linked to the disease.

### Abbreviations

ANOVA: analysis of variance; C4BP: C4b-binding protein; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GAS6: growth arrest-specific gene 6 protein; Ig: immunoglobulin; kDa: kiloDalton; MAF: minor allele frequency; PBS: phosphate-buffered saline; PCR: polymerase chain reaction; ProS: protein S; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology; SNPs: single nucleotide polymorphisms; TAM: Tyro3, Axl and MerTK receptor tyrosine kinases; VKDP: vitamin K-dependent glycoprotein.

### Authors' contributions

PRP executed experiments, and analysed the data. DT designed experiments, supplied samples, clinical and laboratory data, and interpreted results. GE supplied samples and clinical data, and interpreted results. BH executed molecular genetic experiments and analysed the data. NS provided

molecular genetic experimental resources and interpreted results. RC supplied samples and clinical data, and interpreted results. JCR conceived and designed experiments, supplied samples and clinical data, and interpreted results. PGDF conceived and designed the study, analysed and interpreted data and wrote the manuscript. All authors edited the manuscript, and read and approved the final version of the manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Acknowledgements

The research was supported by grants BFU2007-61699 and BFU2010-22185 from the Spanish Ministry of Science and Innovation and Marató de TV3 project 080121. BH was recipient of a JAE-doc contract, supported by the FEDER program from the IJ. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URIC).

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Cell Death and Proliferation, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IBB-CSIC, IDIBAPS), C/ Roselló 161 6<sup>a</sup>, Barcelona, 08036, Spain. <sup>2</sup>Department of Hemotherapy and Hemostasis, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic, University of Barcelona, C/ Villarroel 170, Barcelona, 08036, Spain. <sup>3</sup>Department of Autoimmune Diseases, Institut Clinic de Medicina i Dermatologia, Hospital Clinic, C/ Villarroel 170, Barcelona, 08036, Spain. <sup>4</sup>Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia (IDIBELL-ICO), Gran Via, km 2.7 s/n, L'Hospitalet de Llobregat, 08907, Spain.

Received: 31 October 2012 Revised: 4 February 2013

Accepted: 11 March 2013 Published: 12 March 2013

#### References

1. Tsokos GC: Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011, **365**:2110-2121.
2. Lauber K, Blumenthal SG, Walzel M, Wesselborg S: Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004, **14**:277-287.
3. Ravichandran KS: Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 2011, **35**:445-455.
4. Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Hermans M, van der Vliet A: Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008, **17**:371-375.
5. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsuhashi GK: Macrophages and dendritic cells use different Ax1/Merk1/Tyros3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol* 2007, **178**:5635-5640.
6. Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsuhashi G, Resp EA: Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* 2002, **196**:135-140.
7. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Resp EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsuhashi GK: Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001, **411**:207-211.
8. Lu Q, Lemke G: Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001, **293**:306-311.
9. Bellido-Martin L, de Frutos PG: Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Witam Horm* 2008, **78**:185-209.
10. Eneas P, Dahlback B, Garcia de Frutos P: The first laminin G-type domain in the SHBG-like region of protein S contains residues essential for activation of the receptor tyrosine kinase sky. *Biol Chem* 2000, **381**:199-209.
11. Sasaki T, Kryazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Gohring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E: Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J* 2006, **25**:80-87.
12. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B: Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:1280-1286.
13. Hackberg TM, Rosing J: Protein S as cofactor for TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:2015-2020.
14. Nyberg P, He X, Hardig Y, Dahlback B, Garcia de Frutos P: Stimulation of Sky tyrosine phosphorylation by bovine protein S-domains involved in the receptor-ligand interaction. *Eur J Biochem* 1997, **246**:147-154.
15. Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N: Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007, **98**:543-556.
16. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Vannum BC, Henson PM, Graham DK: A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood* 2007, **109**:1026-1033.
17. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazie SF: A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 2011, **481**:190-194.
18. Suh CH, Hilliard B, Li S, Merrill JT, Cohen PL: TAM receptor ligands in lupus: protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R146.
19. Birman C, Jansen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Dahlback B: Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2010, **49**:1064-1069.
20. Wu J, Birman C, Jansen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Gottsater A, Lindblad B, Lindqvist E, Saxne T, Dahlback B: Increased plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis. *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:R62.
21. Brouwer JL, Bijl M, Veeger NJ, Klein-Nelms HC, van der Meer J: The contribution of inherited and acquired thrombophilic defects, alone or combined with antiphospholipid antibodies, to venous and arterial thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2004, **104**:143-148.
22. Birman C, Jansen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Dahlback B: Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2011, **50**:1064-1069.
23. Hurtado B, Abasolo N, Munoz X, Garcia N, Benavente Y, Rubio F, Garcia de Frutos P, Krupinski J, Sala N: Association study between polymorphisms in GAS6-TAM genes and carotid atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2010, **104**:592-598.
24. Munoz X, Obach V, Hurtado B, de Frutos PG, Chamorro A, Sala N: Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke. *Thromb Haemost* 2007, **98**:406-412.
25. Munoz X, Sumoy L, Ramirez-Lorca R, Villar J, de Frutos PG, Sala N: Human vitamin K-dependent GAS6: gene structure, allelic variation, and association with stroke. *Hum Mutat* 2004, **23**:506-512.
26. Hochberg MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997, **40**:1725.
27. American Rheumatism Association Glossary Committee: In *Dictionary of the rheumatic diseases signs and symptoms*. Volume 1. 1 edition. Bayport, New York: Contact Associates International; 1982:1-80.
28. Bombardier C, Gidman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH: Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992, **35**:630-640.
29. Gidman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Girafer E, Gordon C, Harley JG, Isenberg DA, Kalunian K, Nived O, Petri M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G: The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997, **40**:809-813.
30. Aciato F, Sainaghi PP, Castello I, Bergamasco L, Carmielotto S, Avarzi GC: 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.
31. Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B: Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type II deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 1995, **85**:3524-3531.
32. Kim HA, Nam JY, Jeon JY, An JM, Jung JY, Bae CB, Suh CH: Serum growth arrest-specific protein 6 levels are a reliable biomarker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2013, **33**:143-150.
33. Lee U, Hilliard B, Swami A, Madala JC, Rao S, Patel T, Gaughan JP, Lee J, Gadegebelu CA, Choi ET, Cohen PL: Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27**:4166-4172.
34. Lee CH, Chu NF, Shieh YS, Hung YJ: The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G > A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, **95**:201-206.

35. Jang HY, Lee KH, Schneider C, O WS, Tang PL, Chow PH: The growth arrest specific gene (gas6) protein is expressed in abnormal embryos sired by male golden hamsters with accessory sex glands removed. *Anat Embryol (Berl)* 2001, **203**:343-355.
36. Cheong HS, Lee SQ, Choi CB, Sung YK, Shin HD, Bae SC: MERTK polymorphisms associated with risk of haematological disorders among Korean SLE patients. *Rheumatology (Oxford)* 2007, **46**:209-214.
37. Wu CS, Hu CY, Chan CJ, Chang SK, Hsu PN: Genetic polymorphism of the growth arrest-specific 6 gene is associated with cutaneous vasculitis in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2012, **31**:1443-1448.
38. Ekman C, Stenhoff J, Dahlback B: Gas6 is complexed to soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost* 2010, **8**: 838-844.
39. Mishra A, Wang J, Shiozawa Y, McGee S, Kim J, Jung Y, Joseph J, Berry JE, Havens A, Pienta KJ, Taichman RS: Hypoxia stabilizes GAS6/Axl signaling in metastatic prostate cancer. *Mol Cancer Res* 2012, **10**:703-712.
40. Lemke G, Rothlin CV: Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:327-336.
41. Thopp E, Vaisar T, Subramanian M, Maunier L, Blobel C, Tabas I: Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase Cdelta, and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *J Biol Chem* 2011, **286**:33335-33344.
42. Geipi US, Muncz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, Voll RE, Winkler T, Kuhn A, Kalden J, Kern P, Herrmann M: Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* 2007, **28**:114-121.
43. Shao WH, Cohen PL: Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:202.
44. Prasad D, Rothlin CV, Burola P, Bustyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G: TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci* 2006, **33**:96-108.
45. Uehara H, Shacter E: Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 2008, **180**:2522-2530.
46. McCall A, Baumhaus S, Franz S, Peretti M, Morgan BP, Haslett C, Darsfield I: Glucocorticoids induce protein S-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by human macrophages. *J Immunol* 2009, **183**:2167-2175.
47. Shao WH, Zhen Y, Eisenberg RA, Cohen PL: The Mer receptor tyrosine kinase is expressed on discrete macrophage subpopulations and mainly uses Gas6 as its ligand for uptake of apoptotic cells. *Clin Immunol* 2009, **133**:138-144.
48. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Pawelecz CP, Shu H, Shacter E: Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 2003, **4**:87-91.
49. Silverman GJ: Rethinking the red wolf disease: does Protein S suppress systemic lupus erythematosus clinical activity? *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:144.

doi:10.1186/ar4199

Cite this article as: Recarte-Pelz 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 Research & Therapy* 2013 **15**:R41.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Resumen del artículo sobre la situación de Axl en insuficiencia cardiaca.

En el próximo apartado se presenta los resultados obtenidos del análisis de concentración de Axl en biopsias de corazón y de sAxl en muestras de plasma de controles sanos y pacientes de insuficiencia cardiaca “AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure”. La meta de dicho estudio era evaluar los niveles de Axl en pacientes de insuficiencia cardiaca, partiendo del hecho que el receptor se encuentra altamente expresado en el tejido del músculo cardiaco, como se mencionó en la introducción, por lo que se plantió la idea de que dicho receptor podría tener un papel relevante en dicha patología.

Primero se realizó el análisis de los valores de sAxl mediante la técnica de ELISA en muestras de plasma de 76 pacientes sanos (controles) y 192 con insuficiencia cardiaca en diferentes niveles de desarrollo de la enfermedad. Desde los primeros experimentos se observó una concentración mayor de la proteína en su forma soluble en pacientes, y aún mayor en aquellos en estadios avanzados de la enfermedad. Los promedios de la concentración de sAxl en pacientes con una fracción de eyección reducida (HF-REF) fue de  $86.3 \pm 2.0$  ng/ml, con fracción de eyección preservada (HF-PEF)  $82.8 \pm 6.3$  ng/ml, mientras que en controles fue de  $67.8 \pm 2.0$  ng/ml ( $P < 0.0001$ ). Cuando se practicó el análisis ROC para discriminar pacientes de controles, se obtuvo una respuesta positiva con un valor  $AUC = 0.715$  ( $P < 0.0001$ ). Como se comentó anteriormente, los mayores niveles de sAxl se observaron en pacientes con NYHA clase III y IV, en comparación con los de clase II ( $P = 0,0001$ ). Además de estos resultados se pudo observar que los valores de sAxl estaban correlacionados con un aumento de la presión sanguínea, disminución de la capacidad funcional, disfunción renal, fibrilación atrial, anemia y elevada bilirrubina. Dichos parámetros están asociados a un peor pronóstico para la enfermedad.

Para el análisis de las muestras de corazón, se recolectaron muestras del ventrículo izquierdo de 2 grupos, controles sanos ( $n=11$ ), y de pacientes ( $n=15$ ) con severos casos de insuficiencia cardiaca en el momento del trasplante cardiaco. A partir de las muestras congeladas, se realizaron cortes del tejido y se procedió al análisis de los mismos mediante la técnica de inmunoblot. Se observó una concentración 6 veces mayor del receptor Axl en muestras de pacientes que en controles ( $P < 0,0001$ ). Con estas pruebas se pudieron comprobar

dos planteamientos, la alta concentración de Axl en el corazón, y que los niveles del mismo se ven aumentados en pacientes con insuficiencia cardíaca. De esta manera se pudieron complementar los estudios realizados sobre las muestras de plasma, confirmando que los niveles de Axl y sAxl se ven aumentados en pacientes con la mencionada patología, y que además los niveles de dicha proteína soluble pueden ser utilizados como biomarcador de la enfermedad.

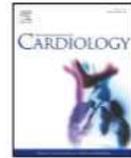
Con estos experimentos realizados se pudo comprobar los altos niveles de Axl en el corazón, y que dichos valores aumentan en pacientes con insuficiencia cardíaca. La concentración de la forma soluble de dicho receptor también se ven aumentadas a nivel plasmático en pacientes de esta enfermedad. Los resultados obtenidos no solo proponen a sAxl como un buen biomarcador de esta enfermedad, sino que además plantean que el receptor tirosina quinasa miembro del grupo TAM, puede tener un rol importante en la misma. Faltaría practicar más experimentos que permitan estudiar el efecto de Axl en el corazón, y específicamente en la insuficiencia cardíaca.

## **Artículo II. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure.**

International Journal of Cardiology. 2014 May 15;173(3):402-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.03.016.

*AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure.*

Batlle M, Recarte-Pelz P, Roig E, Castel MA, Cardona M, Farrero M, Ortiz JT, Campos B, Pulgarín MJ, Ramírez J, Pérez-Villa F, García de Frutos P.



## AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure <sup>☆,☆☆</sup>



M. Batlle <sup>a,b,\*</sup>, P. Recarte-Pelz <sup>a,c,1,2</sup>, E. Roig <sup>d,2</sup>, M.A. Castel <sup>a,b,2</sup>, M. Cardona <sup>a,b,2</sup>, M. Farrero <sup>a,b,2</sup>, J.T. Ortiz <sup>a,b,2</sup>, B. Campos <sup>e,2</sup>, M.J. Pulgarín <sup>a,b,2</sup>, J. Ramírez <sup>f,2</sup>, F. Pérez-Villa <sup>a,b,1,2</sup>, P. García de Frutos <sup>a,c,1,2</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Research Institute August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Spain

<sup>b</sup> Thorax Institute, Cardiology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Cell Death and Proliferation at Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC), Spain

<sup>d</sup> Cardiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut de Recerca Biomèdica (IIB Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Public Health, Universitat de Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Pathological Anatomy Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 September 2013

Received in revised form 1 February 2014

Accepted 9 March 2014

Available online 15 March 2014

#### Keywords:

Heart failure

AXL receptor tyrosine kinase

Prognosis

Myocardial damage

### ABSTRACT

**Background:** AXL is a membrane receptor tyrosine kinase highly expressed in the heart and has a conspicuous role in cardiovascular physiology. The role of AXL in heart failure (HF) has not been previously addressed.

**Methods and results:** AXL protein was enhanced 6-fold in myocardial biopsies of end-stage HF patients undergoing heart transplantation compared to controls from heart donors ( $P < 0.0001$ ). Next, we performed a transversal study of patients with chronic HF ( $n = 192$ ) and a group of controls with no HF ( $n = 67$ ). sAXL and BNP circulating levels were quantified and clinical and demographic data were collected.

sAXL levels in serum were higher in HF ( $86.3 \pm 2.0$  ng/mL) than in controls ( $67.8 \pm 2.0$  ng/mL;  $P < 0.0001$ ). Also, sAXL correlated with several parameters associated with worse prognosis in HF. Linear regression analysis indicated that serum creatinine, systolic blood pressure and atrial fibrillation, but not BNP levels, were predictive of sAXL levels. Cox regression analysis indicated that high sAXL values at enrollment time were related to the major HF events (all-cause mortality, heart transplantation and HF hospitalizations) at one year follow-up ( $P < 0.001$ ), adding predictive value to high BNP levels.

**Conclusions:** Myocardial expression and serum concentration of AXL is elevated in HF patients compared to controls. Furthermore, peripheral sAXL correlates with parameters associated with the progression of HF and with HF events at short term follow-up. All together these results suggest that sAXL could belong to a new molecular pathway involved in myocardial damage in HF, independent from BNP.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Heart failure (HF), characterized by a ventricular systolic or diastolic dysfunction, constitutes the end-stage of many heart diseases. Population prevalence of HF averages 2 to 3% increasing to  $\geq 10\%$  at 70 years of age or older [1,2]. Epidemiological studies report a link between HF

and low survival rates [3]. Several etiologies underlie the diagnosis of HF, including pathological remodeling of the myocardium after an infarct. Other important etiologies include cardiomyopathies, hypertension, valvular heart disease, and toxins. Therefore, we can consider HF as a multifactorial syndrome with abnormalities of cell signaling, that are reflected in the contractile function of the myocardium as well as in cardiac cell survival and death [4,5].

Receptor tyrosine kinases (RTKs) are membrane proteins recognizing extracellular signals leading to cellular responses such as proliferation, arrest or activation. AXL belongs to the Tyro3, Axl and MerTK (TAM) subfamily, of RTKs and is a protein of particular interest as a potential player in the pathophysiology of the failing heart. Although the TAM receptors were first cloned as orphan receptors, affinity purification techniques led to the identification of Growth Arrest-Specific 6 protein (GAS6) as the AXL ligand [6]. GAS6 has significant structure and sequence similarity with the vitamin K-dependent protein S, but lacks its anticoagulant activity [7]. Cells of the vasculature including

<sup>☆</sup> This work was performed at the IDIBAPS, at the Thorax Institute of Hospital Clínic de Barcelona and at the IIBB-CSIC.

<sup>☆☆</sup> Funding: This work was supported by grants from the Fundació la Marató de TV3 2008 [project 081010, project 080121] and from the Spanish Network on Heart Failure REDINSCOR [V-2006-RET0308-O] and Red de Investigaciones Cardiovasculares RIC [RD12/0042/0044], by the Instituto de Salud Carlos III, and Ministerio de Sanidad y Consumo.

\* Corresponding author. Tel.: +34 932275400 3356; fax: +34 932279305.

E-mail address: [mbatlle@clinic.cat](mailto:mbatlle@clinic.cat) (M. Batlle).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

endothelial cells, vascular smooth muscle cells and fibroblasts synthesize and express GAS6 and AXL [8,9]. According to the GeneAtlas data set, AXL is highly expressed in the heart, including cardiomyocytes, among other organs [10]. Membrane bound AXL can be shed by the effects of a Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protease (ADAM), leading to a soluble form that is detected in plasma as a stable complex with its ligand GAS6 [11,12].

The aim of this project was to analyze the AXL myocardial and serum levels in patients with HF and whether it could be useful in assessing the stage of the HF. Hence, we analyzed the relationship of sAXL with parameters that are affected in HF and estimated the value of sAXL in predicting events at one year follow-up.

## 2. Methods

### 2.1. Collection and analysis of human heart samples

Human heart samples were analyzed in 2 populations: control samples ( $n = 11$ ) were non-diseased biopsies. These samples were from organ donors whose heart could not be used for transplantation because they did not match the requirements of the potential heart receptors. Left ventricle samples were collected at the time of organ donation.

Case samples ( $n = 15$ ) were pathological human left ventricle biopsies from patients with severe HF obtained at the time of cardiac transplantation, as described previously [13]. Whenever it was possible, sample harvest of around  $1 \text{ cm}^3$  myocardial biopsies was performed in a middle region between the apex and the base. The myocardial tissue was immediately immersed in liquid nitrogen. The Ethical Committee of the affiliated institution approved the protocol.

### 2.2. Western Blot analysis of sAXL protein

Myocardial proteins were extracted from left ventricle biopsies, if possible from the anterior wall. Samples were submerged in 1 mL of ice-cold protein lysis buffer containing: 50 mM Tris HCl pH 7.5 (T5941, Sigma), 150 mM NaCl (1.06404.5000, Merck), 1% Nonidet P-40 (Tergitol solution, NP40S, Sigma), 0.5% sodium deoxycholate (D6750, Sigma), 0.1% sodium dodecyl sulfate (L5750, Sigma), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (P7626, Sigma), 1 mM sodium orthovanadate (S6508, Sigma), 1 mM Pefabloc (11429868001, Roche) and complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (11836153001, Roche). Samples were homogenized with an Omni TH homogenizer (Omni International Inc.). After 1 h of rotation at  $4^\circ\text{C}$ , samples were centrifuged at  $10,000 \text{ g}$  at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min. The upper phase was collected and the total protein concentration was quantified with the Pierce BCA protein Assay method (23227, Thermo Scientific, Pierce) relative to a BSA standard curve. Thirty micrograms of total protein extract were loaded to NuPage® 4–12% Bis-Tris Gel (NP0322) and a western blot was performed with the Novex® gels methodology (Invitrogen). Proteins were transferred from the gel to a nitrocellulose membrane using a blot gel transfer (IB3010-01) and the iBlot® Dry Blotting System. After 1 h blockade of the membrane with phosphate buffered saline solution (PBS, Fisher Scientific), 0.1% Tween 20 (P1379, Sigma-Aldrich) and 5% of skimmed milk, it was incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the AXL (c-20) primary antibody against the carboxy terminal protein of the full-length human protein diluted 1/1000 (sc-1096, Santa Cruz Biotechnology). Afterwards, the membrane was incubated during 1 h with an HRP-Rabbit anti-Goat secondary antibody diluted 1/5000 (31402 Thermo Scientific). Final detection of the AXL protein band was accomplished with the ECL kit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080, Thermo Scientific).

Quantification of the integrated density of the bands around 150 kDa was done with the ImageJ program (NIH, Maryland, USA). Each blot was loaded with 30 micrograms of a standard sample of human myocardial protein for calibration between blots. Results are given in relative units (RU) as the ratio between the integrated densities of each sample divided by the integrated density of the standard.

### 2.3. Patient enrolment and collection of clinical data

This was a transversal study of patients treated in a specialized outpatient HF clinic with chronic, stable HF with systolic dysfunction, characterized by an ejection fraction (EF) less or equal to 40% (mean evolution HF time of  $7.5 \pm 0.6$  years). Participants were recruited in a consecutive manner based on presenting the inclusion criteria from May 2009 to November 2011 in the Hospital Clinic of Barcelona and from November 2010 to October 2011 in the Hospital Sant Pau of Barcelona. Patients belonged to New York Heart Association (NYHA) functional classes II, III or IV (mainly II and III). HF patients were diagnosed and assigned to a NYHA class by a group of cardiologists specialized in heart failure and heart transplantation according to the European Society of Cardiology criteria [2]. These patients were considered to have stable HF because they did not have a hospital admission with a diagnosis of HF during the previous month before enrolment.

Historical records from these patients were retrieved and an echocardiography taken within a year from the inclusion day was used for each patient. Clinical data such as ECG data, HF evolution time, functional capacity measured as 6-minute walking test (6MWT), cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus and smoking), laboratory parameters and medication were entered for analysis. Ventricular

dilation parameters, systolic function and the EF were assessed by echocardiography. One hundred ninety-two patients were included with a major reduced left ventricular function, and were designated as HF. Patients under 18 years of age were excluded as well as patients affected by other fibroproliferative diseases such as; kidney failure (creatinine levels  $>3 \text{ mg/dL}$ ), cirrhosis, bone metabolic disease, hyperthyroidism, pulmonary fibrosis, systemic sclerosis, macular degeneration and amyloidosis.

This study complies with the Declaration of Helsinki, the Ethical Committee of the affiliated institution approved the protocol and all subjects gave written, informed consent to participate in this study.

### 2.4. Patient short term follow-up

Follow-up data of 1 year  $\pm$  1 month were obtained from either a clinical or a telephone interview or from the clinical records. The events that were recorded were as follows: hospitalizations for either HF, acute coronary syndrome, cardiorespiratory arrest, ventricular tachycardia or fibrillation; device implantation of either a pacemaker, an implantable cardioverter-defibrillator (ICD), cardiac resynchronization therapy (CRT with or without ICD); percutaneous revascularization; cardiac surgery (for either heart transplantation, coronary revascularization or others); iccus and all-cause mortality (cardiac and non-cardiac deaths).

### 2.5. Controls characteristics

Controls were a group of subjects with no HF with a lower proportion of male subjects (46%) than the patients (85%,  $P < 0.0001$ ). Controls mean age was  $48.6 \pm 2.0$  years ( $n = 67$ ) and was lower than the mean age of the patients  $61.8 \pm 0.8$  years ( $n = 192$ ,  $P < 0.0001$ ). HF patients had higher proportions of all risk factors than controls: Hypertension  $P < 0.0001$ , Dyslipidemia  $P < 0.0001$ , Diabetes Mellitus  $P < 0.01$ , Current/former smoker  $P < 0.0001$ , and Previous AMI  $P < 0.0001$ .

### 2.6. Collection and analysis of serum and plasma samples

Blood samples were collected from an antecubital vein from all HF patients and controls. Serum and plasma samples from the HF patients were collected on the enrolment day.

To measure circulating levels of BNP, whole blood was collected in a chilled tube with the anticoagulant EDTA [14]. The sample was promptly put on ice after blood extraction and was centrifuged at RCF 1800 g for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was collected, aliquoted and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Quantification of BNP plasma levels was performed and validated in the Biomedical Core Facility of the Hospital Clinic of Barcelona. Briefly, plasma BNP was quantified with a chemiluminometric immunoassay run on the ADVIA Centaur Immunochemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). The intra-assay coefficient of variation was of 1.8–4.3% CV and the inter-assay coefficient of variation was of 2.3–4.7% CV.

Serum samples for sAXL analysis were kept at room temperature for at least 30 min after blood extraction, to let the clot to be formed and were later centrifuged at RCF 1800 g for 10 min at room temperature. The supernatant was collected, aliquoted and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. A new detection method for sAXL quantification was devised in our laboratory using commercially available antibodies. Multiwell plates (96 wells, Rutilabor) were coated with the capture antibodies AFI 54 (R&D Systems) at a concentration of  $2.0 \mu\text{g/mL}$  in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2, filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$  pore). The plates were sealed and left overnight at room temperature. The plates were washed three times with wash buffer (PBS with 0.05% Tween20) and then were blocked for 1 h at room temperature with PBS containing 1% BSA (Sigma). Serum samples were diluted 200 times in PBS containing 1% BSA. A standard curve was made by serial dilution of a purified sAXL protein produced by recombinant expression of the extracellular part of AXL (R&D Systems) and concentrations are given as ng/mL. A negative control without plasma sample was used and pooled-plasma samples were used in each plate as plate controls. After sample addition, the plates were washed three times with wash buffer (PBS with 0.05% Tween20). Then, 100  $\mu\text{L}$  of the BAF154, diluted in PBS containing 1% BSA was added at a concentration of 50 ng/mL and incubated 2 h at room temperature. The aspiration/wash steps were repeated and 100  $\mu\text{L}$  of the working dilution of Streptavidin-HRP (Sigma) were added to each well. The plate was covered and incubated for 20 min at room temperature. The aspiration/wash steps were repeated and a solution of tetramethyl-benzidine (slow kinetic form; Sigma) was added to the well. The reaction was stopped with sulfuric acid at 1 M concentration. The absorbance of wells was determined with an automatic plate reader at 450 nm. Intra-assay variability was determined by evaluating eight replicates of two standard samples. The mean %CVs was 6.45 and 9.21, respectively. Inter-assay mean %CV was determined in six different plates and gave the value of 8.32.

### 2.7. Data analysis

Logarithmic transformation with base e ( $\ln$ ) was applied to sAXL and BNP values to achieve a normal distribution.  $\ln(\text{sAXL})$  and  $\ln(\text{BNP})$  were back transformed and results are discussed in the text with the original sAXL and BNP values. The independent samples T-test was applied to analyze for  $\ln(\text{sAXL})$  differences between the control and the patients groups or between two groups of patients. Patients were stratified as patients with low sAXL levels (L-sAXL: sAXL values below the 3rd quartile 98.1 ng/mL) or high sAXL (H-sAXL: sAXL values equal or above the 3rd quartile 98.1 ng/mL). Differences in

continuous variables between both groups were assessed with a U Mann–Whitney test and differences in discontinuous variables with a Chi-Square test. Values are given as mean and standard error of the mean (SEM), unless otherwise stated. We analyzed whether the continuous variables that had different mean values in the two HF groups with L-sAXL <98.1 ng/mL or H-sAXL ≥98.1 ng/mL (Tables 1 and 3), correlated with ln(sAXL) serum values with the Pearson correlation factor. The variables that were considered for a putative correlation with ln(sAXL) serum values were: systolic blood pressure, diastolic blood pressure, 6-minute walk distance, serum creatinine levels, glomerular filtration rate, C reactive protein, uric acid, hemoglobin, hematocrit and hemates and lymphocyte count. We also assessed whether there was a correlation between the sAXL serum values and the established HF biomarker BNP. All variables correlated with ln(sAXL) serum values and were introduced in the linear regression model as independent variables and ln(sAXL) serum levels as the dependant variable. ENTER and STEPWISE methods were both used for introducing the independent variables.

The relationship between ln(sAXL) and the non-continuous variables that were different between the two HF groups (sAXL <98.1 ng/mL or sAXL ≥98.1 ng/mL) was analyzed by an univariate analysis. The variables valvular etiology and congestion signs did not present statistical differences in the univariate analysis and were not further studied. The variables dyslipidemia, NYHA classification and atrial fibrillation showed differences with the univariate analysis and were introduced in the linear regression model together with the continuous variables serum creatinine levels and systolic blood pressure. Receiver–Operator Characteristic Curve (ROC) analysis of sAXL and BNP for discriminating HF patients from controls was performed. The cut-off value for calculation of the specificity and sensitivity for sAXL was the nearest point to the upper-left corner and the point with highest Youden's index value. We considered the BNP cut-off point of 35 pg/mL, because is the upper limit of the reference interval used in our clinical setting.

HF evolution measured by time to any event or to the set of events all-cause mortality, heart transplantation and hospitalizations due to HF was analysed using statistical survival techniques. The 3rd quartile value of the sAXL distribution (98.1 ng/mL) or of the BNP distribution (362.7 pg/mL) were used as cut-off points for stratification in the Kaplan–Meier survival curves, and patients were divided in three groups with sAXL above the 3rd quartile, with BNP above the 3rd quartile or with both, sAXL and BNP, above the 3rd quartile. Patients lost at the follow-up (10 out of 192) were not included in the analysis. Univariate Cox regression model was evaluated with either all events or with the three HF events; all-cause mortality, heart transplantation or HF hospitalization or with only the two major events all-cause mortality, heart transplantation as outcomes. Hazard ratios were also calculated with the Cox proportional hazard analysis. A Cox regression analysis with a forward stepwise model was performed to verify whether the variable of sAXL values belonging to the 3rd quartile added prognostic value to the evaluation of patients with BNP levels belonging to the 3rd quartile.

All P values reported are 2 sided, and those that were less than 0.05 were considered to be statistically significant. Statistics were calculated with the SPSS version 18.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

### 3. Results

#### 3.1. AXL protein is higher in myocardial samples from end-stage HF patients than in controls

Western blot analysis of myocardial biopsies from 26 individuals showed the presence of AXL as two high molecular weight bands of approximately 160, 140 kDa (Fig. 1A), and three other bands of lower molecular weight (120, 75 and 50 kDa), possibly corresponding to proteolytic fragments or splicing variants of the full length membrane receptor. The upper 160 and 140 kDa bands were quantified by densitometry and compared, showing that samples from 15 HF patients undergoing heart transplantation had a 6-fold increase in AXL immunoreactivity compared to 11 control donors with healthy hearts (1.2 ± 0.2 Relative Units (RU) versus 0.2 ± 0.05 RU;  $P < 0.0001$ , Fig. 1B).

#### 3.2. sAXL is higher in HF patients than in controls and correlates with parameters associated with the progression of HF

sAXL levels in serum were higher in patients 86.3 ± 2.0 ng/mL than in controls 67.8 ± 2.0 ng/mL ( $P < 0.0001$ , Fig. 2A). Higher sAXL values were also encountered in patients with NYHA classes III–IV 100.2 ± 4.9 ng/mL ( $n = 54$ ) compared to class II patients 80.9 ± 1.9 ng/mL ( $n = 138$ ;  $P = 0.0001$ , Fig. 2B). Similar sAXL values were found in HF patients with different etiologies, with the exception of higher values in patients with valvular etiology, when compared against all other HF patients (Table 1 and Fig. 3).

Receiver–Operator Characteristic Curve (ROC) analysis of sAXL for discriminating HF patients from controls was performed. The area

**Table 1**

Baseline demographic, prior history and clinical characteristics of HF patients stratified by sAXL 3rd quartile level.

Parameter	sAXL, ng/mL		P
	<98.1	≥98.1	
No. of patients	144	48	
<b>Demographics</b>			
Age, y.	61 ± 1	64 ± 1	ns
Male, n (%)	123 (85)	41 (85)	ns
Female, n (%)	21 (15)	7 (15)	ns
<b>Risk Factors, n (%)</b>			
Hypertension	109 (77)	34 (72)	ns
Dyslipidemia	95 (68)	20 (44)	<0.005
Diabetes Mellitus	50 (35)	16 (33)	ns
Current/former smoker	104 (73)	28 (61)	ns
Previous AMI	70 (50)	20 (44)	ns
<b>Clinical characteristics</b>			
Body Mass Index, kg/m <sup>2</sup>	28.1 ± 0.4	27.9 ± 0.8	ns
<b>NYHA classification, n (%)</b>			
II	112 (78)	26 (54)	<0.005
III–IV	32 (22)	22 (46)	<0.005
<b>Etiology, n (%)</b>			
Idiopathic	40 (28)	13 (27)	ns
Ischemic	75 (52)	18 (38)	ns
Valvular	12 (8)	11 (23)	=0.01
Hypertensive	4 (3)	1 (2)	ns
Other	13 (9)	5 (10)	ns
Heart rate, beats/min	71.5 ± 1.2	72.2 ± 2.1	ns
Systolic blood pressure, mmHg	120.0 ± 1.9	108.9 ± 2.4	< 0.005
Diastolic blood pressure, mmHg	73.3 ± 1.0	68.3 ± 1.5	< 0.01
Pulse pressure	47.1 ± 1.6	40.6 ± 2.2	ns
Abdominal perimeter, cm	102.8 ± 1.2	103.9 ± 3.1	ns
6-min walk distance, m	418 ± 8.9	372 ± 17.4	<0.05

AMI (acute myocardial infarction).

under the curve (AUC) was 0.715 and its 95% confidence interval estimate was from 0.649 to 0.782 ( $P < 0.0001$ ). A cut-off point value of 71 ng/mL of sAXL gave a 70.3% of sensitivity and 64.2% of specificity.

#### 3.3. Patients' characteristics

Comparison of the demographic and clinical characteristics of HF patients classified as patients with serum sAXL levels lower than 98.1 ng/mL, the 3rd quartile value of sAXL (L-sAXL,  $n = 144$ ) or patients with higher or equal serum sAXL levels than 98.1 ng/mL (H-sAXL,  $n = 48$ ) is summarized in Tables 1 to 4. Lower systolic arterial pressure ( $P < 0.005$ ) and lower diastolic arterial pressure ( $P < 0.01$ ) and less functional capacity measured with the 6-minute walk test ( $P < 0.05$ ) were found in the H-sAXL group when compared to the L-sAXL group (Table 1). Among common cardiovascular risk factors, lower proportion of dyslipidemia was found in the H-sAXL than in the L-sAXL group ( $P < 0.005$ , Table 1). When comparing the frequency of symptoms and signs between both groups, we found a higher proportion of patients with congestion signs, in the H-sAXL than in the L-sAXL group ( $P < 0.01$ , Table 2).

No differences in the echocardiographic characteristics were found between both groups of HF (Table 2). When comparing ECG findings, we encountered that the H-sAXL group had a higher percentage of patients with atrial fibrillation than the L-sAXL group ( $P < 0.05$ , Table 2). Patients in the H-sAXL group had higher values of BNP ( $P = 0.001$ ), serum creatinine ( $P < 0.001$ ), lower glomerular filtration rate ( $P < 0.0001$ ), higher uric acid levels ( $P < 0.05$ ) and higher C Reactive Protein ( $P < 0.01$ , Table 3). Analysis of blood parameters showed that the H-sAXL group had lower lymphocytes ( $P < 0.05$ ) and erythrocyte count ( $P = 0.001$ ), hemoglobin levels ( $P < 0.05$ ) and hematocrit ( $P < 0.05$ , Table 3). No other differences in laboratory values were found between the two subsets of patients. Pharmacological treatment was very similar in both groups except for a lower intake of statins in the H-sAXL group ( $P < 0.01$ , Table 4) and for a higher proportion of

**Table 2**  
Baseline HF symptoms and signs, ECG and echocardiographic parameters of HF patients stratified by sAXL levels.

Parameter	sAXL, ng/mL		P
	<98.1	≥98.1	
No. of patients	144	48	
<b>Symptoms and signs</b>			
Paroxysmal nocturnal dyspnea, n (%)	24 (18)	6 (15)	ns
Reduction in exercise tolerance, n (%)	56 (42)	18 (50)	ns
Orthopnea, n (%)	40 (30)	11 (28)	ns
Syncope, n (%)	19 (14)	4 (9)	ns
Lower extremity edema, n (%)	18 (13)	6 (14)	ns
Congestion signs, n (%)	4 (5)	6 (27)	<0.01
Jugular venous distension, n (%)	7 (9)	5 (24)	ns
Hepatojugular reflux, n (%)	14 (18)	4 (20)	ns
<b>ECG parameters</b>			
Sinusal rhythm, n (%)	86 (61)	24 (52)	ns
Atrial fibrillation, n (%)	9 (6)	8 (17)	<0.05
QRS length, ms	134.8 ± 3.2	134.5 ± 5.5	ns
Interval PR, ms	168.9 ± 4.0	168.6 ± 6.0	ns
Necrosis Q waves, n (%)	32 (34)	7 (24)	ns
Intervent conduct disorders, n (%)	77 (61)	28 (70)	ns
Left bundle branch block, n (%)	18 (21)	8 (29)	ns
Pacemaker, n (%)	77 (54)	29 (60)	ns
Resynchronization therapy, n (%)	19 (13)	4 (8)	ns
<b>Echocardiographic parameters</b>			
LVESD, mm	53.5 ± 1.0	53.6 ± 1.7	ns
LVEDD, mm	67.5 ± 0.8	66.9 ± 1.2	ns
LVEF, %	27.6 ± 0.6	26.5 ± 1.0	ns
LAD, mm	47.4 ± 0.7	50.5 ± 1.6	ns
IVST, mm	10.3 ± 0.1	10.8 ± 0.3	ns
LVPWT, mm	9.9 ± 0.1	10.1 ± 0.2	ns
LVH, n (%)	57 (42)	24 (53)	ns

Intervent conduct disorders (Interventricular conduction disorders), LVESD (left ventricle end-systolic diameter), LVEDD (left ventricle end-diastolic diameter), LVEF (left ventricle ejection fraction), LAD (Left atrial diameter), IVST (Interventricular septum thickness), LVPWT (Left ventricular posterior wall thickness), LVH (Left Ventricular Hypertrophy defined as IVST ≥ 11 mm).

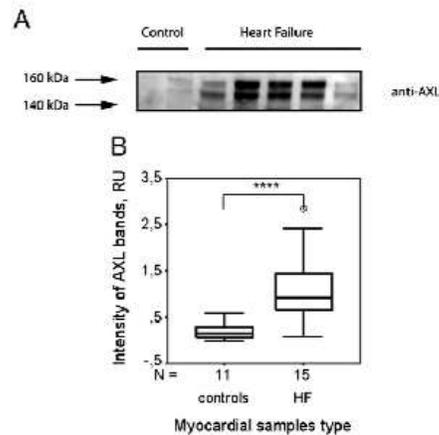
patients taking diuretics, oral digoxin and antiarrhythmics in this group that almost reached significant differences.

#### 3.4. Analysis of sAXL with other clinical variables

We next analyzed whether the continuous variables that had different mean values in the two HF groups with L-sAXL <98.1 ng/mL or H-sAXL ≥98.1 ng/mL (Tables 1 to 3), correlated with ln(sAXL) serum values with the Pearson correlation factor. We found that ln(sAXL) serum values directly correlated with ln(BNP) ( $R = 0.270$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 167$ ) serum creatinine levels ( $R = 0.36$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 189$ ), C reactive protein ( $R = 0.227$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 143$ ), uric acid ( $R = 0.253$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 132$ ) and inversely with systolic blood pressure ( $R = -0.323$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 184$ ), diastolic blood pressure ( $R = -0.238$ ,  $P = 0.001$ ,  $n = 183$ ), 6-minute walk distance ( $R = -0.207$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 171$ ), glomerular filtration rate ( $R = -0.296$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 178$ ), hemoglobin ( $R = -0.217$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 187$ ), hematocrit ( $R = -0.207$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 189$ ), hematies count ( $R = -0.243$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 183$ ) and lymphocytes count ( $R = -0.211$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 188$ ).

Evaluation of the putative interaction between ln(sAXL) and the continuous variables that correlated with ln(sAXL) was done with a linear regression method with ln(sAXL) as a dependant variable. We found that serum creatinine levels ( $P < 0.0001$ ) and systolic blood pressure ( $P < 0.001$ ) were predictive of ln(sAXL) serum levels. And all other continuous variables, including BNP, were not predictive. When we introduced non-continuous variables in the linear regression model atrial fibrillation was predictive of ln(sAXL) ( $P < 0.001$ ) together with serum creatinine levels and systolic blood pressure.

We also analyzed whether sAXL levels correlated with variables such as age, gender, and risk factors in controls. Higher sAXL values were quantified in female controls ( $73.2 \pm 3.5$  ng/mL,  $n = 36$ ) than in



**Fig. 1.** Western Blot analysis of AXL expression in myocardial biopsies. A, representative western blot of myocardial biopsies from 2 healthy (control) and 5 pathological (heart failure) left ventricle samples. Thirty micrograms of protein were loaded in each lane. AXL (upper panel) appears as a doublet of 140–160 kDa bands. B, Quantification of the 140 and 160 kDa AXL bands by densitometry of 3 different blots with control ( $n = 11$ ) and heart failure ( $n = 15$ ) samples. Results were compared with a T-test (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

male controls ( $64.5 \pm 3.3$  ng/mL,  $n = 31$ ) but the difference was not statistically different. No differences of sAXL levels were found with controls age, and common cardiovascular risk factors (data not shown).

#### 3.5. Analysis of sAXL in one year follow-up events

At 1 year ± 1 month after enrollment 52 patients out of 182 (29%) had had at least one event of any kind and the remaining 130 patients did not have any event (71%). When considering only major HF events (all-cause mortality, cardiac transplantation or HF hospitalizations), 33 patients had an event (18%) and 149 (82%) did not have any HF event. Kaplan–Meier survival curves and Cox regression analysis showed time course differences in patients that suffered from major HF events between patients with sAXL values lower or higher than the cut-off point of the 3rd quartile 98.1 ng/mL ( $P < 0.001$ , Fig. 4A). A 35% of patients with sAXL values higher than 98.1 ng/mL had suffered one of these events one year after enrollment, and their hazard ratio (HR) was 3.31. Such differences were also observed between patients with BNP values lower or higher than the cut-off point of the 3rd quartile 362.7 pg/mL ( $P < 0.0001$ , Fig. 4B). A total of 42% of patients with BNP values higher than 362.7 pg/mL presented a major HF event at one year follow-up, and the HR of these patients was 4.4. When we classified patients with a combination of both, sAXL and BNP, values above the 3rd quartile or not, we found higher differences in the Cox regression model ( $P < 0.0001$ , Fig. 4B) than when considering sAXL or BNP values alone. In this case, the percentage of patients in the high sAXL and BNP group that had undergone all-cause mortality, transplantation or HF hospitalizations rose to 62% and the HR to 6.77. Furthermore, a Cox regression analysis with a forward stepwise model showed that the addition of the variable of patients belonging to the sAXL 3rd quartile added prognostic value for major HF events to the variable of patients belonging to the BNP 3rd quartile ( $p < 0.05$ ).

Remarkably, when considering only the major events all-cause mortality and heart transplantation, Kaplan–Meier curves and Cox regression analysis with patients with high sAXL also showed differences when compared to patients with low sAXL values ( $P < 0.001$ , HR = 4.40). Those differences were also found when analyzing patients according to their BNP levels ( $P < 0.001$ , HR = 5.14) and were higher when comparing patients with both high sAXL and BNP levels and the rest ( $P < 0.0001$ , HR = 8.54).

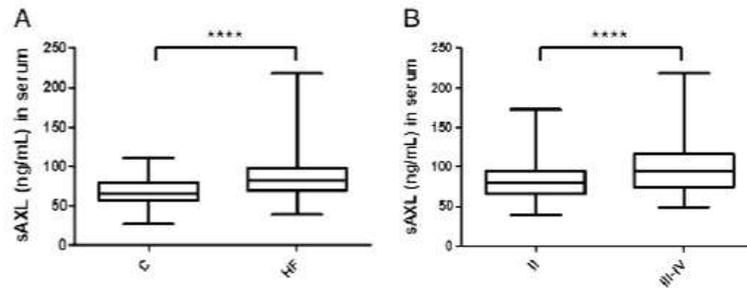


Fig. 2. Serum sAXL values from controls and HF patients. A, Boxplot of serum sAXL from controls (C) and heart failure (HF) patients. B, sAXL serum levels from HF patients belonging to NYHA functional class 2 (II) or 3–4 (III–IV). Ln-sAXL between groups was compared with a T-test (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

Kaplan–Meier curves and Cox regression analysis considering all types of events together also presented differences between patients with high and low sAXL ( $P < 0.05$ , HR = 1.85) but the differences were less than when considering only the major HF events or only all-cause mortality and heart transplantation. The survival curves with all events were also different for patients with BNP values above the 3rd quartile ( $P < 0.001$ , HR = 3.04) or with both BNP and sAXL values above the 3rd quartile ( $P < 0.001$ , HR = 4.13).

#### 4. Discussion

In this report we demonstrate for the first time that AXL is expressed in the heart and that is increased in myocardial tissue from HF patients compared to healthy hearts and, in accordance with this over-expression, the serum concentration of sAXL is higher in HF patients than in controls. Furthermore, sAXL levels increase in aggravated HF, in patients with functional classes III–IV and with multiple clinical parameters that indicate a worse HF prognosis but no correlation with echocardiographic parameters was found. Also, linear regression analysis showed that BNP levels did not predict sAXL levels, suggesting that both proteins are elevated through independent mechanisms.

High sAXL values at the enrollment time were related to the HF events all-cause mortality, transplantation or HF hospitalizations at one year follow-up and it added predictive value to high BNP levels. All together these results, suggest that sAXL can be a novel player of the HF pathophysiology, acting in a BNP independent pathway.

The detection of AXL protein in myocardial biopsies confirms results in silico that showed a relatively high expression of AXL probes in heart and cardiomyocytes (Gene atlas, human probe 202686\_s\_at) [10]. Moreover, it suggests that at least part of the soluble receptor detected in serum could be originated in heart after specific proteolytic shedding, as has been shown in other cell types [12].

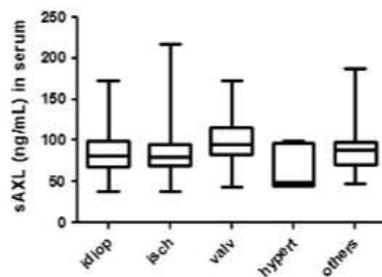


Fig. 3. Serum sAXL levels from HF patients with different HF etiologies. Boxplot of serum sAXL from HF patients divided in 5 different groups according to their etiology: idiopathic (idiop), ischemic (isch), valvular (valv), hypertensive (hypert) and others.

Currently, we do not know the role of AXL in HF and whether its expression is deleterious for the heart or if it is a compensatory mechanism. The GAS6/AXL interaction has demonstrated a prominent role in vascular physiology, including biological processes implicated in HF such as inflammation, tissue remodeling, vascular calcification and atherosclerosis [15,16]. Tjwa et al. [17] showed that GAS6 facilitates the interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes under inflammatory conditions. This mechanism is likely mediated by AXL, as AXL knockout mice present lower extravasated cells after vascular injury [18]. AXL also appears to have an important role in the vascular response to different injuries, including mechanical damage and hypertension-associated vascular remodeling [18–21]. A third process where AXL plays a prominent role is vascular calcification. AXL activation prevents the osteogenic differentiation of pericytes and vascular smooth muscle phosphate induced calcification [22,23]. In addition, Son et al. described the GAS6/AXL pathway as a central interface for the protective effects of statins on vascular smooth muscle calcification [24]. Finally, AXL has also been found to have a role in atherosclerosis [8,9]. Our results showed correlation of sAXL levels with the inflammatory parameter C-reactive protein (CRP) [25] in HF patients. On the other hand, we find a higher proportion of dyslipidemia in patients with lower values of sAXL, which would not sustain a role of AXL in the atherosclerosis process in this group of patients with HF.

Table 3  
Baseline laboratory values of HF patients stratified by sAXL levels.

Parameter	sAXL, ng/mL		P
	<98.1	≥98.1	
No. of patients	144	48	
BNP, pg/mL	251.9 ± 37.1	456.6 ± 69.2	= 0.001
Serum creatinine, mg/dL	1.12 ± 0.03	1.36 ± 0.07	<0.001
Glomerular filtration rate, mL/min	57.9 ± 0.7	52.2 ± 1.7	<0.0001
Sodium, mEq/L	140.0 ± 0.3	139.3 ± 0.6	ns
Potassium, mEq/L	4.6 ± 0.04	4.5 ± 0.09	ns
Aspartate aminotransferase, U/L	24.4 ± 0.7	31.9 ± 5.7	ns
Alanine aminotransferase, U/L	25.6 ± 1.3	33.6 ± 8.3	ns
Bilirubin, mg/dL	0.80 ± 0.04	0.88 ± 0.07	ns
Uric acid mg/dL	6.70 ± 0.17	7.84 ± 0.43	<0.05
Glucose, mg/dL	114.9 ± 3.1	115.2 ± 4.3	ns
Total Cholesterol, mg/dL	169.0 ± 3.2	170.8 ± 5.8	ns
HDL Cholesterol, mg/dL	40.9 ± 0.8	40.1 ± 1.7	ns
LDL Cholesterol, mg/dL	103.1 ± 2.6	103.8 ± 5.3	ns
Triglycerides, mg/dL	127.3 ± 5.1	133.8 ± 12.0	ns
C Reactive Protein mg/dL	0.73 ± 0.16	1.34 ± 0.64	<0.01
Thyrotropin, mIU/L	3.4 ± 0.7	2.3 ± 0.3	ns
Thyroxine, ng/dL	1.29 ± 0.02	1.35 ± 0.06	ns
Hemoglobin, g/L	138.3 ± 1.2	131.5 ± 2.8	<0.05
Hematocrit, L/L	0.423 ± 0.003	0.407 ± 0.008	<0.05
Erythrocyte count, 10E12/L	4.64 ± 0.04	4.35 ± 0.10	= 0.001
Lymphocytes count, 10E9/L	1.9 ± 0.05	1.6 ± 0.08	<0.05
Platelet count, 10E9/L	222.3 ± 5.4	205.0 ± 8.2	ns

**Table 4**  
Pharmacological treatment of HF patients stratified by sAXL levels.

Pharmacological treatment	sAXL, ng/mL		P
	<98.1	≥98.1	
No. of patients	144	48	
ACEI, n (%)	91 (66)	34 (71)	ns
ARB, n (%)	36 (27)	7 (15)	ns
ACEI and/or ARB, n (%)	127 (91)	41 (85)	ns
Beta-blocker, n (%)	132 (94)	44 (92)	ns
Ca-antagonists, n (%)	12 (9)	3 (6)	ns
Antithrombotic and/or anticoagulant, n (%)	110 (80)	41 (85)	ns
Statins, n (%)	95 (69)	21 (44)	<0.01
Antidiabetics, n (%)	41 (30)	11 (23)	ns
Diuretics, n (%)	104 (75)	42 (88)	0.055
Antialdosteronic agents, n (%)	74 (54)	28 (58)	ns
Digoxin, n (%)	12 (9)	9 (19)	0.054
Antiarrhythmics, n (%)	26 (19)	15 (31)	0.054
Nitrates, n (%)	17 (12)	8 (17)	ns
Hydralazine, n (%)	5 (4)	3 (6)	ns
Anemia treatment, n (%)	6 (4)	2 (4)	ns

ACEI (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor), ARB (Angiotensin Receptor Blocker).

Experimentation with animal models is needed in order to ascertain whether there is a causative relation of AXL and any of these pathways in HF.

The lack of correlation of sAXL circulating levels and echocardiographic parameters, such as LVEDD, LVESD and LVEF, suggests that AXL shedding into blood follows different triggering signals than BNP. Natriuretic peptides are shed from the heart when there is an overload on any chamber of the heart, and hence there is a stretch situation [26, 27]. It should be emphasized that even though lnBNP and ln sAXL values correlate, BNP does not appear to be a predictor of sAXL levels in a linear regression model.

Circulating sAXL in patients and controls correlates with several parameters that are altered in HF and that lead to a worse prognosis. In our results, higher sAXL levels are found in HF patients with more functional limitation determined either by the NYHA classification or by the formal 6MWT of exercise tolerance [28,29]. Also, HF patients with higher peripheral sAXL levels presented lower systolic and diastolic blood pressure. Low arterial pressure will compromise critical organ perfusion and is associated with a poorer prognosis [30]. Furthermore, we quantified increased serum sAXL levels together with increased kidney dysfunction determined by either higher serum creatinine levels or by lower glomerular filtration rates. Indeed, the GAS6/AXL pathway has been shown to be implicated in development of several renal pathologies [31,32]. Also, HF patients in the H-sAXL group had higher uric acid levels

and sAXL was highly correlated with bilirubin and anemia in HF patients, three parameters that are associated with adverse outcomes in HF. [33–35]

Our ROC analysis of sAXL for discriminating HF patients from controls, shows that sAXL as a putative diagnostic marker has much less sensitivity and specificity than BNP. With our data, a BNP cut-off point of 35 pg/mL gave an 89.8% of sensitivity and an 84.6% of specificity. In the acute setting, testing for the natriuretic biomarkers to rule out or to confirm the HF diagnosis is well established [28,36,37] and are indicated in Clinical Guidelines [2,29,38]. The natriuretic peptides are also well established HF prognostic markers. The higher rate of HF events we find in this group of HF patients with reduced ejection fraction and high BNP levels is in accordance with other results in the literature that have shown that the natriuretic peptides are powerful predictors of adverse outcomes in patients with HF. [39–44]

Other biomarkers such as cardiac necrosis markers, troponin I or T [45,46], or fibrosis markers such as soluble ST2 [47–49] and galectin-3 [50,51] have been shown to be predictive of hospitalization and death in patients with HF and have an additive prognostic value to natriuretic peptide levels. The carbohydrate antigen 125 (CA125) also has a predictive value of adverse outcomes in HF patients [52] and adds prognostic value to BNP [53]. Our results indicate that sAXL is also predictive of HF events at short-term follow-up and that the combination of an elevated sAXL with BNP was a better predictor of major HF events and of all-cause mortality and heart transplantation than either of the two markers alone.

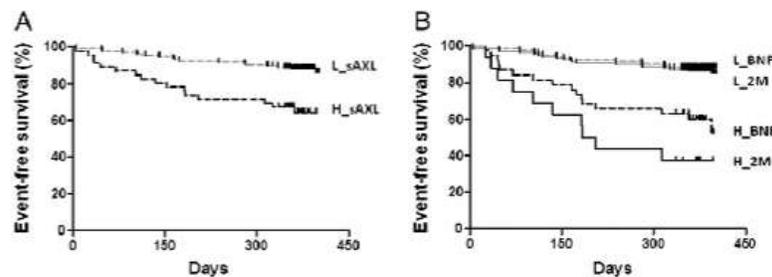
The fact that AXL is 6-fold over expressed in pathological ventricular heart biopsies, suggests that the increased levels encountered in the peripheral blood samples from HF patients is shed from the heart.

## 5. Conclusions

Altogether, we have presented in this report quantification of AXL in heart biopsies by western blot and of sAXL in serum by a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). sAXL levels in HF correlate with BNP levels, the current marker of HF and with other clinical parameters related to aggravated HF. Remarkably, high sAXL levels predicted HF events at short term follow-up, and added predictive value to BNP. Based on these results, we conclude that sAXL appears to have a role in HF progression in a distinct molecular pathway than BNP.

## 6. Study limitations

The control group of the sAXL serum analysis was not matched with the HF group in age and cardiovascular risk factors. This is a serious



**Fig. 4.** Kaplan–Meier survival curve from HF patients divided according their sAXL and BNP levels and considering the major HF events (all-cause mortality, transplantation and HF hospitalizations). A, Kaplan–Meier event-free survival curve from patients that have sAXL values below (L\_sAXL, dotted grey line) or above the 3rd quartile cut-off point (98.1 ng/mL, H\_sAXL, dotted black line). The differences in HF evolution were compared with the Cox Regression model ( $P < 0.001$ ). B, Kaplan–Meier event-free survival curve from patients with BNP below (L\_BNP, dotted grey line) or above the 3rd quartile cut-off point (362.7 pg/mL, H\_BNP, dotted black line,  $P < 0.0001$ ). Kaplan–Meier event-free survival curve from patients that have the 2 markers, sAXL and BNP, levels above the 3rd quartiles cut-off points (H\_2M, solid black line) or that have one or both values below the 3rd quartiles cut-off points (L\_2M, solid grey line,  $P < 0.0001$ ).  $P < 0.05$  between H\_BNP and H\_2M.

limitation of this study, but analysis of sAXL levels in the control group indicated that was independent of the subject's age and sex. On the other hand, the difficulty of finding controls with several cardiovascular risk factors and no cardiovascular disease precluded the obtention of such samples.

This is a two center study from the same metropolitan area, with consecutive patients enrolled. And although it has some advantages, such as including a more homogeneous diagnosis, demographics and laboratory techniques, validation of these results in other centers or in multicentric studies will be needed to confirm the increase of sAXL in HF patients from other populations.

We were not able to obtain the cause of mortality from the records in most of the cases. Therefore, we have analyzed the variable all-cause mortality and could not do analysis with only cardiovascular causes of mortality.

#### Acknowledgments

We want to thank the staff for their research support, specially Natalia Pérez, Nadia Castillo, Vanesa Hervás, Silvia Vidorreta and Magda Castillo of the Institut Clínic de Malalties Cardiovasculars de Hospital Clínic de Barcelona; Teresa Martorell of Hospital Clínic de Barcelona; Anghara Menéndez, from IIBB-CSIC; and Maite Domingo and Teresa Torrades of the Cardiology Department of the Hospital Sant Pau, for technical help, data collection and/or patient management, and Eduard Guasch for helpful discussion of the results.

#### References

- Heidenreich PA, Trogon JC, Khavjou OA, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation* Mar 1 2011;123(8):933–44.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* Aug 2012;14(8):803–69.
- The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J* Jul 2012;33(14):1750–7.
- Mudd JO, Kass DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* Feb 21 2008;451(7181):919–28.
- Whelan RS, Kaplinsky V, Kitis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:19–44.
- Bellido-Martin L, de Frutos PG. Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitam Horm* 2008;78:185–209.
- Evenas P, García de FP, Nicolás GA, Dahlback B. The second laminin G-type domain of protein S is indispensable for expression of full cofactor activity in activated protein C-catalysed inactivation of factor Va and factor VIIIa. *Thromb Haemost* Aug 2000;84(2):271–7.
- Glauser S, Meilhac O, Bieche I, et al. Increased secretion of Gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* Jan 2012;107(1):140–9.
- Hurtado B, Munoz X, Recarte-Pelz P, et al. Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* May 2011;105(5):873–82.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr 20 2004;101(16):6062–7.
- Ekman C, Stenhoff J, Dahlback B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost* Apr 2010;8(4):838–44.
- Scutera S, Fraone T, Musso T, et al. Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN- $\alpha$ -inducible Axl/Gas6 pathway. *J Immunol* Sep 1 2009;183(5):3004–13.
- Battle M, Roig E, Perez-Villa F, et al. Increased expression of the renin-angiotensin system and mast cell density but not of angiotensin-converting enzyme II in late stages of human heart failure. *J Heart Lung Transplant* Sep 2006;25(9):1117–25.
- Casals G, Azzalini L, Tomas C, et al. Admission B-type natriuretic peptide retains prognostic value in patients with acute coronary syndrome and preserved left ventricular ejection fraction. *Int J Cardiol* Jul 26 2012;158(3):459–60.
- Fernandez-Fernandez L, Bellido-Martin L, Garcia de F. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* Oct 2008;100(4):604–10.
- Laurance S, Lemarie CA, Blostein MD. Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Adv Nutr* Mar 2012;3(2):196–203.
- Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood* Apr 15 2008;111(8):4096–105.
- Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA, Berk BC. Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* Jun 9 2006;98(11):1446–52.
- Gerloff J, Korshunov VA. Immune modulation of vascular resident cells by Axl orchestrates carotid intima-media thickening. *Am J Pathol* May 2012;180(5):2134–43.
- Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov VA, Berk BC. Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* Jul 2 2004;279(27):28766–70.
- Korshunov VA, Daul M, Massett MP, Berk BC. Axl mediates vascular remodeling induced by deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* Dec 2007;50(6):1057–62.
- Collett G, Wood A, Alexander MY, et al. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* May 30 2003;92(10):1123–9.
- Collett GD, Sage AP, Kirton JP, Alexander MY, Gilmore AP, Canfield AE. Axl/ phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits mineral deposition by vascular smooth muscle cells. *Circ Res* Mar 2 2007;100(4):502–9.
- 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* Apr 28 2006;98(8):1024–31.
- Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* May 15 2008;358(20):2148–59.
- Wiese S, Breyer T, Dragu A, et al. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation* Dec 19 2000;102(25):3074–9.
- Yasue H, Yoshimura M, Sumida 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* Jul 1994;90(1):195–203.
- Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* Jul 18 2002;347(3):161–7.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 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. *J Am Coll Cardiol* Jun 5 2013;62(16):e147–239.
- Poock SJ, Ariti CA, McMurray JJ, et al. Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39 372 patients from 30 studies. *Eur Heart J* May 2013;34(19):1404–13.
- Lee JJ, Hilliard R, Swami A, et al. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* Nov 2012;27(11):4166–72.
- Yanagita M. Gas6, warfarin, and kidney diseases. *Clin Exp Nephrol* Dec 2004;8(4):304–9.
- Ambrosy AP, Vaduganathan M, Huffman MD, et al. Clinical course and predictive value of liver function tests in patients hospitalized for worsening heart failure with reduced ejection fraction: an analysis of the EVEREST trial. *Eur J Heart Fail* Mar 2012;14(3):302–11.
- Tang YD, Katz SD. Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation* May 23 2006;113(20):2454–61.
- Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, et al. Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging. *Circulation* Apr 22 2003;107(15):1991–7.
- Davis M, Espiner E, Richards G, et al. Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnoea. *Lancet* Feb 19 1994;343(8895):440–4.
- Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* Feb 2006;27(3):330–7.
- Tang WH, Francis GS, Morrow DA, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin Biochem* Mar 2008;41(4–5):210–21.
- Berger R, Huelsman M, Strecker K, et al. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* May 21 2002;105(20):2392–7.
- Dini FL, Gabutti A, Passino C, Fontanive P, Emdin M, De Tommasi SM. Atrial fibrillation and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide as independent predictors of prognosis in systolic heart failure. *Int J Cardiol* Apr 30 2010;140(3):344–50.
- Fonarow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M. Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* May 15 2007;49(19):1943–50.
- Koglin J, Pehlivanli S, Schwaiblmair M, Vogeser M, Cremer P, vonScheidt W. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* Dec 2001;38(7):1934–41.
- Maisel A, Mueller C, Adams K, et al. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* Sep 2008;10(9):824–39.
- van Veldhuisen DJ, Linsens GC, Jaarsma T, et al. B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* Apr 9 2013;61(14):1498–506.
- Jungbauer CG, Riedlinger J, Buchner S, et al. High-sensitive troponin T in chronic heart failure correlates with severity of symptoms, left ventricular dysfunction and prognosis independently from N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. *Clin Chem Lab Med* Nov 2011;49(11):1899–906.
- Zairis MN, Tsaousis GZ, Georgilas AT, et al. Multimarker strategy for the prediction of 31 days cardiac death in patients with acutely decompensated chronic heart failure. *Int J Cardiol* Jun 11 2010;141(3):284–90.
- Pascual-Figal DA, Manzano-Fernandez S, Boronat M, et al. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail* Jul 2011;13(7):718–25.

- [48] Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation* Feb 11 2003;107(5):721–6.
- [49] Bayes-Genis A, de AM, Galan A, et al. Combined use of high-sensitivity ST2 and NTproBNP to improve the prediction of death in heart failure. *Eur J Heart Fail* Jan 2012;14(1):32–8.
- [50] Lok DJ, van der MP, de la Porte PW, et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* May 2010;99(5):323–8.
- [51] van Kimmenade RR, Januzzi Jr JL, Ellinor PT, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* Sep 19 2006;48(6):1217–24.
- [52] Monteiro S, Franco F, Costa S, et al. Prognostic value of CA125 in advanced heart failure patients. *Int J Cardiol* Apr 1 2010;140(1):115–8.
- [53] Nunez J, Sanchis J, Bodi V, et al. Improvement in risk stratification with the combination of the tumour marker antigen carbohydrate 125 and brain natriuretic peptide in patients with acute heart failure. *Eur Heart J* Jul 2010;31(14):1752–63.

## Resumen sobre el estudio del sistema TAM en cáncer de colon

A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio del sistema TAM en muestras de tejido pareado y de plasma de pacientes de cáncer de colon y controles sanos *Situation of the TAM tyrosine protein kinase receptors and their ligands Gas6 and Protein S in colon cancer.*

Como se describió anteriormente, el sistema TAM tiene una gran influencia en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Por este motivo decidimos investigar el estado de los miembros del sistema TAM a nivel genético y proteico en uno de los tipos de cáncer con más casos a nivel mundial, como es el caso del cáncer de colon.

Para evaluar el estado de la expresión genética de los ligandos y receptores miembros del sistema TAM, realizamos una comparación directa de los niveles relativos de mRNA de estas proteínas en tejido sano y tumoral pareado de 35 pacientes del Instituto Catalán de Oncología (ICO). Observamos un aumento en todos los miembros del sistema, siendo estos significativos para el caso Gas6 ( $P=0,0002$ ) y Tyro3 ( $P<0,0001$ ). Esto sugiere que ambos receptores tienen un papel protagónico en el tejido tumoral. Partiendo de las funciones de ambos receptores en la proliferación, migración y muerte celular, pudiera sugerirse que están contribuyendo con el desarrollo y progresión de esta enfermedad.

A nivel plasmático analizamos los niveles solubles de Tyro3 y de Gas6, ya que fueron los miembros del sistema TAM que mostraron mayor actividad en el tejido tumoral. Para ello analizamos 79 muestras de pacientes de cáncer de colon y en 50 controles sanos, también del ICO. Observamos un aumento de los niveles de sTyro3 en pacientes en comparación con las muestras controles, lo cual era esperado tomando en cuenta el aumento de mRNA que observamos en el análisis anterior. En caso de Gas6 observamos el caso contrario, una disminución en los valores de la proteína en pacientes. Este resultado no fue esperado, partiendo de la primicia anterior, pero pudiera sustentarse partiendo de la misma. Un aumento de Tyro3 en el tejido tumoral, puede estar secuestrando la producción local extra de Gas6, evitando que la misma llegue al torrente sanguíneo. Un aumento localizado de la expresión en Gas6 tampoco

puede compararse con los niveles de expresión normal de esta proteína en su tejido de origen, por lo que ese ligero aumento puede ser no apreciable en el plasma.

A pesar de la relevancia de los resultados obtenidos con el estudio que se presenta a continuación, es necesario realizar más experimentos que pudieran elucidar el papel que pudieran estar desarrollando Gas6 y Tyro3 en el tejido tumoral. Haría falta también evaluar los niveles plasmáticos de proteína S, Axl y MerTk en muestras de plasma de cáncer de colon, para poder tener un panorama completo de la situación del sistema TAM en esta importante enfermedad.

### **Artículo III.** Situation of the TAM tyrosine protein kinase receptors and their ligands Gas6 and Protein S in colon cancer

#### ***Situation of the TAM tyrosine protein kinase receptors and their ligands Gas6 and Protein S in colon cancer***

Pedro Recarte-Pelz, Victor R. Moreno, Begoña Hurtado, Elisabet Guinó, Nuria Sala, Gabriel Capella, Pablo García de Frutos.

# **Situation of the TAM tyrosine protein kinase receptors and their ligands Gas6 and Protein S in colon cancer**

Pedro Recarte-Pelz (1), Victor R. Moreno (2), Begoña Hurtado (1), Elisabet Guinó (2), Nuria Sala (3), Gabriel Capella (4), Pablo García de Frutos (1)

1 Department of Cell Death and Proliferation at Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC, IDIBAPS), Spain.

2 Unit of Biomarkers and Susceptibility, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERESP, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

3 Cancer Epidemiology Program, Institut Català d'Oncologia (IDIBELL-ICO), L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

4 Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain.

## **Abstract**

The TAM receptor system composed by the receptors Axl, MerTk and Tyro3, and by the ligands Gas6 and protein S, regulates a series of processes including cell death and proliferation, adhesion, migration and regulation of the release of inflammatory cytokines. Different cancer models showed the involvement of the TAM system in disease progression, and as prognosis factor, although weak. In this study we establish a genetic profile of the TAM system in healthy and tumoral paired colon cancer biopsies, and compared the plasma concentration levels of Gas6 and Tyro3 in healthy and colon cancer patients. We observed a very significant 6.4 fold increase in the mRNA expression of Tyro3 and 2.3 fold for Gas6 in the same tumoral paired tissue. Plasma concentration of sTyro3 was increased in colon cancer patients, while Gas6 levels were decreased in the same patients compared with healthy controls. These results suggest an important role of the receptor Tyro3 in the progression of colon cancer. Further studies with Gas6 and the other TAM system members to establish their role in this important disease are granted.

## **Introduction**

Colon cancer is one of the most common types of cancer, being the third type of cancer in incidence and the fourth in mortality rate, with more than 400.000 new cases per year in Europe, and more than 207.000 deaths in 2009 (Zavoral, Suchanek et al. 2009). In the case of Spain, there are 22,000 new cases

reported and 13,075 deaths from the disease each year, being 70% of these tumors located in the colon and 30% in the rectum (Gravalos, Garcia-Alfonso et al. 2011). With 1.2 million new cases each year in the world, the projections suggest that the number of cases can increase to 2.2 million in the coming years (Jemal, Bray et al. 2011). The majority of persons affected by this disease are among 60 and 74 years old (60% of the cases diagnosed), affecting mostly Caucasians (80% of all cases). Most of the patients die as a result of metastasis to the liver. This makes colon cancer one a major health problem of the west hemisphere (McLeod and Murray 1999; Chagpar, Xing et al. 2012). It is important to note that the mortality rate of this cancer has been reduced by 35% between 1990 and 2007, due to a better system of diagnosis and treatment (Benson, Arnoletti et al. 2011). An early diagnosis and appropriate treatment can lead to a recovery rate of 90%. This underscores the importance of an effective diagnosis in the progression of the disease.

Protein tyrosine kinase receptors (RTKs) represent a large family of membrane receptors that are able to translate signals from the extracellular environment to the cytoplasm, in response to ligand binding. Within this family of receptors are those that interact with Gas6, the TAM receptors: Axl, Tyro3 and MerTk (Linger, Keating et al. 2008). The receptors are activated when the ligand induces receptor dimerization, resulting in autophosphorylation of tyrosine residues in the kinase intracellular region. The TAM receptors share several extracellular and intracellular features in the organization of their domains. The ligand Gas6 binds to a portion composed of two immunoglobulin-like domains, followed by two fibronectin III-like domains (O'Bryan, Frye et al. 1991; Graham, Dawson et al. 1994; Mark, Scadden et al. 1994; Chen, Carey et al. 1997). This small family of receptors regulates a set of processes including cell death and proliferation, adhesion, migration, platelet aggregation, and regulation of the release of inflammatory cytokines. TAM receptors may be involved in various physiological processes, depending on their ligand (Scott, McMahon et al. 2001; Linger, Keating et al. 2008; Ekman, Stenhoff et al. 2010).

All TAM receptors have been identified in leukemia (Crosier, Hall et al. 1995; Challier, Uphoff et al. 1996; Dufies, Jacquelin et al. 2011), and at least one of them has been studied in different kinds of cancer, including breast cancer (Zhang, Pritchard et al. 2008; Linger, Keating et al. 2010; Mackiewicz, Huppi et al. 2011; Vuoriluoto, Haugen et al. 2011), renal carcinomas (Chung, Malkowicz et al. 2003; Gustafsson, Bostrom et al. 2009; Gustafsson, Martuszezwska et al. 2009), lung cancer (Wimmel, Glitz et al. 2001; Shieh, Lai et al. 2005; Vaughan, Singh et al. 2012), prostate cancer (Sainaghi, Castello et al. 2005; Shiozawa, Pedersen et al. 2010; Mishra, Wang et al. 2012; Paccez, Vasques et al. 2012), ovarian cancer

(Sun, Fujimoto et al. 2004; Macleod, Mullen et al. 2005; Rankin, Fuh et al. 2010) and thyroid carcinoma (Ito, Ito et al. 1999; Avilla, Guarino et al. 2011). In a study based on the expression of different protein tyrosine kinases in colon cancer, it was found that Axl receptor can be expressed 10 times more in a peritoneal metastatic nodules than in other normal tissues (Craven, Xu et al. 1995). This finding suggests that the Axl receptor may play an important role in colon cancer, and so can its other family members MerTk and Tyro3. These proteins could be also a potential marker for the progression of this disease, if they show a correlation with a worst prognosis. This is the question we propose to investigate in our study.

There are few specific blood biomarkers to diagnose colon cancer. Two examples are the carbohydrate antigen 19-9 (CA 29-9) and the carcino-embryonic antigen (CEA). CA29-9, discovered in 1981 in pancreatic and colon cancer, is also increased in other diseases different from cancer, like pancreatitis or cirrhosis (Koprowski, Herlyn et al. 1981; Locker, Hamilton et al. 2006). The CEA is a glycoprotein involved in cell adhesion that after birth reduces its concentration in blood. In many types of carcinomas its levels rise above the normal concentration, but especially in colorectal carcinomas, where it could reach a concentration level above 2,5 ng/ml in plasma (Amri, Bordeianou et al. 2013).

In order to know the possible effect of Gas6 and the TAM system in colorectal cancer, we performed a comparative analysis of different plasma and tissue samples of patients with this disease. We wanted to establish if these proteins could correlate with the disease. Tests were also conducted on a genetic level, for expression levels of these proteins in tumor and healthy tissue from the same patients.

## **Materials and methods**

### **Tissue samples**

A group of 35 paired samples of healthy and tumoral tissue was obtained from different colon cancer patients from the Institute Catalan of Oncology in Bellvitge Barcelona (ICO).

### **Determination of mRNA expression in tissue**

An mRNA expression profile was performed for the 5 genes of the TAM system (Gas6, Protein S, Axl, MerTk and Tyro3), in 35 paired samples of persons diagnostic with colon cancer. A master mix of Taqman primers and probes were used to see the relative mRNA expression (Gustafsson, Martuszevska et al. 2009). For the reaction a CFX96 real-time detection system from Bio-Rad was used.

## **Plasma samples**

A group of plasma samples, 50 controls and 79 of colon cancer patients for Tyro3, and 90 controls and 242 patients for Gas6, were obtained from the Institute Catalan of Oncology in Bellvitge (ICO). The patient plasma samples were from patients in different stages of the disease. The population has been described earlier (Salazar, Roepman et al. 2011).

## **Elisa**

For the determination of sGas6 (Blostein, Rajotte et al. 2011) and sTyro3 on plasma, ELISA kits from R&D Systems were used with some variations in the case of Gas6, where another capture antibody was used, the polyclonal AF885 from R&D Systems. Rubilabor plates (96 wells) were coated with the capture antibodies to Gas6 and Tyro3, overnight at room temperature. The plates were washed three times with wash buffer (PBS with 0,05% Tween20). Then the plates were blocked for 1h at room temperature with Diluent Buffer (PBS + 1% BSA; pH=7,4). The samples for the Gas6 analysis were diluted 80 times and for sTyro3 20, in Diluent buffer.

The standard curve was made by serial dilution of purified protein in each case. Negative controls were buffer alone and plasma positive controls were used in each plate.

In all cases Biotinylated antibodies were used for detection with Streptavidin HRP complex. As substrate Solution Sigma's Tetramethyl-benzidine (slow kinetic form) was used. Sulfuric acid at 1M concentration was used to stop the reaction. The absorbance of wells was determined with an automatic plate reader at 450 nm.

## **Statistical analysis**

In the statistical analysis of non-parametric and paired data, the Wilcoxon signed rank test was performed. For the other statistical analysis of non-parametric data, the Mann-Whitney U test was used.

## **Results and Discussion**

mRNA levels of TAM receptor, Gas6 and protein S in matched tissue samples.

The levels of mRNA of these proteins were performed by RT-PCR in 35 paired samples of tissue, control and tumoral, from patients with colon cancer. We observed a general increase in the mRNA samples between healthy and tumoral tissue. The greatest increase was found in

GAS6 and TYRO3 mRNA expression, with a 2.3 and a 6.4 fold increase respectively. The smallest increase observed was for AXL1 mRNA with 1.45 fold. (Fig.1A). A significant difference between the expression of mRNA in the paired tissue for GAS6 and TYRO3 was observed,  $p = 0,0002$  and  $p < 0,0001$  respectively when the Wilcoxon signed rank test was performed (Fig.1B and C). There was no significant difference between mRNA expression of control and tumoral tissue of MERTK and PROS1 when the same paired statistical test was applied.

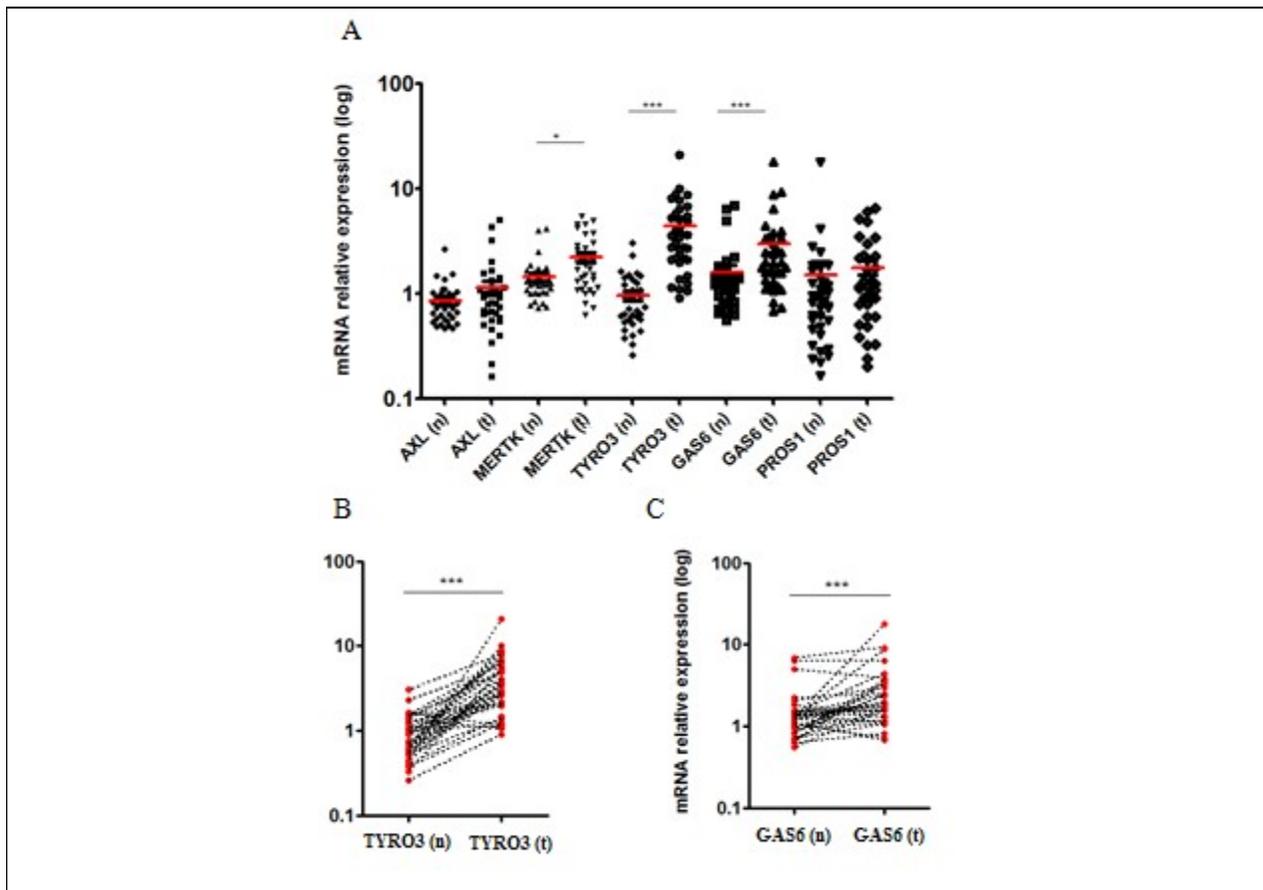
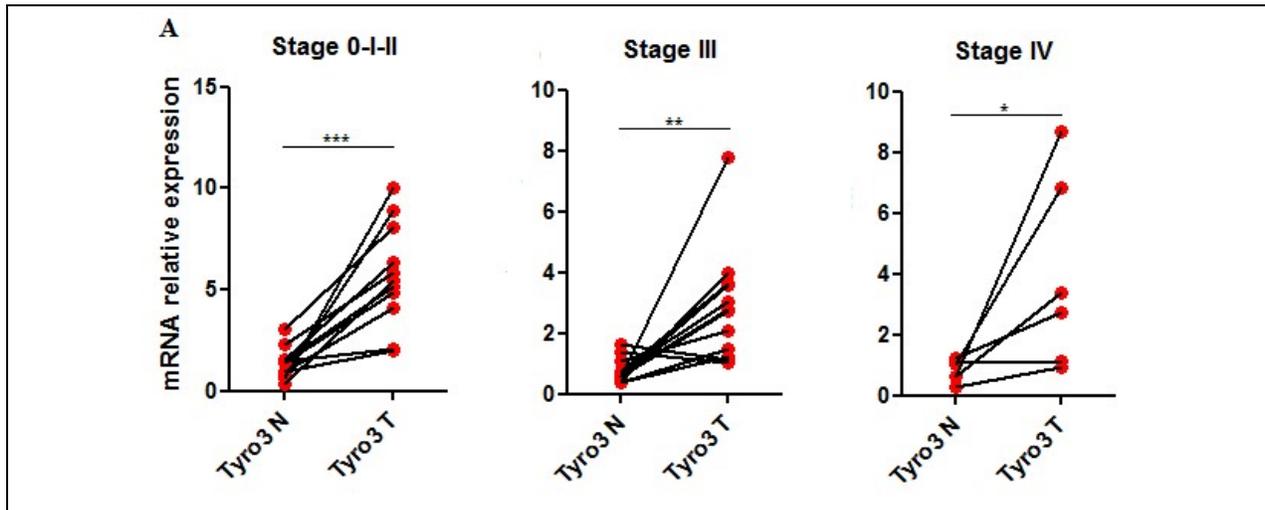


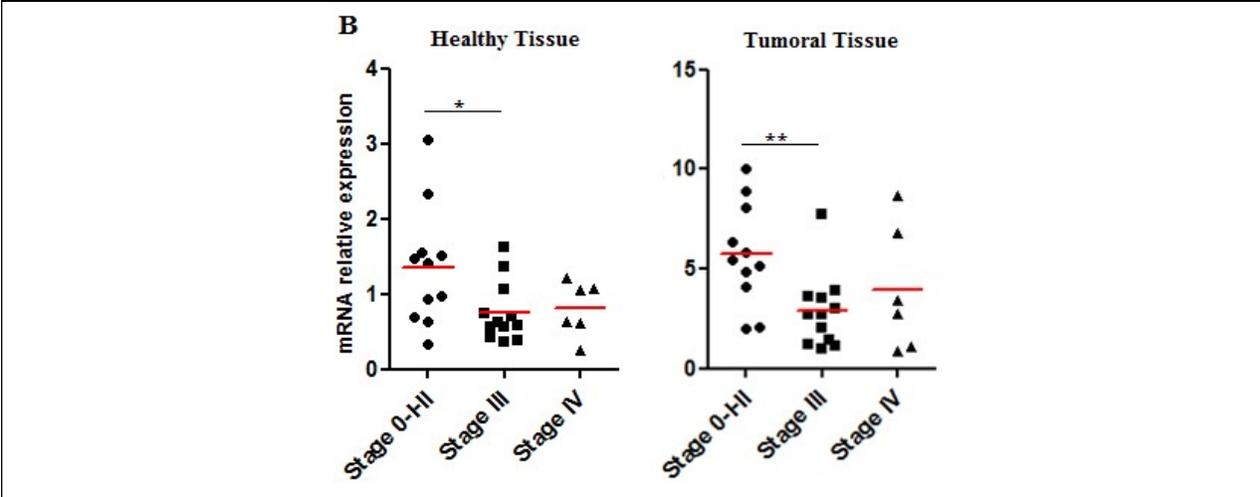
Figure 1 Relative expression levels of mRNA from the TAM system in paired healthy and tumoral tissue from colon cancer patients. **A)** mRNA relative expression (to 1) of all genes of the TAM system in healthy and tumoral paired tissue. **B)** Comparison of mRNA levels of TYRO3 in healthy and tumoral paired tissue. **C)** Comparison of mRNA levels of GAS6 in healthy and tumoral paired tissue. For the statistical analysis we used a paired t test.

**Levels of mRNA in GAS6 and TYRO3 in normal and tumoral tissue, in different stages of the disease.**

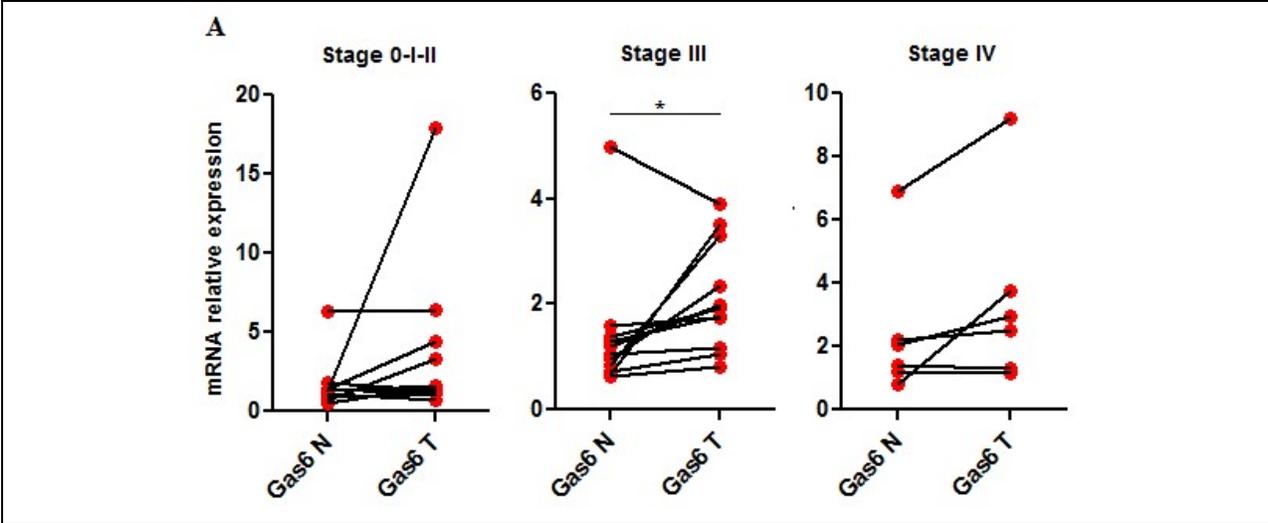
When analyzing the mRNA expression levels of GAS6 and TYRO3 in the tumoral tissue divided in sample stages against healthy levels in normal tissue, an important difference among stages was observed. Both mRNA levels differed between the stages of colon cancer tissue. Healthy tissue in each case expressed less mRNA than the tumoral tissue for each stage, been it more significant different for the receptor TYRO3 (Fig. 2A and B). The difference was greater between controls and stage 0-I-II and III, and lesser compared to stage IV samples. The same different pattern of TYRO3 mRNA relative expression has been seen in healthy and tumoral tissue. The difference is in the proportion or relative amount of mRNA expressed in each case.

In the case of GAS6 (Fig.3A and B), only a small significant difference was observed in the paired tissue from patients from colon cancer in stage III. The relative expression of GAS6 mRNA in the healthy tissue between different stages, and in the same case for tumoral tissue, did not show significant difference among them.





**Fig.2. mRNA relative expression of Tyro3 according to cancer stage group in healthy and tumoral samples of Colon Cancer patients. A) mRNA relative expression levels in healthy and tumoral paired tissue from patients in different stages of colon cancer. An increase in the mRNA levels is observed in every stage in the tumoral tissue. B) Expression of Tyro3 mRNA in healthy and tumoral tissue at each stage of the disease. The same pattern of Tyro3 mRNA expression is observed in healthy and tumoral tissue, with difference at the amount of relative expression.**



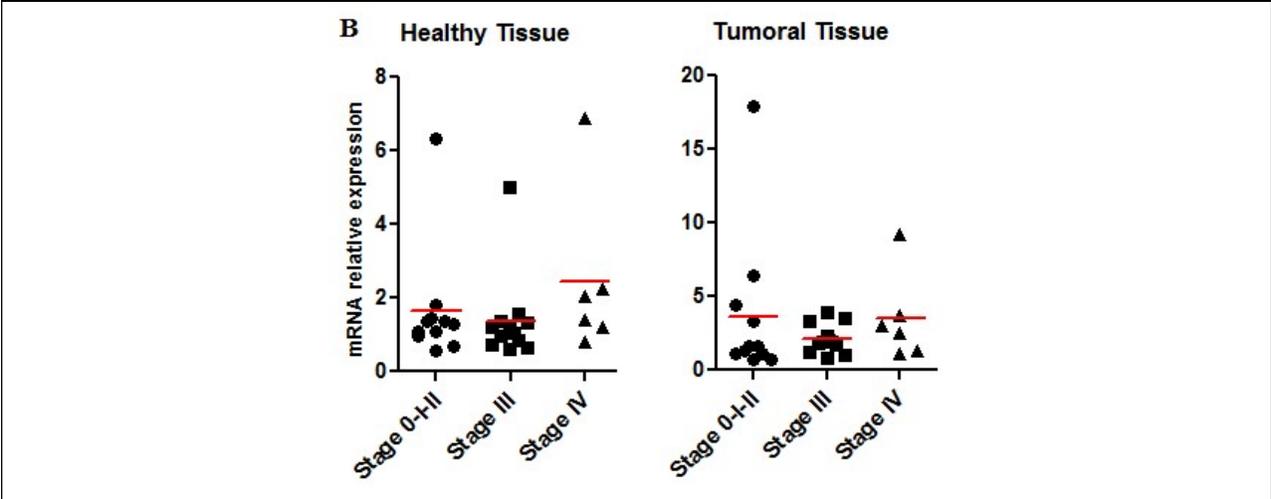


Fig.3. mRNA relative expression of GAS6 according to cancer stage group in healthy and tumoral samples of Colon Cancer patients. A) mRNA relative expression levels in healthy and tumoral paired tissue from patients in different stages of colon cancer. An increase in the mRNA levels is observed in every stage in the tumoral tissue. B) Expression of Gas6 mRNA in healthy and tumoral tissue at each stage of the disease.

In the case of AXL, PROS1 and MERTK, no significant differences were observed in terms of expression levels of mRNA for each gene in the various stages of colon cancer development. Within this group of samples, fluctuations in relative expression levels of mRNA was observed in the total paired samples, showing no regular behavior (Fig.4 and Fig.5), unlike the samples for TYRO3 and GAS6, in which the tendency is to increase expression in the tumor tissue.

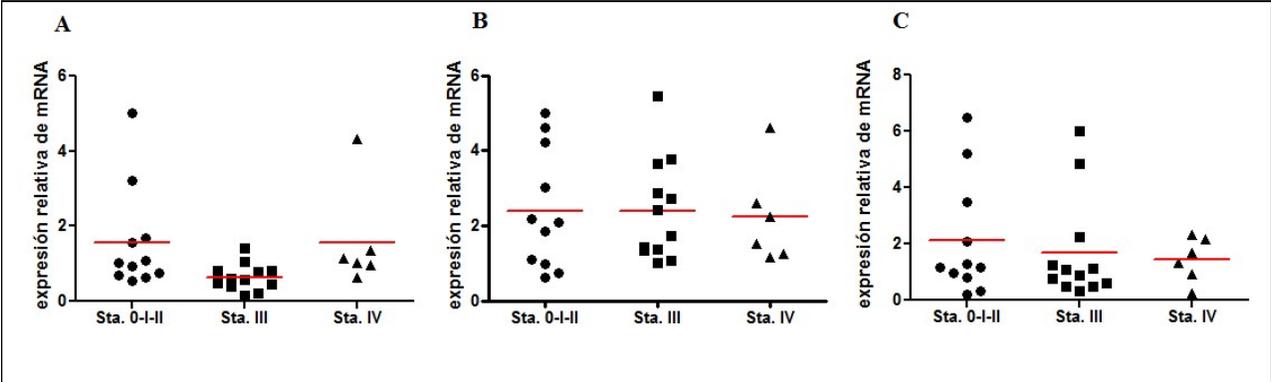


Fig.4. Relative expression levels of AXL, MERTK and PROS1 mRNA in three stages of colon cancer. A) Relative expression of AXL mRNA in tumor tissue in three groups of stages of colon cancer. There is a slight decrease in the expression of this gene in stage III, which then increases again in stage IV. B)

Relative mRNA expression in tumor tissue MERTK. There is no significant difference between the different stages of the disease. C) Relative expression of PROS1, showing a slight continuously decrease in mRNA expression with increasing stages of the disease.

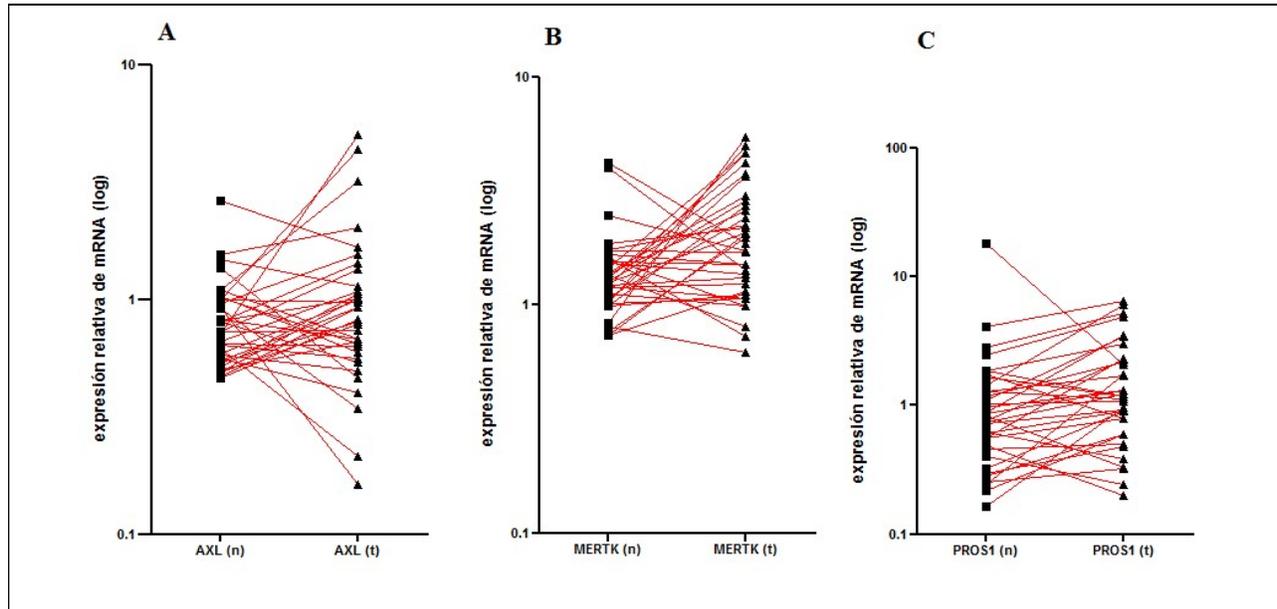


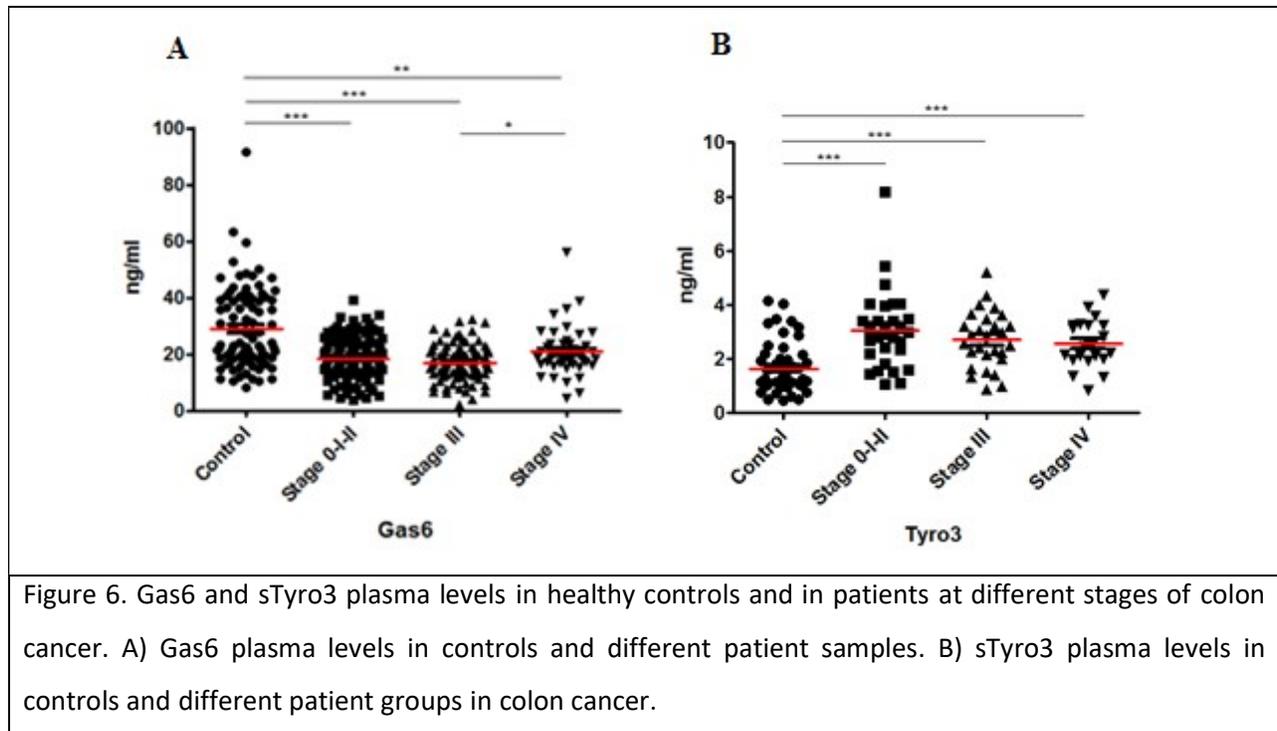
Figure 5. mRNA expression relative to matched healthy (N) and tumor (t) tissue in AXL, MERTK and PROS1. A) In the case of AXL, there is no tendency in the expression of both tissues. B) The gene MERTK behavior is similar to AXL, with less significant variations between healthy tissue and tumor. C) The PROS1 gene showed the same homogeneous behavior like in AXL and MERTK.

### Plasma samples

For the analysis of plasma samples, a group of 242 different samples of plasma from 90 patients and controls to estimate Gas6 was collected. Based on the results of gene expression experiments, it was also proposed the analysis of sTyro3, because of the high variation observed between tumoral and healthy tissue. In this case, 50 healthy samples and 79 samples from colon cancer patients were analyzed. Although the results obtained in the experiments of AXL and MERTK gene expression, we examined a small group of blood samples without succeed.

## Gas6 and sTyro3 protein plasma levels

The plasma levels of protein sTyro3 were analyzed in 50 controls and different amount of patient samples from three different groups according to cancer progression Stage 0-I-II (29), Stage III (28) and Stage IV (22). For the protein Gas6, 90 controls and different patient samples from the same previous groups Stage 0-I-II (110), Stage III (85) and Stage IV (47) were performed. In the case of Gas6 (Fig.6 A), a significant difference was observed between controls and the 3 stage groups, and between the stages group as well. In the case of Tyro3 (Fig.6 B), a significant difference between the plasma levels of controls and the three different groups was obtained, like with Gas6, but not between the stage groups.



The Gas6 plasma levels are not correlated with the values of mRNA expression in tumoral tissue. In colonic tissue, the gas6 gene showed an increase in expression levels of mRNA, whereas plasma levels showed a decrease in the concentration of the protein in colon cancer patients in compared with control samples. In the case of Tyro3 receptor an increase of the soluble protein in patients with respect to control group, as in tumoral tissue where the expression of TYRO3 also increased compared with the healthy paired tissue.

## Discussion

In this report we detected variations in the expression at mRNA level from the TAM system members in colon cancer tissue, compared with healthy one from the same patient. The paired test levels of mRNA expression in normal tissue and tumor colon cancer patients reported a significant difference for the genes of MerTk, Gas6 and Tyro3. It has been reported that elevated levels of Gas6, are indicative of a poor prognosis, and increased the survival rate of the cells, resulting in disease progression (Hutterer, Knyazev et al. 2008). In Figure 1B, there was a significant difference between healthy and tumor tissue, suggesting that high levels of expression of Gas6 may contribute to tumor development. In the same case, Tyro3 is overexpressed in the tumor tissue, suggesting a role also cooperative development of this disease. It is known that TAM receptor stimulation increases the activation of signaling pathways for survival and proliferation, creating ideal conditions for the development of cancer cells (Brandao, Migdall-Wilson et al. 2011).

The major increase in mRNA expression was in the Tyro3 receptor and the Gas6 ligand. This might induce an increased in the activation of the Tyro3/PI3H/Akt pathway, which results in the increase of cell survival, need for the progression of the tumoral cells (Zhong, Wang et al. 2010). It was recently reported in melanoma cell lines, that the overexpression of Tyro3 mRNA may help to increase the survival pathway of this type of cells through the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (Demarest, Gardner et al. 2013). The high expression of the receptor was reflected in the plasma levels of its soluble form, (Fig. 6B). We noticed that many samples which showed the largest increase in mRNA expression of the receptor in the tumoral tissue, also showed a significant increase in Gas6 mRNA levels, suggesting a cooperative relationship in the proliferation of the disease.

The increased expression of Gas6 mRNA in the tumor tissue, suggest a greater demand of it for tumor development. This may be induced by a mechanism characteristic of cancer cells. Gas6 has been described as a tumor growth factor in different experimental models of cancer, and that increased expression of it can meet the needs of growing cancer cells. It has been described that Gas6 knockout mice, have poor tumors growth rate compared to wild type variants. It has also been published that Gas6 stimulates proliferation of various cancer cell lines, like prostate cancer, in strict cooperation with Axl receptor expression (Sainaghi, Castello et al. 2005 Loges, Schmidt et al. 2010). This case suggests that the same process could occur between Gas6 and Tyro3, for the development of colon cancer.

We observed that the results of relative expression of Gas6 mRNA are not correlated with the results obtained in plasma (Figure 3B and 6A). Different studies reported ligand concentration levels in healthy

controls of  $35 \pm 6.4$  ng / ml (Blostein, Rajotte et al. 2011),  $15.89 \pm 6.88$  ng / ml (Suh, Hilliard et al. 2010),  $14.3 \pm 0.66$  ng / ml ( Blostein, Rajotte et al. 2011), being in our case of 28.83 ng / ml, with a standard deviation of 14.27 ng / ml. In a recent study, it has been reported that higher expression of Gas6 in the colon cancer tissue was associated with better prognosis. It was also reported that Gas6 knockout mice develop more polyps in the small intestine than wild type mice in the colorectal and intestinal cancer model (APCmin) (Akitake-Kawano, Seno et al. 2013). These results suggest also an inhibitory role of Gas6 in tumor development. We are at two possible opposing functions of the same protein, which leads us to think that the proper combination of both could enhance tumor development or otherwise hinder its development and expansion. It would also be expected that an increase of 2.3 fold in the value of Gas6 mRNA expression specific to the tumor tissue is not sufficient to alter the average concentration of the protein in blood. On the contrary, a low concentration in plasma Gas6 could be the result of an increase recruitment of it in the tumor, by overexpression of the TAM receptors. These arguments make clear the need to delve deeper into the issue of the effect of Gas6 in cancer, to clarify the role of this member of the TAM system in colorectal cancer.

We observed in these report that the TAM system mRNA expression is increased in colon cancer tumor tissue, suggesting an important role of it in the progression of this type of cancer. In the TAM family we observed a significant increase especially by the receptor Tyro3 and their ligand Gas6, suggesting a special contribution of this proteins for the development of this type of cancer. Plasma concentration of sTyro3 was higher in patients with colon cancer in accordance with the mRNA levels, reinforcing the idea that this receptor has an important role in colon cancer. We propose to extend the studies presented to the other members of the TAM family in order to have a better picture of the possible effect of the whole system in colon cancer.

## **Bibliography**

- Amri, R., L. G. Bordeianou, et al. (2013). "Preoperative carcinoembryonic antigen as an outcome predictor in colon cancer." J Surg Oncol **108**(1): 14-18.
- Avilla, E., V. Guarino, et al. (2011). "Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer." Cancer Res **71**(5): 1792-1804.
- Benson, A. B., 3rd, J. P. Arnoletti, et al. (2011). "Colon cancer." J Natl Compr Canc Netw **9**(11): 1238-1290.
- Craven, R. J., L. H. Xu, et al. (1995). "Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer." Int J Cancer **60**(6): 791-797.
- Crosier, P. S., L. R. Hall, et al. (1995). "Identification of a novel receptor tyrosine kinase expressed in acute myeloid leukemic blasts." Leuk Lymphoma **18**(5-6): 443-449.

- Chagpar, R., Y. Xing, et al. (2012). "Adherence to stage-specific treatment guidelines for patients with colon cancer." *J Clin Oncol* **30**(9): 972-979.
- Challier, C., C. C. Uphoff, et al. (1996). "Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines." *Leukemia* **10**(5): 781-787.
- Chen, J., K. Carey, et al. (1997). "Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation." *Oncogene* **14**(17): 2033-2039.
- Chung, B. I., S. B. Malkowicz, et al. (2003). "Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma." *DNA Cell Biol* **22**(8): 533-540.
- Dufies, M., A. Jacquet, et al. (2011). "Mechanisms of AXL overexpression and function in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells." *Oncotarget* **2**(11): 874-885.
- Ekman, C., J. Stenhoff, et al. (2010). "Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood." *J Thromb Haemost* **8**(4): 838-844.
- Graham, D. K., T. L. Dawson, et al. (1994). "Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer." *Cell Growth Differ* **5**(6): 647-657.
- Gravalos, C., P. Garcia-Alfonso, et al. (2011). "Recommendations and expert opinion on the treatment of locally advanced rectal cancer in Spain." *Clin Transl Oncol* **13**(12): 862-868.
- Gustafsson, A., A. K. Bostrom, et al. (2009). "Gas6 and the receptor tyrosine kinase Axl in clear cell renal cell carcinoma." *PLoS One* **4**(10): e7575.
- Gustafsson, A., D. Martuszczyńska, et al. (2009). "Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival." *Clin Cancer Res* **15**(14): 4742-4749.
- Ito, T., M. Ito, et al. (1999). "Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma." *Thyroid* **9**(6): 563-567.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* **61**(2): 69-90.
- Koprowski, H., M. Herlyn, et al. (1981). "Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma." *Science* **212**(4490): 53-55.
- Linger, R. M., A. K. Keating, et al. (2008). "TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer." *Adv Cancer Res* **100**: 35-83.
- Linger, R. M., A. K. Keating, et al. (2010). "Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors." *Expert Opin Ther Targets* **14**(10): 1073-1090.
- Locker, G. Y., S. Hamilton, et al. (2006). "ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer." *J Clin Oncol* **24**(33): 5313-5327.
- Mackiewicz, M., K. Huppi, et al. (2011). "Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA." *Breast Cancer Res Treat* **130**(2): 663-679.
- Macleod, K., P. Mullen, et al. (2005). "Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer." *Cancer Res* **65**(15): 6789-6800.
- Mark, M. R., D. T. Scadden, et al. (1994). "rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain." *J Biol Chem* **269**(14): 10720-10728.
- McLeod, H. L. and G. I. Murray (1999). "Tumour markers of prognosis in colorectal cancer." *Br J Cancer* **79**(2): 191-203.
- Mishra, A., J. Wang, et al. (2012). "Hypoxia stabilizes GAS6/AXL signaling in metastatic prostate cancer." *Mol Cancer Res*.
- O'Bryan, J. P., R. A. Frye, et al. (1991). "axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* **11**(10): 5016-5031.
- Paccez, J. D., G. J. Vasques, et al. (2012). "The receptor tyrosine kinase Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target." *Oncogene*.

- Rankin, E. B., K. C. Fuh, et al. (2010). "AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer." *Cancer Res* **70**(19): 7570-7579.
- Sainaghi, P. P., L. Castello, et al. (2005). "Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor." *J Cell Physiol* **204**(1): 36-44.
- Salazar, R., P. Roepman, et al. (2011). "Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer." *J Clin Oncol* **29**(1): 17-24.
- Scott, R. S., E. J. McMahon, et al. (2001). "Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER." *Nature* **411**(6834): 207-211.
- Shieh, Y. S., C. Y. Lai, et al. (2005). "Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression." *Neoplasia* **7**(12): 1058-1064.
- Shiozawa, Y., E. A. Pedersen, et al. (2010). "GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche." *Neoplasia* **12**(2): 116-127.
- Sun, W., J. Fujimoto, et al. (2004). "Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers." *Oncology* **66**(6): 450-457.
- Vaughan, C. A., S. Singh, et al. (2012). "Gain-of-Function Activity of Mutant p53 in Lung Cancer through Up-Regulation of Receptor Protein Tyrosine Kinase Axl." *Genes Cancer* **3**(7-8): 491-502.
- Vuoriluoto, K., H. Haugen, et al. (2011). "Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer." *Oncogene* **30**(12): 1436-1448.
- Wimmel, A., D. Glitz, et al. (2001). "Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion." *Eur J Cancer* **37**(17): 2264-2274.
- Zavoral, M., S. Suchanek, et al. (2009). "Colorectal cancer screening in Europe." *World J Gastroenterol* **15**(47): 5907-5915.
- Zhang, M., M. R. Pritchard, et al. (2008). "Microarray analysis of perichondral and reserve growth plate zones identifies differential gene expressions and signal pathways." *Bone* **43**(3): 511-520.
- Zhong, Z., Y. Wang, et al. (2010). "Protein S protects neurons from excitotoxic injury by activating the TAM receptor Tyro3-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway through its sex hormone-binding globulin-like region." *J Neurosci* **30**(46): 15521-15534.

## V. RESUMEN GENERAL

La presente tesis estuvo orientada a analizar el posible papel que pudiera tener el sistema TAM en 3 enfermedades diferentes, y partiendo de la información obtenida, plantear el uso de estas proteínas como biomarcadores. Dicha idea surgió de la información existente sobre el sistema TAM en diferentes sistemas metabólicos, y del deseo de profundizar en los mismos, como en el caso de cáncer de colon y lupus, y de investigar nuevos escenarios como ocurrió en el caso del papel de Axl en la insuficiencia cardíaca.

### Lupus

La implicación del sistema GAS6/TAM en lupus deriva originalmente de estudios en modelos de ratón *knockout*. La presencia de síntomas similares a los del lupus en ratones deficientes de los tres receptores TAM, permitió proponer un rol importante del sistema TAM en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, y específicamente del lupus eritematoso sistémico. Diferentes estudios han analizado los niveles de las proteínas de este grupo en pacientes afectados por esta enfermedad, y han podido establecer que tanto Gas6, Axl y MerTk pueden tener un efecto en el desarrollo de la misma. Queriendo profundizar más en la relación entre componentes del sistema y el desarrollo de la enfermedad nos propusimos analizar, por primera vez en un estudio, los niveles de todos los miembros del sistema TAM en plasma para poder tener una mejor idea de su posible implicación en el desarrollo de esta enfermedad.

Con los resultados obtenidos podemos sugerir que efectivamente el sistema TAM puede tener un efecto importante en esta compleja enfermedad. En cuanto a los ligandos de este grupo, como se reportó en la respectiva publicación científica, observamos datos opuestos. En nuestro estudio observamos una disminución tanto de la proteína S total, como de la libre en los pacientes con respecto a los controles, mientras que observamos un aumento de Gas6 en pacientes. Se conoce que la proteína S y Gas6 tiene un efecto en la actividad de los macrófagos al ayudar a identificar a aquellas células apoptóticas, mediante su unión a la fosfatidilserina (PtdSer), promoviendo una respuesta no inflamatoria a la muerte celular apoptótica (Huang, Rigby et al. 2003). Una disminución de proteína S pudiera disminuir la identificación de las células apoptóticas, dificultando su eliminación y favoreciendo una respuesta inflamatoria. En el caso de Gas6, se ha reportado que el mismo tiene un efecto anti-apoptótico (Hafizi and Dahlback 2006), por lo que su aumento puede estar bloqueando los procesos pro-apoptóticos y generando auto antígenos en pacientes de lupus, favoreciendo la respuesta inmune inflamatoria,

característica de esta enfermedad. Por este motivo esperaríamos un alto valor de Gas6 y un bajo nivel de proteína S en muestras de plasma de pacientes en relación con muestras de controles sanos, como hemos podido evidenciar en nuestros resultados.

En nuestro estudio observamos también una correlación entre el aumento de Gas6 y la clasificación SLEDAI de los pacientes, lo que nos sugiere una evolución paralela de ambos parámetros. Al comparar pacientes en el estadio SLEDAI menor a 3 con aquellos con valores superiores, observamos diferencias significativas en los valores de Gas6. Para el caso de proteína S y los receptores TAM, observamos un incremento moderado de las proteínas solubles sin llegar a diferencias significativas. Estas observaciones nos llevaron a escoger a Gas6 como un posible candidato como indicador de progresión del Lupus.

En el caso de los receptores solubles del sistema TAM, encontramos un aumento en todos ellos en pacientes en comparación con el grupo control. El mayor aumento de concentración lo observamos en sTyro3 y sAxl, y en menor medida en sMerTk. Esto es indicativo de que receptores son más activos en esta enfermedad en particular según sus funciones específicas.

En los pacientes de Lupus es normal encontrar complicaciones renales, entre otras, como efecto o consecuencia evolutiva de la enfermedad. La principal causa de muerte de estos pacientes, de hecho, es debido a una nefritis (D'Cruz, Khamashta et al. 2007; Maidhof and Hilar 2012). En este caso observamos un aumento significativo en Gas6, MerTk y Tyro3 de un 30% aproximadamente. De estas tres proteínas, Gas6 y MerTk han sido asociadas a problemas renales, lo que refuerza su papel en el desarrollo de los diferentes episodios de la enfermedad.

A nivel genético observamos una posible relación en cuanto a tres polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) y la concentración plasmática de sus productos. El caso más significativo fue el del Intron 1 de *MERTK* con la variante AA, asociado a un aumento de concentración de  $12.3 \pm 1.8$  ng/ml en controles a  $29.3 \pm 5.5$  ng/ml en pacientes, un incremento superior al 100%. Caso similar fue el de sAxl donde se registró un valor plasmático en pacientes de  $41.2 \pm 3.8$  ng/ml en comparación con controles  $24.6 \pm 5.2$  ng/ml, cuando estaba presente el alelo G en el intron 6 del gen. Para el caso de GAS6, observamos que la variante del SNP AA y AG del Intron 8 presento una concentración de  $26.2 \pm 1.3$  ng/ml en controles y de  $33.1 \pm 1.8$  ng/ml en pacientes. Estos datos pudieran sugerir que variaciones genéticas en los genes de estos tres miembros del sistema TAM puedan afectar los niveles proteicos de los mismos, contribuyendo al desarrollo y progresión de la enfermedad. Debido a la pequeña cantidad de muestras genéticas, no podemos elaborar conclusiones sobre las mismas. Para ello requeriríamos un número de muestras superior, para poder tener una mejor estimación estadística de las relaciones entre variaciones de SNPs en los genes y sus posibles consecuencias a nivel proteico.

Con nuestro estudio sobre el efecto del sistema TAM en Lupus, pudimos concluir que el mismo pueda estar contribuyendo con la enfermedad de 2 maneras. Una de ellas es regulando el proceso inflamatorio típico de esta enfermedad, por lo que pudimos observar aumento en

concentración de Gas6, sAxl, sMerTk y sTyro3. El caso particular de proteína S está asociado al segundo mecanismo por el cual el sistema TAM pudiera tener un papel activo en Lupus. Se ha asociado este ligando junto a MerTk con el proceso de esferocitosis y la correcta eliminación de células apoptóticas. Altas concentraciones de proteínas nucleares en plasma y de auto anticuerpos, sugiere que este proceso no ocurre efectivamente en pacientes de esta enfermedad, y una disminución de los niveles de proteína S pueden colaborar con este caso. Por estos motivos y la relación existente entre los niveles de Gas6 y el índice SLEDAI, podemos sugerir que el sistema TAM es un buen marcador de Lupus. Más experimentos y estudios deben llevarse a cabo para poder justificar este argumento, así como para establecer el efecto de las variantes genéticas en esta enfermedad autoinmune.

## **Insuficiencia cardiaca**

Las enfermedades cardiacas son mundialmente reconocidas como la primera causa de muerte en la población general. La insuficiencia cardiaca es la fase final de muchas de estas enfermedades, caracterizándose por disfunción ventricular sistólica o diastólica. Su importancia radica en que afecta a un 2-3% de la población mundial, alcanzando valores superiores al 10% en personas mayores de 70 años. Un diagnóstico adecuado de esta condición ha demostrado una mejora en la calidad de vida de las personas afectadas. Para ello se han determinado varios marcadores biológicos que son sintetizados y liberados por el corazón. A pesar de su elevada prevalencia, aún no se ha podido establecer un protocolo para el seguimiento efectivo de esta enfermedad, que sea indicativo de la progresión del mismo.

Es conocido que los miembros del sistema TAM, Gas6 y Axl, se expresan en tejidos vasculares, y que uno de los tejidos donde más se expresa el receptor Axl es en el tejido cardiaco, según los perfiles de expresión del GeneAtlas dataset. Partiendo de esta enfermedad nos planteamos evaluar los niveles de expresión de Axl en pacientes de insuficiencia cardiaca, tanto a nivel de tejido como a nivel plasmático en su forma soluble (sAxl). Observamos mayores niveles del receptor en tejido de biopsias de miocardio de pacientes que en controles, alcanzando un promedio 6 veces superior. Esto nos sugiere una relación entre la proporción del receptor y la condición del órgano cardiaco.

A nivel plasmático no solo detectamos mayores niveles de sAxl en pacientes que en controles, sino que además la concentración del receptor soluble se elevaba paralelamente al del deterioro de la condición del corazón de los pacientes. Los mayores niveles de sAxl se encontraron con enfermedad más avanzada pacientes en niveles de NYHA III-IV. Para poder evaluar la discriminación entre pacientes de HF-REF y HF-PEF, y controles, se realizó el análisis

estadístico ROC (Receiver-Operator Characteristic Curve). La misma dio una diferencia significativa de  $p < 0.0001$  en el caso de los pacientes de HF-REF y de  $p < 0.05$  en pacientes de HF-PEF, con respecto a los controles. Con el valor de corte escogido, se obtenía una sensibilidad de 70.3% y una especificidad de 64.2% para el primer caso.

En nuestro estudio no observamos diferencias en las muestras donde se analizó sAxl, al ser clasificadas por sexo, edad y por factores de riesgo cardiovascular. Al comparar los valores de sAxl con el parámetro inflamatorio de proteína reactiva C (CRP), observamos una relación directa. El mismo caso se presentó con BNP, el principal marcador utilizado en esta enfermedad. Los valores de sensibilidad y de especificidad de BNP, de 90-97% y de 62-67% (según la concentración que se emplee) respectivamente, colocan a este marcador en una mejor posición al compararlo con sAxl. En cuanto a la vida media de la proteína, característica importante a considerar al momento de la toma de muestras de pacientes y su respectivo análisis, observamos que BNP solo cuenta con 20 minutos aproximadamente, frente a días en los que sAxl puede estar preservado a bajas temperaturas. Este dato poco significativo a primera impresión, marca la diferencia en cuanto al manejo de las muestras y la estimación correcta de la concentración de las proteínas en sangre. Un margen de 20 minutos obliga al personal a tener toda la metodología para la estimación de la proteína lista en el momento de la toma de la muestra, además de que el mismo debe ser realizado sin margen de error, el cual se incrementa por la presión del tiempo. Por el caso contrario, sAxl permite el almacenaje de la muestra, con el fin de evaluar diferentes parámetros en un mismo tiempo, aprovechando mejor el volumen de la muestra, y dando mayor margen al personal para realizar su estimación.

Con este trabajo logramos alcanzar varios objetivos que nos parecían relevantes. Logramos evaluar por primera vez los valores de concentración de Axl en tejido cardiaco, y demostrar a su vez que el mismo se encuentra en mayor proporción en pacientes con insuficiencia cardiaca. Observamos un aumento de sAxl en sangre de pacientes, en concordancia a los niveles de expresión observados en el corazón, y evidenciamos además que estos valores aumentan junto al agravamiento de la enfermedad. Estos datos nos dieron motivos para proponer a Axl como un nuevo biomarcador de insuficiencia cardiaca. Es necesario seguir estudiando la relación entre Axl y la insuficiencia cardiaca, para poder establecer el rol de este receptor en esta enfermedad. Ensayos con modelos de animales para insuficiencia cardiaca, con variaciones *knockout* para el gen AXL, serían un punto de partida interesante, para poder obtener más información sobre la relación existente entre Axl y esta importante enfermedad cardiaca.

## Cáncer de Colon

Como indicábamos en la introducción, el cáncer de colon es una de las variantes más extendidas de este tipo de enfermedad, estimando su alcance a 2.2 millones de personas mundialmente. A partir de numerosos estudios realizados en varios tipos de cáncer, sobre el papel del sistema TAM en los mismos, nos planteamos evaluar el efecto del mismo en muestras de pacientes de cáncer de colon.

Una proliferación celular no controlada y todo lo que ésta acarrea, conducen al desarrollo y progresión del cáncer. Funciones básicas como la proliferación, migración, adhesión y supervivencia, son importantes funciones reguladas por el sistema TAM, que bajo condiciones descontroladas, pueden ser determinantes para el desarrollo de esta enfermedad. Para evaluar su posible efecto, realizamos la comparación más directa posible, al evaluar los niveles de expresión a nivel de mRNA de todos los componentes del sistema en tejidos pareados (sanos y tumorales) de pacientes. De esta manera pudimos evidenciar diferencias significativas en la expresión de Gas6, Tyro3 y MerTk, siendo menor en el último receptor.

Podemos suponer que los altos niveles de Tyro3 a nivel de mRNA, pueden contribuir a la aparición de cáncer, debido a su contribución en la supervivencia y migración de las células, factores fundamentales en el desarrollo del cáncer como se comentó en la introducción a este tema. Los niveles de este receptor en su forma soluble también fueron significativamente mayores en los pacientes en comparación con los controles sanos en las primeras etapas de cáncer, alcanzando el mayor grado de diferencia en el estadio IV de esta enfermedad. Al realizar el ensayo inmuno- histoquímico sobre Tyro3 en muestras de tejido, comprobamos que este receptor se encontraba en mayores proporciones en el tejido tumoral, en comparación con su par sano. Estos resultados sugieren que Tyro3 puede tener un efecto en el desarrollo del cáncer, como se reportó en el caso de líneas celulares de melanoma, donde una sobre expresión de este receptor incrementaba las señales de supervivencia de las mismas, contribuyendo con la progresión de la enfermedad.

En el caso del ligando Gas6 observamos también un aumento en su expresión génica en el tejido tumoral, pero a nivel de plasma se evidencio una disminución significativa en su concentración en pacientes al compararla con las muestras controles. Este dato ha sido también reportado recientemente en cáncer colorectal, atribuyéndole a Gas6 una función inhibidora en este tipo de cáncer. Habría que realizar más experimentos comparativos, para poder establecer la función de este ligando en el cáncer de colon.

Con estos resultados se pudiera decir entonces que el sistema TAM contribuye a crear las condiciones necesarias para la aparición de células cancerígenas o para el desarrollo y proliferación de las mismas. Otros estudios pudieran realizarse con el fin de esclarecer las vías

por las cuales este sistema de proteínas tirosina quinasas afecta el comportamiento normal de las células. Ampliar los ensayos inmuno- histoquímicos y de ELISA al resto de los miembros del sistema TAM, pudiera ayudar a establecer más comparaciones con el fin de sacar conclusiones más precisas. Con la información que se puede recabar de estos estudios, pudieran desarrollarse terapias orientadas a evitar o disminuir los efectos negativos que pueden desarrollar este grupo de proteínas sobre las células cancerígenas.

## VI. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se ha logrado poner a punto la técnica de ELISA para la estimación de los 5 miembros de la familia TAM en estado soluble en plasma.
- Observamos un aumento de los niveles solubles de los receptores del sistema TAM en pacientes de Lupus en comparación con controles sanos.
- Evidenciamos un aumento en la concentración de Gas6 y una disminución de la proteína S en plasma de pacientes de Lupus en comparación con controles sanos.
- Identificamos variantes del intron 1 de *MERTK* (AA), al intron 8 de *GAS6* (AA+AG) y al intron I18 de *AXL* (AG) con aumentos de sus respectivos productos proteicos en plasma de pacientes de Lupus.
- Observamos un aumento de los niveles de sAxl en plasma de pacientes de insuficiencia cardíaca (HF-REF y HF-PEF) en comparación con controles sanos.
- Los niveles de mRNA de *AXL* en tejido cardíaco de pacientes de insuficiencia cardíaca fueron 6 veces mayores a los obtenidos en muestras de controles sanos.
- Los aumentos de concentración de sAxl en pacientes de insuficiencia cardíaca se relacionan con el deterioro del estado de los mismos, y con un aumento de los síntomas de la enfermedad. Permitiendo plantear su uso como biomarcador de esta enfermedad.
- Los niveles de expresión relativa de mRNA de Gas6 y Tyro3 se ven aumentados en 2,3 y 6,36 veces respectivamente en muestras de tejido de pacientes de cáncer de colon, al ser pareados con tejido sano del mismo paciente.
- En pacientes de cáncer de colon observamos un aumento de los niveles de sTyro3 en comparación con los niveles de personas sanas, atribuyéndole una función protumoral a este receptor. El caso contrario se observó en Gas6, atribuyéndole una función antitumoral.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Akitake-Kawano, R., H. Seno, et al. (2013). "Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis." Carcinogenesis **34**(7): 1567-1574.
- Alciato, F., P. P. Sainaghi, et al. (2010). "TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages." J Leukoc Biol **87**(5): 869-875.
- Allen, M. P., D. A. Linseman, et al. (2002). "Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase." Mol Cell Biol **22**(2): 599-613.
- Ammoun, S., L. Provenzano, et al. (2013). "Axl/Gas6/NFkappaB signalling in schwannoma pathological proliferation, adhesion and survival." Oncogene.
- Amri, R., L. G. Bordeianou, et al. (2013). "Preoperative carcinoembryonic antigen as an outcome predictor in colon cancer." J Surg Oncol **108**(1): 14-18.
- Anderson, H. A., C. A. Maylock, et al. (2003). "Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells." Nat Immunol **4**(1): 87-91.
- Angelillo-Scherrer, A., P. de Frutos, et al. (2001). "Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis." Nat Med **7**(2): 215-221.
- Arribas, J. and A. Merlos-Suarez (2003). "Shedding of plasma membrane proteins." Curr Top Dev Biol **54**: 125-144.
- Ascheim, D. D. and K. Hryniewicz (2002). "Thyroid hormone metabolism in patients with congestive heart failure: the low triiodothyronine state." Thyroid **12**(6): 511-515.
- Avanzi, G. C., M. Gallicchio, et al. (1997). "GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity." Exp Hematol **25**(12): 1219-1226.
- Avilla, E., V. Guarino, et al. (2011). "Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer." Cancer Res **71**(5): 1792-1804.
- Bellido-Martin, L. and P. G. de Frutos (2008). "Vitamin K-dependent actions of Gas6." Vitam Horm **78**: 185-209.
- Bellosta, P., M. Costa, et al. (1995). "The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding." Mol Cell Biol **15**(2): 614-625.
- Bellosta, P., Q. Zhang, et al. (1997). "Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation." Oncogene **15**(20): 2387-2397.
- Benson, A. B., 3rd, J. P. Arnoletti, et al. (2011). "Colon cancer." J Natl Compr Canc Netw **9**(11): 1238-1290.
- Berclaz, G., H. J. Altermatt, et al. (2001). "Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast." Ann Oncol **12**(6): 819-824.
- Bhalla, V., S. Willis, et al. (2004). "B-type natriuretic peptide: the level and the drug--partners in the diagnosis of congestive heart failure." Congest Heart Fail **10**(1 Suppl 1): 3-27.
- Blostein, M. D., I. Rajotte, et al. (2011). "Elevated plasma gas6 levels are associated with venous thromboembolic disease." J Thromb Thrombolysis **32**(3): 272-278.
- Bombardier, C., D. D. Gladman, et al. (1992). "Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE." Arthritis Rheum **35**(6): 630-640.
- Bouchard, B. A., B. Furie, et al. (1999). "Glutamyl substrate-induced exposure of a free cysteine residue in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase is critical for vitamin K epoxidation." Biochemistry **38**(29): 9517-9523.

- Camenisch, T. D., B. H. Koller, et al. (1999). "A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." J Immunol **162**(6): 3498-3503.
- Chagpar, R., Y. Xing, et al. (2012). "Adherence to stage-specific treatment guidelines for patients with colon cancer." J Clin Oncol **30**(9): 972-979.
- Challier, C., C. C. Uphoff, et al. (1996). "Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines." Leukemia **10**(5): 781-787.
- Chan, M. C., J. P. Mather, et al. (2000). "Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand Gas6 in testicular somatic cells." J Androl **21**(2): 291-302.
- Chen, C., Q. Li, et al. (2004). "Mer receptor tyrosine kinase signaling participates in platelet function." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1118-1123.
- Chen, J., K. Carey, et al. (1997). "Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation." Oncogene **14**(17): 2033-2039.
- Chung, B. I., S. B. Malkowicz, et al. (2003). "Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma." DNA Cell Biol **22**(8): 533-540.
- Collett, G., A. Wood, et al. (2003). "Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes." Circ Res **92**(10): 1123-1129.
- Costa, M., P. Bellosta, et al. (1996). "Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo." J Cell Physiol **168**(3): 737-744.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Craven, R. J., L. H. Xu, et al. (1995). "Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer." Int J Cancer **60**(6): 791-797.
- Crosier, K. E., L. R. Hall, et al. (1994). "Isolation and characterization of the human DTK receptor tyrosine kinase." Growth Factors **11**(2): 137-144.
- Crosier, P. S., L. R. Hall, et al. (1995). "Identification of a novel receptor tyrosine kinase expressed in acute myeloid leukemic blasts." Leuk Lymphoma **18**(5-6): 443-449.
- Dahlback, B. (1991). "Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system." Thromb Haemost **66**(1): 49-61.
- Dahlback, B. (2005). "Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases." J Intern Med **257**(3): 209-223.
- Dahlback, B. and B. O. Villoutreix (2005). "Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(7): 1311-1320.
- Dalle Vedove, C., J. C. Simon, et al. (2012). "Drug-induced lupus erythematosus with emphasis on skin manifestations and the role of anti-TNFalpha agents." J Dtsch Dermatol Ges.
- Daubert, M. A. and A. Jeremias (2010). "The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings." Vasc Health Risk Manag **6**: 691-699.
- Davis, M., E. Espiner, et al. (1994). "Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnoea." Lancet **343**(8895): 440-444.
- D'Cruz, D. P., M. A. Khamashta, et al. (2007). "Systemic lupus erythematosus." Lancet **369**(9561): 587-596.
- Deanfield, J. E., J. P. Halcox, et al. (2007). "Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance." Circulation **115**(10): 1285-1295.
- Demarest, S. J., J. Gardner, et al. (2013). "Evaluation of Tyro3 expression, Gas6-mediated Akt phosphorylation, and the impact of anti-Tyro3 antibodies in melanoma cell lines." Biochemistry **52**(18): 3102-3118.
- Deng, Y. and B. P. Tsao (2010). "Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era." Nat Rev Rheumatol **6**(12): 683-692.

- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." *Eur Heart J* **29**(19): 2388-2442.
- Dirks, W., D. Rome, et al. (1999). "Expression of the growth arrest-specific gene 6 (GAS6) in leukemia and lymphoma cell lines." *Leuk Res* **23**(7): 643-651.
- DiScipio, R. G. and E. W. Davie (1979). "Characterization of protein S, a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma." *Biochemistry* **18**(5): 899-904.
- Dufies, M., A. Jacquel, et al. (2011). "Mechanisms of AXL overexpression and function in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells." *Oncotarget* **2**(11): 874-885.
- Easty, D. J., S. E. Ganz, et al. (1993). "Novel and known protein tyrosine kinases and their abnormal expression in human melanoma." *J Invest Dermatol* **101**(5): 679-684.
- Edenbrandt, C. M., A. Lundwall, et al. (1990). "Molecular analysis of the gene for vitamin K dependent protein S and its pseudogene. Cloning and partial gene organization." *Biochemistry* **29**(34): 7861-7868.
- Ekman, C., A. Jonsen, et al. (2011). "Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus." *Rheumatology (Oxford)* **50**(6): 1064-1069.
- Ekman, C., J. Stenhoff, et al. (2010). "Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood." *J Thromb Haemost* **8**(4): 838-844.
- Escobar, C., J. L. Santiago-Ruiz, et al. (2011). "Diagnosis of heart failure in elderly patients: a clinical challenge." *Eur J Heart Fail* **13**(10): 1152; author reply 1152-1153.
- Evenas, P., B. Dahlback, et al. (2000). "The first laminin G-type domain in the SHBG-like region of protein S contains residues essential for activation of the receptor tyrosine kinase sky." *Biol Chem* **381**(3): 199-209.
- Fair, D. S. and R. A. Marlar (1986). "Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S, and the Protein C inhibitor from a human hepatoma cell line." *Blood* **67**(1): 64-70.
- Fair, D. S., R. A. Marlar, et al. (1986). "Human endothelial cells synthesize protein S." *Blood* **67**(4): 1168-1171.
- Fisher, P. W., M. Brigham-Burke, et al. (2005). "A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody." *Biochem J* **387**(Pt 3): 727-735.
- Fridell, Y. W., Y. Jin, et al. (1996). "Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* **16**(1): 135-145.
- Furie, B., B. A. Bouchard, et al. (1999). "Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid." *Blood* **93**(6): 1798-1808.
- Gaggin, H. K. and J. L. Januzzi, Jr. (2013). "Biomarkers and diagnostics in heart failure." *Biochim Biophys Acta*.
- Gaggin, H. K. and J. L. Januzzi, Jr. (2013). "Biomarkers and diagnostics in heart failure." *Biochim Biophys Acta*.
- Gallicchio, M., S. Mitola, et al. (2005). "Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor." *Blood* **105**(5): 1970-1976.
- Garcia de Frutos, P., P. Fuentes-Prior, et al. (2007). "Molecular basis of protein S deficiency." *Thromb Haemost* **98**(3): 543-556.
- Gjerdum, C., C. Tiron, et al. (2010). "Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(3): 1124-1129.

- Gladman, D. D., D. Ibanez, et al. (2002). "Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000." J Rheumatol **29**(2): 288-291.
- Gomberg-Maitland, M. and W. H. Frishman (1998). "Thyroid hormone and cardiovascular disease." Am Heart J **135**(2 Pt 1): 187-196.
- Goruppi, S., H. Yamane, et al. (1997). "The product of a gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation." FEBS Lett **415**(1): 59-63.
- Gould, W. R., S. M. Baxi, et al. (2005). "Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses." J Thromb Haemost **3**(4): 733-741.
- Graham, D. K., T. L. Dawson, et al. (1994). "Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer." Cell Growth Differ **5**(6): 647-657.
- Gravalos, C., P. Garcia-Alfonso, et al. (2011). "Recommendations and expert opinion on the treatment of locally advanced rectal cancer in Spain." Clin Transl Oncol **13**(12): 862-868.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten, et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-899.
- Guerra, S. G., T. J. Vyse, et al. (2012). "The genetics of lupus: a functional perspective." Arthritis Res Ther **14**(3): 211.
- Guo, H., T. M. Barrett, et al. (2011). "Protein S blocks the extrinsic apoptotic cascade in tissue plasminogen activator/N-methyl D-aspartate-treated neurons via Tyro3-Akt-FKHRL1 signaling pathway." Mol Neurodegener **6**: 13.
- Gustafsson, A., A. K. Bostrom, et al. (2009). "Gas6 and the receptor tyrosine kinase Axl in clear cell renal cell carcinoma." PLoS One **4**(10): e7575.
- Gustafsson, A., D. Martuszczyńska, et al. (2009). "Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival." Clin Cancer Res **15**(14): 4742-4749.
- Guttridge, K. L., J. C. Luft, et al. (2002). "Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation." J Biol Chem **277**(27): 24057-24066.
- Guzman, D. A. and G. T. Quiroga (2010). "[Troponin in the diagnosis of myocardial infarction: An approach from the Clinical Laboratory]." Rev Med Chil **138**(3): 379-382.
- Hafizi, S. and B. Dahlback (2006). "Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily." FEBS J **273**(23): 5231-5244.
- Hafizi, S. and B. Dahlback (2006). "Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases." Cytokine Growth Factor Rev **17**(4): 295-304.
- Hafizi, S., F. Alindri, et al. (2002). "Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin." Biochem Biophys Res Commun **299**(5): 793-800.
- Hafizi, S., F. Ibraimi, et al. (2005). "C1-TEN is a negative regulator of the Akt/PKB signal transduction pathway and inhibits cell survival, proliferation, and migration." FASEB J **19**(8): 971-973.
- Hall, M. O., M. S. Obin, et al. (2005). "Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **81**(5): 581-591.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hansson, K. and J. Stenflo (2005). "Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation." J Thromb Haemost **3**(12): 2633-2648.
- Hay, E. M., P. A. Bacon, et al. (1993). "The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus." Q J Med **86**(7): 447-458.
- Hayflick, L. (1997). "Mortality and immortality at the cellular level. A review." Biochemistry (Mosc) **62**(11): 1180-1190.
- Hayflick, L. (2000). "The illusion of cell immortality." Br J Cancer **83**(7): 841-846.

- He, J., L. R. Wilkens, et al. (2011). "Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **20**(1): 70-81.
- He, L., J. Zhang, et al. (2010). "Differential expression of Axl in hepatocellular carcinoma and correlation with tumor lymphatic metastasis." Mol Carcinog **49**(10): 882-891.
- Hon, K. L. and A. K. Leung (2012). "Neonatal lupus erythematosus." Autoimmune Dis **2012**: 301274.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, et al. (1999). "Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta." J Bone Miner Res **14**(7): 1239-1249.
- Huang, M., A. C. Rigby, et al. (2003). "Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins." Nat Struct Biol **10**(9): 751-756.
- Hunt, P. J., A. M. Richards, et al. (1997). "Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment." Clin Endocrinol (Oxf) **47**(3): 287-296.
- Hurtado, B., N. Abasolo, et al. (2010). "Association study between polymorphisms in GAS6-TAM genes and carotid atherosclerosis." Thromb Haemost **104**(3): 592-598.
- Hurtado, B., X. Munoz, et al. (2011). "Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques." Thromb Haemost **105**(5): 873-882.
- Hutterer, M., P. Knyazev, et al. (2008). "Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme." Clin Cancer Res **14**(1): 130-138.
- Iseberg, D. A., A. Rahman, et al. (2005). "BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **44**(7): 902-906.
- Ito, M., M. Nakashima, et al. (2002). "Expression of receptor-type tyrosine kinase, Axl, and its ligand, Gas6, in pediatric thyroid carcinomas around chernobyl." Thyroid **12**(11): 971-975.
- Ito, T., M. Ito, et al. (1999). "Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma." Thyroid **9**(6): 563-567.
- Januzzi, J. L., Jr., A. A. Chen-Tournoux, et al. (2008). "Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing for the diagnosis or exclusion of heart failure in patients with acute symptoms." Am J Cardiol **101**(3A): 29-38.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Katagiri, M., Y. Hakeda, et al. (2001). "Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts." J Biol Chem **276**(10): 7376-7382.
- Kim, H. A., J. Y. Nam, et al. (2013). "Serum Growth Arrest-Specific Protein 6 Levels are a Reliable Biomarker of Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus." J Clin Immunol **33**(1): 143-150.
- Klein, I. and K. Ojamaa (1998). "Thyroid hormone treatment of congestive heart failure." Am J Cardiol **81**(4): 490-491.
- Konishi, A., T. Aizawa, et al. (2004). "Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **279**(27): 28766-28770.
- Koprowski, H., M. Herlyn, et al. (1981). "Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma." Science **212**(4490): 53-55.
- Korshunov, V. A. (2012). "Axl-dependent signalling: a clinical update." Clin Sci (Lond) **122**(8): 361-368.
- Korshunov, V. A., A. M. Mohan, et al. (2006). "Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling." Circ Res **98**(11): 1446-1452.
- Kulman, J. D., J. E. Harris, et al. (1997). "Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9058-9062.

- Lai, C. and G. Lemke (1991). "An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system." *Neuron* **6**(5): 691-704.
- Laurance, S., C. A. Lemarie, et al. (2012). "Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis." *Adv Nutr* **3**(2): 196-203.
- Lee, Y. J., J. Y. Han, et al. (2012). "Inhibiting Mer receptor tyrosine kinase suppresses STAT1, SOCS1/3, and NF-kappaB activation and enhances inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced acute lung injury." *J Leukoc Biol* **91**(6): 921-932.
- Lemke, G. and C. V. Rothlin (2008). "Immunobiology of the TAM receptors." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 327-336.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **141**(7): 1117-1134.
- Levin, E. R., D. G. Gardner, et al. (1998). "Natriuretic peptides." *N Engl J Med* **339**(5): 321-328.
- Li, Y., X. Ye, et al. (2009). "Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis." *Oncogene* **28**(39): 3442-3455.
- Lin, W. C., A. F. Li, et al. (1999). "tie-1 protein tyrosine kinase: a novel independent prognostic marker for gastric cancer." *Clin Cancer Res* **5**(7): 1745-1751.
- Ling, L. and H. J. Kung (1995). "Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6582-6592.
- Linger, R. M., A. K. Keating, et al. (2008). "TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer." *Adv Cancer Res* **100**: 35-83.
- Linger, R. M., A. K. Keating, et al. (2010). "Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors." *Expert Opin Ther Targets* **14**(10): 1073-1090.
- Linger, R. M., R. A. Cohen, et al. (2012). "Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer." *Oncogene*.
- Linz, U., L. Schleithoff, et al. (1993). "A PvuII-polymorphism within the AXL gene on chromosome 19q13.1." *Hum Mol Genet* **2**(4): 492.
- Locker, G. Y., S. Hamilton, et al. (2006). "ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer." *J Clin Oncol* **24**(33): 5313-5327.
- Loges, S., T. Schmidt, et al. (2010). "Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6." *Blood* **115**(11): 2264-2273.
- Long, G. L., A. Marshall, et al. (1988). "Genes for human vitamin K-dependent plasma proteins C and S are located on chromosomes 2 and 3, respectively." *Somat Cell Mol Genet* **14**(1): 93-98.
- Lu, Q. and G. Lemke (2001). "Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family." *Science* **293**(5528): 306-311.
- Lu, Q., M. Gore, et al. (1999). "Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis." *Nature* **398**(6729): 723-728.
- Lundwall, A., W. Dackowski, et al. (1986). "Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(18): 6716-6720.
- Luo, J., B. D. Manning, et al. (2003). "Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise." *Cancer Cell* **4**(4): 257-262.
- Lutgens, E., M. Tjwa, et al. (2008). "Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis." *J Pathol* **216**(1): 55-63.
- Mackiewicz, M., K. Huppi, et al. (2011). "Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA." *Breast Cancer Res Treat* **130**(2): 663-679.
- Macleod, K., P. Mullen, et al. (2005). "Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer." *Cancer Res* **65**(15): 6789-6800.

- Mahajan, K. and N. P. Mahajan (2010). "Shepherding AKT and androgen receptor by Ack1 tyrosine kinase." *J Cell Physiol* **224**(2): 327-333.
- Mahajan, N. P. and H. S. Earp (2003). "An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action." *J Biol Chem* **278**(43): 42596-42603.
- Mahajan, N. P., Y. E. Whang, et al. (2005). "Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox." *Cancer Res* **65**(22): 10514-10523.
- Maidhof, W. and O. Hilar (2012). "Lupus: an overview of the disease and management options." *P T* **37**(4): 240-249.
- Malm, J., X. H. He, et al. (1994). "Vitamin K-dependent protein S in Leydig cells of human testis." *Biochem J* **302** ( Pt 3): 845-850.
- Manfioletti, G., C. Brancolini, et al. (1993). "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**(8): 4976-4985.
- Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* **298**(5600): 1912-1934.
- Mantovani, A. and A. Sica (2010). "Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity." *Curr Opin Immunol* **22**(2): 231-237.
- Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* **454**(7203): 436-444.
- Manzano, L., C. Escobar, et al. (2012). "Diagnosis of elderly patients with heart failure." *Eur J Heart Fail.*
- Marcandalli, P., M. Gostissa, et al. (1997). "Identification and tissue expression of a splice variant for the growth arrest-specific gene gas6." *FEBS Lett* **415**(1): 56-58.
- Maree, A. O., H. Jneid, et al. (2007). "Growth arrest specific gene (GAS) 6 modulates platelet thrombus formation and vascular wall homeostasis and represents an attractive drug target." *Curr Pharm Des* **13**(26): 2656-2661.
- Mark, M. R., D. T. Scadden, et al. (1994). "rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain." *J Biol Chem* **269**(14): 10720-10728.
- Mark, M. R., J. Chen, et al. (1996). "Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl." *J Biol Chem* **271**(16): 9785-9789.
- McCloskey, P., Y. W. Fridell, et al. (1997). "GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl." *J Biol Chem* **272**(37): 23285-23291.
- McColl, A., S. Bournazos, et al. (2009). "Glucocorticoids induce protein S-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by human macrophages." *J Immunol* **183**(3): 2167-2175.
- McLeod, H. L. and G. I. Murray (1999). "Tumour markers of prognosis in colorectal cancer." *Br J Cancer* **79**(2): 191-203.
- Meric, F., W. P. Lee, et al. (2002). "Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer." *Clin Cancer Res* **8**(2): 361-367.
- Mevorach, D. (2003). "Systemic lupus erythematosus and apoptosis: a question of balance." *Clin Rev Allergy Immunol* **25**(1): 49-60.
- Mishra, A., J. Wang, et al. (2012). "Hypoxia stabilizes GAS6/AXI signaling in metastatic prostate cancer." *Mol Cancer Res.*
- Mohan, C., S. Adams, et al. (1993). "Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus." *J Exp Med* **177**(5): 1367-1381.
- Munoz, X., V. Obach, et al. (2007). "Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke." *Thromb Haemost* **98**(2): 406-412.
- Murashima, A., T. Fukazawa, et al. (2004). "Long term prognosis of children born to lupus patients." *Ann Rheum Dis* **63**(1): 50-53.

- Murashima, A., T. Fukazawa, et al. (2004). "Long term prognosis of children born to lupus patients." Ann Rheum Dis **63**(1): 50-53.
- Nagata, K., K. Ohashi, et al. (1996). "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**(47): 30022-30027.
- Nakano, T., K. Higashino, et al. (1995). "Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors." J Biol Chem **270**(11): 5702-5705.
- Nakano, T., M. Tani, et al. (2003). "Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma." Clin Exp Metastasis **20**(7): 665-674.
- Neubauer, A., A. Burchert, et al. (1997). "Recent progress on the role of Axl, a receptor tyrosine kinase, in malignant transformation of myeloid leukemias." Leuk Lymphoma **25**(1-2): 91-96.
- Neubauer, A., A. Fiebeler, et al. (1994). "Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis." Blood **84**(6): 1931-1941.
- Nielsen-Preiss, S. M., M. P. Allen, et al. (2007). "Adhesion-related kinase induction of migration requires phosphatidylinositol-3-kinase and ras stimulation of rac activity in immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal cells." Endocrinology **148**(6): 2806-2814.
- O'Bryan, J. P., R. A. Frye, et al. (1991). "axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase." Mol Cell Biol **11**(10): 5016-5031.
- Ohashi, K., K. Nagata, et al. (1995). "Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6." J Biol Chem **270**(39): 22681-22684.
- Omland, T., J. A. de Lemos, et al. (2009). "A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease." N Engl J Med **361**(26): 2538-2547.
- Ou, W. B., J. M. Corson, et al. (2011). "AXL regulates mesothelioma proliferation and invasiveness." Oncogene **30**(14): 1643-1652.
- Paccez, J. D., G. J. Vasques, et al. (2012). "The receptor tyrosine kinase Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target." Oncogene.
- Palazzuoli, A., M. Gallotta, et al. (2010). "Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure." Vasc Health Risk Manag **6**: 411-418.
- Panteghini, M., F. Pagani, et al. (1999). "The sensitivity of cardiac markers: an evidence-based approach." Clin Chem Lab Med **37**(11-12): 1097-1106.
- Pao-Chun, L., P. M. Chan, et al. (2009). "Cytoplasmic ACK1 interaction with multiple receptor tyrosine kinases is mediated by Grb2: an analysis of ACK1 effects on Axl signaling." J Biol Chem **284**(50): 34954-34963.
- Park, H. J., Y. H. Choi, et al. (2011). "RhoA-mediated signaling up-regulates hepatocyte growth factor gene and protein expression in response to apoptotic cells." J Leukoc Biol **89**(3): 399-411.
- Ploos van Amstel, H. K., A. L. van der Zanden, et al. (1987). "Human protein S cDNA encodes Phe-16 and Tyr 222 in consensus sequences for the post-translational processing." FEBS Lett **222**(1): 186-190.
- Ploos van Amstel, H. K., P. H. Reitsma, et al. (1990). "Intron-exon organization of the active human protein S gene PS alpha and its pseudogene PS beta: duplication and silencing during primate evolution." Biochemistry **29**(34): 7853-7861.
- Png, K. J., N. Halberg, et al. (2012). "A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells." Nature **481**(7380): 190-194.
- Polvi, A., E. Armstrong, et al. (1993). "The human TYRO3 gene and pseudogene are located in chromosome 15q14-q25." Gene **134**(2): 289-293.
- Prasad, D., C. V. Rothlin, et al. (2006). "TAM receptor function in the retinal pigment epithelium." Mol Cell Neurosci **33**(1): 96-108.

- Prystowsky, S. D. and J. N. Gilliam (1975). "Discoid lupus erythematosus as part of a larger disease spectrum. Correlation of clinical features with laboratory findings in lupus erythematosus." Arch Dermatol **111**(11): 1448-1452.
- Prystowsky, S. D. and J. N. Gilliam (1975). "Discoid lupus erythematosus as part of a larger disease spectrum. Correlation of clinical features with laboratory findings in lupus erythematosus." Arch Dermatol **111**(11): 1448-1452.
- Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." Cell **141**(1): 39-51.
- Qiao, J. L., Y. Shen, et al. (2010). "Proteolysis of platelet receptors in humans and other species." Biol Chem **391**(8): 893-900.
- Ramani, G. V., P. A. Uber, et al. (2010). "Chronic heart failure: contemporary diagnosis and management." Mayo Clin Proc **85**(2): 180-195.
- Rankin, E. B., K. C. Fuh, et al. (2010). "AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer." Cancer Res **70**(19): 7570-7579.
- Recarte-Pelz, P., D. Tassies, et al. (2013). "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 **15**(2): R41.
- Rezende, S. M., R. E. Simmonds, et al. (2004). "Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex." Blood **103**(4): 1192-1201.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene **19**(49): 5548-5557.
- Rochlitz, C., A. Lohri, et al. (1999). "Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK)." Leukemia **13**(9): 1352-1358.
- Romero-Diaz, J., D. Isenberg, et al. (2011). "Measures of adult systemic lupus erythematosus: updated version of British Isles Lupus Assessment Group (BILAG 2004), European Consensus Lupus Activity Measurements (ECLAM), Systemic Lupus Activity Measure, Revised (SLAM-R), Systemic Lupus Activity Questionnaire for Population Studies (SLAQ), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K), and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI)." Arthritis Care Res (Hoboken) **63 Suppl 11**: S37-46.
- Rothlin, C. V. and G. Lemke (2010). "TAM receptor signaling and autoimmune disease." Curr Opin Immunol **22**(6): 740-746.
- Rothlin, C. V., S. Ghosh, et al. (2007). "TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response." Cell **131**(6): 1124-1136.
- Ruan, G. X. and A. Kazlauskas (2012). "Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt." EMBO J **31**(7): 1692-1703.
- Saccone, S., P. Marcandalli, et al. (1995). "Assignment of the human GAS6 gene to chromosome 13q34 by fluorescence in situ hybridization." Genomics **30**(1): 129-131.
- Sahai, E. (2007). "Illuminating the metastatic process." Nat Rev Cancer **7**(10): 737-749.
- Sainaghi, P. P., L. Castello, et al. (2005). "Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor." J Cell Physiol **204**(1): 36-44.
- Salazar, R., P. Roepman, et al. (2011). "Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer." J Clin Oncol **29**(1): 17-24.
- Saller, F., L. Burnier, et al. (2006). "Role of the growth arrest-specific gene 6 (gas6) product in thrombus stabilization." Blood Cells Mol Dis **36**(3): 373-378.

- Sather, S., K. D. Kenyon, et al. (2007). "A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation." Blood **109**(3): 1026-1033.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.
- Schmidt, T., I. Ben-Batalla, et al. (2012). "Macrophage-tumor crosstalk: role of TAMR tyrosine kinase receptors and of their ligands." Cell Mol Life Sci **69**(9): 1391-1414.
- Schneider, C., R. M. King, et al. (1988). "Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells." Cell **54**(6): 787-793.
- Scofield, R. H., G. R. Bruner, et al. (2008). "Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome." Arthritis Rheum **58**(8): 2511-2517.
- Scott, R. S., E. J. McMahon, et al. (2001). "Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER." Nature **411**(6834): 207-211.
- Selvaraj, S., I. Klein, et al. (2012). "Association of serum triiodothyronine with B-type natriuretic Peptide and severe left ventricular diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction." Am J Cardiol **110**(2): 234-239.
- Sen, P., M. A. Wallet, et al. (2007). "Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells." Blood **109**(2): 653-660.
- Shah, R. V., A. A. Chen-Tournoux, et al. (2009). "Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acute dyspnea." Circ Heart Fail **2**(4): 311-319.
- Shieh, Y. S., C. Y. Lai, et al. (2005). "Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression." Neoplasia **7**(12): 1058-1064.
- Shiozawa, Y., E. A. Pedersen, et al. (2010). "GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche." Neoplasia **12**(2): 116-127.
- Smith, C. D. and M. Cyr (1988). "The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler." Rheum Dis Clin North Am **14**(1): 1-14.
- Stenflo, J. and J. W. Suttie (1977). "Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid." Annu Rev Biochem **46**: 157-172.
- Stenhoff, J., B. Dahlback, et al. (2004). "Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 871-878.
- Stern, D., J. Brett, et al. (1986). "Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S." J Cell Biol **102**(5): 1971-1978.
- Stitt, T. N., G. Conn, et al. (1995). "The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases." Cell **80**(4): 661-670.
- Su, A. I., T. Wiltshire, et al. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6062-6067.
- Subarsky, P. and R. P. Hill (2003). "The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression." Clin Exp Metastasis **20**(3): 237-250.
- Suh, C. H., B. Hilliard, et al. (2010). "TAM receptor ligands in lupus: protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus." Arthritis Res Ther **12**(4): R146.
- Sun, W. S., J. Fujimoto, et al. (2003). "Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers." Ann Oncol **14**(6): 898-906.
- Sun, W., J. Fujimoto, et al. (2004). "Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers." Oncology **66**(6): 450-457.
- Tanabe, K., K. Nagata, et al. (1997). "Roles of gamma-carboxylation and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6." FEBS Lett **408**(3): 306-310.

- Thorp, E., T. Vaisar, et al. (2011). "Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase Cdelta, and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)." J Biol Chem **286**(38): 33335-33344.
- Timpl, R., D. Tisi, et al. (2000). "Structure and function of laminin LG modules." Matrix Biol **19**(4): 309-317.
- Todt, J. C., B. Hu, et al. (2004). "The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages." J Leukoc Biol **75**(4): 705-713.
- Tsuchida, K. and K. Tanabe (2008). "Plasma brain natriuretic peptide concentrations and the risk of cardiovascular events and death in general practice." J Cardiol **52**(3): 212-223.
- Tucker, J. F., R. A. Collins, et al. (1997). "Early diagnostic efficiency of cardiac troponin I and Troponin T for acute myocardial infarction." Acad Emerg Med **4**(1): 13-21.
- Uehara, H. and E. Shacter (2008). "Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells." J Immunol **180**(4): 2522-2530.
- Vajkoczy, P., P. Knyazev, et al. (2006). "Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 5799-5804.
- Valverde, P. (2005). "Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation." Biochem Biophys Res Commun **333**(1): 180-185.
- van Goor, H., W. B. Melenhorst, et al. (2009). "Adamalysins in biology and disease." J Pathol **219**(3): 277-286.
- Varnum, B. C., C. Young, et al. (1995). "Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6." Nature **373**(6515): 623-626.
- Vaughan, C. A., S. Singh, et al. (2012). "Gain-of-Function Activity of Mutant p53 in Lung Cancer through Up-Regulation of Receptor Protein Tyrosine Kinase Axl." Genes Cancer **3**(7-8): 491-502.
- Vaughan, C. A., S. Singh, et al. (2012). "Gain-of-Function Activity of Mutant p53 in Lung Cancer through Up-Regulation of Receptor Protein Tyrosine Kinase Axl." Genes Cancer **3**(7-8): 491-502.
- Vedove, C. D., M. Del Giglio, et al. (2009). "Drug-induced lupus erythematosus." Arch Dermatol Res **301**(1): 99-105.
- Verma, A., S. L. Warner, et al. (2011). "Targeting Axl and Mer kinases in cancer." Mol Cancer Ther **10**(10): 1763-1773.
- Vuoriluoto, K., H. Haugen, et al. (2011). "Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer." Oncogene **30**(12): 1436-1448.
- Walker, F. J. (1981). "Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation." J Biol Chem **256**(21): 11128-11131.
- Walker, J. D., F. A. Crawford, et al. (1994). "The novel effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on myocyte contractile function and beta-adrenergic responsiveness in dilated cardiomyopathy." J Thorac Cardiovasc Surg **108**(4): 672-679.
- Wang, Y., M. M. Zeigler, et al. (2007). "The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival." Am J Respir Cell Mol Biol **36**(1): 68-77.
- Weier, H. U., J. Fung, et al. (1999). "Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **84**(1-2): 91-92.
- Wimmel, A., D. Glitz, et al. (2001). "Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion." Eur J Cancer **37**(17): 2264-2274.
- Wimmel, A., I. Rohner, et al. (1999). "Synthesis and secretion of the anticoagulant protein S and coexpression of the Tyro3 receptor in human lung carcinoma cells." Cancer **86**(1): 43-49.

- Wu, C. W., A. F. Li, et al. (2002). "Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer." Anticancer Res **22**(2B): 1071-1078.
- Wu, J., C. Ekman, et al. (2011). "Increased plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis." Arthritis Res Ther **13**(2): R62.
- Wu, Y. M., D. R. Robinson, et al. (2004). "Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells." Cancer Res **64**(20): 7311-7320.
- Ye, X., Y. Li, et al. (2010). "An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies." Oncogene **29**(38): 5254-5264.
- Yee, C. S., D. A. Isenberg, et al. (2008). "BILAG-2004 index captures systemic lupus erythematosus disease activity better than SLEDAI-2000." Ann Rheum Dis **67**(6): 873-876.
- Yegneswaran, S., G. M. Wood, et al. (1997). "Protein S alters the active site location of activated protein C above the membrane surface. A fluorescence resonance energy transfer study of topography." J Biol Chem **272**(40): 25013-25021.
- Yoshioka, N., S. Fuji, et al. (2002). "Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the TRIF52/periostin/OSF-2 gene." Exp Cell Res **279**(1): 91-99.
- Zantek, N. D., J. Walker-Daniels, et al. (2001). "MCF-10A-NeoST: a new cell system for studying cell-ECM and cell-cell interactions in breast cancer." Clin Cancer Res **7**(11): 3640-3648.
- Zavoral, M., S. Suchanek, et al. (2009). "Colorectal cancer screening in Europe." World J Gastroenterol **15**(47): 5907-5915.
- Zhang, M., M. R. Pritchard, et al. (2008). "Microarray analysis of perichondral and reserve growth plate zones identifies differential gene expressions and signal pathways." Bone **43**(3): 511-520.
- Zhong, Z., Y. Wang, et al. (2010). "Protein S protects neurons from excitotoxic injury by activating the TAM receptor Tyro3-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway through its sex hormone-binding globulin-like region." J Neurosci **30**(46): 15521-15534.
- Zhu, D., Y. Wang, et al. (2010). "Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor." Blood **115**(23): 4963-4972.
- Zhu, H., X. Sun, et al. (2014). "The expression and clinical significance of different forms of mer receptor tyrosine kinase in systemic lupus erythematosus." J Immunol Res **2014**: 431896.
- Zhu, S., H. Wurdak, et al. (2009). "A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(40): 17025-17030.
- Zizzo, G., J. Guerrieri, et al. (2013). "Circulating levels of soluble MER in lupus reflect M2c activation of monocytes/macrophages, autoantibody specificities and disease activity." Arthritis Res Ther **15**(6): R212.
- Zoller, B., P. Garcia de Frutos, et al. (1999). "Thrombophilia as a multigenic disease." Haematologica **84**(1): 59-70.
- Zwick, E., J. Bange, et al. (2001). "Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies." Endocr Relat Cancer **8**(3): 161-173.

## VIII. ANEXOS

### Otras publicaciones del doctorando

- Hurtado B, Muñoz X, **Recarte-Pelz P**, García N, Luque A, Krupinski J, Sala N, García de frutos P. "Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques". Thrombosis and Haemostasis. 2011 May 3; 105(5):873-82. Epub 2011 Mar 8