

Efecto del déficit de galectina-3 sobre la remodelación ventricular posoclusión coronaria en ratones

Effect of Galectin-3 Deficit on Ventricular Remodeling After Coronary Occlusion in Mice

LUCIANA WILENSKY, NADIA L. MARTÍNEZ NAYA, PABLO CASSAGLIA, VERÓNICA VOLBERG^{MTSAC}, JULIA TAU, EUGENIA ARUANNO, ISAAC MORGUNOWSKY MICHELL, CELINA MORALES^{MTSAC}, GERMÁN E. GONZÁLEZ

RESUMEN

Introducción: La galectina-3 (Gal-3) es una lectina que regula la respuesta inmune. Sin embargo, su rol en la remodelación y la función ventricular posinfarto de miocardio (IM) se desconoce.

Objetivo: Estudiar si el déficit de Gal-3 empeora la remodelación y la función ventricular pos-IM en ratones.

Material y métodos: Se utilizaron ratones machos Gal-3 KO y su respectivo control C57 con ligadura de la coronaria descendente anterior o *sham*. Se conformaron cuatro grupos experimentales: C57 *sham*, Gal-3 KO *sham*, C57 IM y Gal-3 KO IM. A los 7 días poscirugía se les realizó ecocardiografía seguida de eutanasia y autopsia; se cuantificó el tamaño del IM y la fibrosis en cortes teñidos con tricrómico de Masson y *picrosirius red*, respectivamente, el infiltrado de macrófagos y la expresión de IL-6.

Resultados: Los diámetros del ventrículo izquierdo se incrementaron significativamente en el grupo C57 IM respecto del *sham* y dicho incremento fue aún mayor en el grupo Gal-3 KO IM. Además, la fracción de eyección disminuyó desde $47\% \pm 2\%$ a $37\% \pm 3\%$ en C57 IM y Gal-3 KO IM, respectivamente ($p < 0,02$). El tamaño del IM aumentó desde $39,4\% \pm 5\%$ en los ratones C57 IM a $66,8\% \pm 5\%$ en los animales Gal-3 KO ($p = 0,002$). El infiltrado de macrófagos y la fibrosis en el área del IM se redujeron en los ratones Gal-3 KO IM ($p < 0,001$ C57 IM vs. Gal-3 KO IM), mientras que la concentración de IL-6 en la pared libre del ventrículo izquierdo fue similar entre grupos ($p = ns$).

Conclusiones: La delección de Gal-3 es un factor importante para la cinética del proceso reparativo regulando el infiltrado de macrófagos y el grado de fibrosis de la zona infartada, como también en la evolución temprana de la remodelación pos-IM.

Palabras clave: Infarto del miocardio - Galectina-3 - Remodelamiento ventricular

ABSTRACT

Background: Galectin-3 (Gal-3) is a lectin that regulates the immune response. However, its role in remodeling and ventricular function after myocardial infarction (MI) is unknown.

Objective: The purpose of this study was to analyze whether Gal-3 deficit impairs remodeling and ventricular function after MI in mice.

Methods: Male Gal-3 KO mice and their respective C57 controls underwent anterior descending coronary artery ligation or sham operation. Animals were then divided into four experimental groups: 1) C57 sham; 2) Gal-3 KO sham; 3) C57 MI and 4) Gal-3 KO MI. Seven days after surgery, an echocardiography was performed followed by euthanasia. Heart samples were collected to measure MI size and fibrosis using Masson's trichrome and picrosirius red, respectively, and assess macrophage infiltration and IL-6 expression.

Results: Left ventricular diameters were significantly increased in the C57 MI group compared with sham animals and the increase was even higher in the Gal-3 KO MI group. Moreover, ejection fraction decreased to $47\% \pm 2\%$ in C57 MI and $37\% \pm 3\%$ in Gal-3 KO MI mice ($p < 0,02$), and infarct size increased from $39.4\% \pm 5\%$ in C57 MI to $66.8\% \pm 5\%$ in Gal-3 KO MI animals ($p = 0,002$). Macrophage infiltration and fibrosis in the MI area were significantly reduced in Gal-3 KO MI mice ($p < 0,001$ C57 MI vs. Gal-3KO MI) without changes of IL-6 concentration in the left ventricular free wall ($p = ns$).

Conclusions: Gal-3 gene deletion is an important factor in repair kinetics, regulating macrophage infiltration and the degree of fibrosis in the infarct area, as well as early remodeling after MI.

Key words: Myocardial Infarction - Galectin-3 - Ventricular Remodeling

REV ARGENT CARDIOL 2015;83:287-292. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v83.i4.5977>

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO: Rev Argent Cardiol 2015;83:285-286. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v83.i4.6983>

Recibido: 19/02/2015 - Aceptado: 15/04/2015

Dirección para separatas: Germán E. González - Departamento de Patología - Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires - Pte. Uruburu 950, 2° Piso - CABA, Argentina - e-mail: gegonzal@fmed.uba.ar

Abreviaturas

DDVI	Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo	LT	Longitud de la tibia
DSVI	Diámetro sistólico del ventrículo izquierdo	PA	Peso del animal
FAc	Fracción de acortamiento	PC	Peso del corazón
FEy	Fracción de eyección	PP	Peso húmedo del pulmón
Gal-3	Galectina-3	PSR	<i>Picrosirius red</i>
IC	Insuficiencia cardíaca	RV	Remodelación ventricular
IL-6	Interleucina 6	TM	Tricrómico de Masson
IM	Infarto de miocardio		

INTRODUCCIÓN

El infarto de miocardio (IM) es la cardiopatía isquémica de mayor morbimortalidad a nivel mundial y la causa más frecuente de insuficiencia cardíaca (IC) (1) incluso en nuestro país. (2) El IM es un proceso dinámico, cuya evolución natural incluye la reparación de la zona infartada por una cicatriz fibrosa y la puesta en marcha de un proceso de remodelación ventricular (RV) global, que indefectiblemente modifica la función miocárdica y puede conducir a IC. (3)

Diferentes líneas de investigación y pensamiento propusieron que atenuar el proceso reparativo reduce la mortalidad y podría mejorar la evolución de la RV luego del IM. (4) Sin embargo, otros estudios mostraron que la disminución de la respuesta inmune y la fibrosis de la zona del IM conducen a una RV desfavorable, caracterizada por mayor disfunción y dilatación ventricular. (5, 6) En estudios previos de nuestro laboratorio mostramos que la reducción de la respuesta inflamatoria y fibrogénica del IM, lograda a través de la inhibición del sistema renina-angiotensina en conejos con IM experimental, modifica desfavorablemente la RV. (6) No obstante, pocos estudios evaluaron si la inmunomodulación a través de la inhibición específica de reguladores de la inmunidad innata y/o adaptativa modifica la evolución del IM y la RV. (7) Recientemente se mostró que la galectina-3 (Gal-3), una lectina de alrededor de 30 kDa que se encuentra ampliamente expresada en el sistema inmune, (8) se incrementa en pacientes con IC y en el IM experimental a los 7 días de evolución (9) Pese a esto, no hay estudios que hayan evaluado de manera específica si la deleción genética de Gal-3 modifica la cinética del proceso reparativo pos-IM y conduce a una mayor RV adversa y disfunción cardíaca luego de 7 días de inducido el IM. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de la deleción genética de Gal-3 sobre la RV global y la disfunción ventricular pos-IM, el tamaño del IM, la fibrosis y la cinética del proceso reparativo. La relevancia de estos estudios radica en que podrían desarrollarse estrategias terapéuticas para prevenir la remodelación adversa y la IC concomitante en la zona no infartada y regular la reparación en la zona del IM mediante la modulación del proceso inflamatorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratones machos Gal-3 KO y sus respectivos controles C57 (25-30 g de peso). Fueron anestesiados con ketamina y xilazina (75 mg/kg y 0,75 mg/kg intraperitoneal, respectivamente). Posteriormente se colocó un tubo endotraqueal, a través del cual los animales fueron ventilados con aire ambiente utilizando un respirador Harvard. Seguidamente se realizó una toracotomía lateral izquierda, posterior pericardiectomía y ligadura de la arteria coronaria descendente anterior o *sham* con hilo de seda 7-0 (Ethicon®). Luego se cerró el tórax y los animales se colocaron en jaulas individuales en un ambiente tranquilo y climatizado para la recuperación de la anestesia hasta finalizar el protocolo. Se conformaron cuatro grupos experimentales para estudiar los efectos del déficit de Gal-3 sobre la zona infartada y no infartada del corazón: 1) C57 *sham* (n = 5), 2) Gal-3 KO *sham* (n = 3), 3) C57 con IM (n = 13) y 4) Gal-3 KO con IM (n = 16).

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional del Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL) y conducidos acorde con los lineamientos existentes sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Estudios de función ventricular por ecocardiografía

A los 7 días los animales fueron anestesiados con Avertin (tribromoethanol, 300 mg/kg, inyectados por vía i.p.) inmediatamente antes de la eutanasia. Se les realizó ecocardiografía y Doppler (ecocardiógrafo Acuson Sequoia C 256 con un transductor de 12-MHz) y se midieron los espesores de pared y cuatro dimensiones ventriculares en sístole (DSVI) y diástole (DDVI) y se calcularon la fracción de eyección (FEy) y la fracción de acortamiento (FAc). (10)

Estudios de autopsia

Una vez finalizado el estudio ecocardiográfico se realizó la eutanasia y se determinaron el peso del corazón (PC), la longitud de la tibia (LT) y el peso húmedo del pulmón (PP). Seguidamente, un subgrupo de corazones se conservaron en formol *buffer* para su posterior análisis histológico.

Estudios histológicos

Los corazones se cortaron transversalmente de punta a base. Se embebieron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson (TM) y *picrosirius red* (PSR). En los cortes teñidos con TM se cuantificó el tamaño del infarto (%). (6) En los cortes teñidos con PSR se cuantificó la fibrosis cardíaca en la zona del infarto. (6)

Citocinas tisulares

Luego de la eutanasia, varios corazones de cada grupo se disecaron para separar la zona del IM y dicha zona rápidamente se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras de zona del infarto se procesaron para cuantificar la concentración de interleucina 6 (IL-6) por ELISA.

Citometría de flujo

El infiltrado de células F4/F80+ (macrófagos) en la zona del infarto se cuantificó por citometría de flujo. En el momento de la autopsia se extrajeron los corazones y rápidamente se disecó la zona del IM. Seguidamente se disgregó el tejido mediante tratamiento mecánico y enzimático. La zona del IM se homogeneizó en PBS suplementado con suero fetal bovino a 4 °C, se dejó sedimentar y el homogenato se filtró a través de una malla de nylon. Una alícuota de esa suspensión celular se analizó por citometría de flujo para descartar presencia de agregados. Para evitar la interferencia en los ensayos de citometría se lisaron los glóbulos rojos en frío y con solución de cloruro de amonio durante 3 horas. Seguidamente, la suspensión celular se centrifugó (15 min, 500 g, 4 °C) y se resuspendió en PBS suplementado con suero fetal bovino. Para cada ensayo se emplearon 100.000 células en 100 ml de volumen final. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con suero de ratón normal para bloquear los receptores Fc y así se disminuyeron las posibles uniones inespecíficas. Sin lavar ni descartar el suero normal, se agregaron 2,5 ml del anticuerpo monoclonal marcado con rodamina y se incubó durante 30 minutos más. Finalmente, se centrifugaron las células y se lavaron cinco veces con PBS frío. Posteriormente, se resuspendieron en paraformaldehído al 2% para preservar los marcadores de superficie y la estructura celular. Se mantuvieron a 4 °C y oscuridad hasta su lectura por citometría de flujo. La identificación de macrófagos y sus *subsets* se realizó a través de la marcación con anticuerpos anti-Ag80 y Ly-6C.

Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como media \pm error estándar de la media. Se realizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido por la prueba de Bonferroni para los cuatro grupos comparando diferencias entre C57 *sham* vs. C57 IM y C57 IM vs. Gal-3 KO IM. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Durante la primera semana, el 32,0% de los animales C57 IM y el 44,4% de los Gal-3 KO IM murieron después de la ligadura permanente de la arteria coronaria ($p = ns$). La mortalidad se debió principalmente a rotura ventricular, que se observó en la autopsia por la presencia de hemorragia torácica. Por lo tanto, aunque la mortalidad no alcanzó una diferencia estadística significativa, hubo una tendencia clara a ser mayor en ratones Gal-3 KO.

A los 7 días de evolución, el índice de hipertrofia evaluado a través del cociente peso del corazón/peso del animal (PC/PA) (mg/g) fue de $4,9 \pm 0,1$; $4,7 \pm 0,1$ y $5,4 \pm 0,2$ en los grupos C57 *sham*, Gal-3 KO *sham* y C57 IM, respectivamente ($p = ns$), mientras que este índice se incrementó a $6,2 \pm 0,3$ en el grupo Gal-3 KO IM ($p < 0,02$ C57 *sham* y C57 IM vs. Gal-3 KO IM). Del mismo modo, el grado de congestión pulmonar evaluada por el cociente PP/PA (mg/g) fue de $5,9 \pm 0,3$; $6,2 \pm 0,1$ y $6,2 \pm 0,2$ en C57 *sham*, Gal-3 KO *sham* y C57 IM, respectivamente ($p = ns$), pero se incrementó a $10,0 \pm 1,1$ en el grupo Gal-3 KO IM ($p < 0,04$ C57 *sham* y C57 IM vs. Gal-3 KO IM). Estos resultados sugieren que la eliminación genética de Gal-3 aumenta la mortalidad, la hipertrofia del miocardio y la congestión pulmonar en la fase aguda del IM.

El tamaño del IM se incrementó significativamente en animales Gal-3 KO. Fue de $39,4\% \pm 5\%$ en los ratones C57 IM y de $66,8\% \pm 5\%$ en los animales Gal-3 KO IM ($p < 0,002$ C57 MI vs. Gal-3 KO IM; Figura 1). Además, en los animales Gal-3 KO IM se redujeron en forma significativa la fibrosis en el área del IM y la infiltración de macrófagos desde, respectivamente, $29\% \pm 2\%$ en los C57 IM a $14\% \pm 2\%$ en los Gal-3 KO IM y desde $14\% \pm 0,9\%$ en los C57 IM a $5\% \pm 0,1\%$ en los Gal-3 KO IM ($p < 0,001$ C57 IM vs. Gal-3 KO IM; Figuras 2 y 3). Sorprendentemente, esta disminución de la fibrosis y del infiltrado de macrófagos en la zona del infarto fue independiente de cambios en la concentración de IL-6 (Figura 4). Esto sugiere que en el IM la Gal-3 participa en el proceso de reparación regulando la infiltración temprana de macrófagos y la fibrosis de la zona del IM.

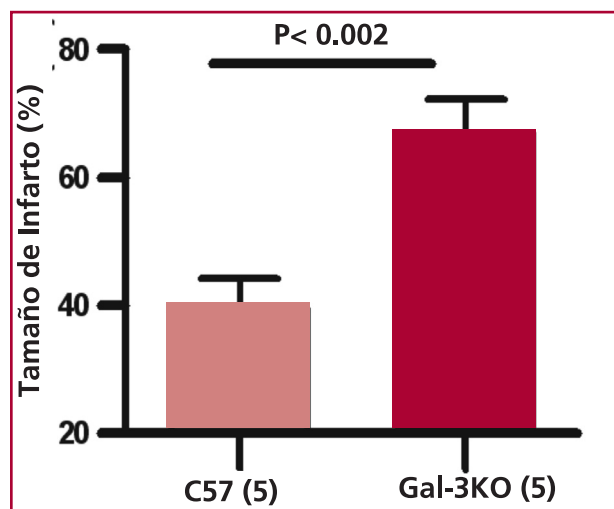


Fig. 1. Tamaño del infarto en animales C57 y Gal-3 KO. Medición realizada en cortes histológicos teñidos con tricrómico de Masson.

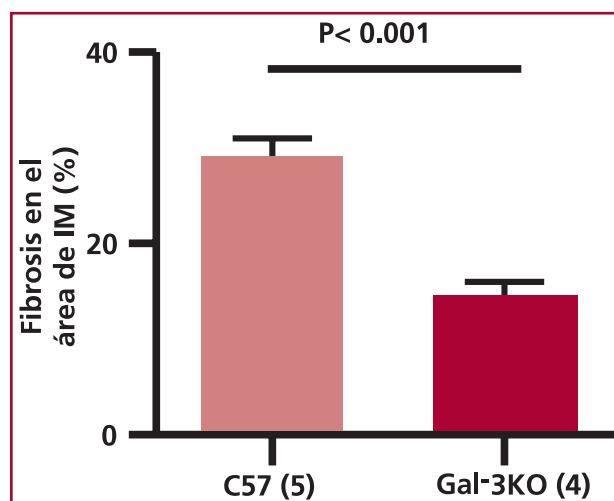


Fig. 2. Fibrosis en la zona del infarto a los 7 días de evolución en cortes teñidos con *picrosirius red*.

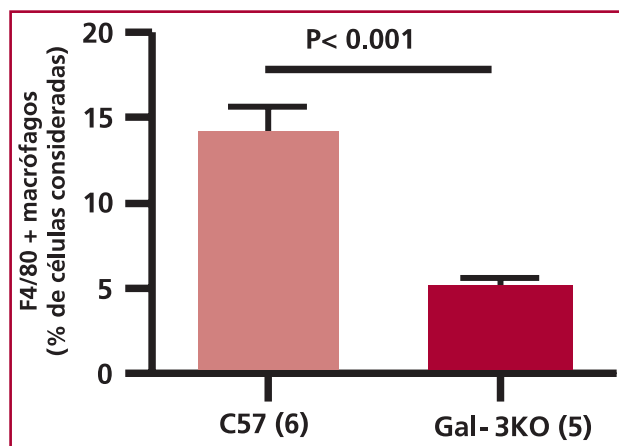


Fig. 3. Infiltrado de macrófagos en la zona del infarto a los 7 días de evolución. Medición realizada por citometría de flujo.

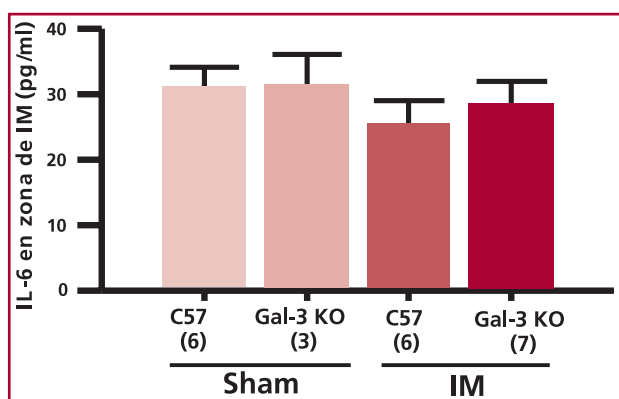


Fig. 4. Concentración de IL-6 en la zona del infarto evaluada por ELISA.

El déficit de Gal-3 también se asoció con el aumento de remodelación adversa, evidenciado por el incremento de la dilatación ventricular, evaluada ecocardiográficamente por el DDVI y el DSVI, que fueron de $4,4 \pm 0,1$ mm y $3,5 \pm 0,1$ mm en el grupo C57 IM y aumentaron a $4,8 \pm 0,2$ mm y $4,1 \pm 0,2$ mm en el grupo Gal-3 KO IM (DDVI: $p < 0,05$ C57 IM vs. Gal-3 KO IM y DSVI: $p < 0,01$ C57 IM y Gal-3 KO IM vs. C57 sham y $p < 0,02$ Gal-3 KO IM vs. C57 IM). Estos resultados se confirmaron posteriormente durante la autopsia, en donde se observó que los corazones de los animales Gal-3 KO IM estaban macroscópicamente más dilatados en comparación con los corazones C57 IM. Al mismo tiempo, el IM produjo una disminución de la FEy desde $71\% \pm 5\%$ a $47\% \pm 2\%$ y de la FAc desde $35\% \pm 4\%$ a $20\% \pm 1\%$ en los grupos C57 sham y C57 IM, respectivamente ($p < 0,001$ C57 IM vs. C57 sham; Figura 5). Esta reducción fue aún mayor en el grupo Gal-3 KO IM ($37\% \pm 3\%$ y $15\% \pm 2\%$, para FEy y FAc, respectivamente) ($p = 0,02$ Gal KO IM vs. C57 IM; Figura 5).

Estos resultados proporcionan evidencia de que la supresión genética de Gal-3 produce un efecto adverso

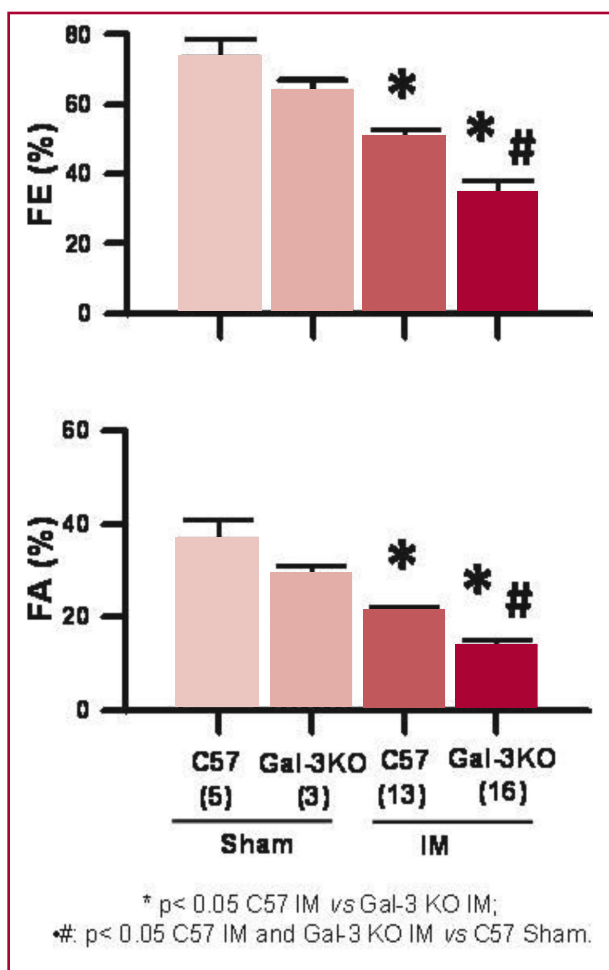


Fig. 5. Función ventricular evaluada a través de la fracción de eyección y la fracción de acortamiento obtenidas por ecocardiografía.

no solo sobre el IM y la remodelación temprana, sino también sobre la función ventricular a los 7 días pos-IM.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo mostramos por primera vez que la delección genética de Gal-3 incrementa el tamaño del IM concomitantemente con la disminución del infiltrado de macrófagos y del depósito de colágeno para generar la cicatriz fibrótica. Interesantemente, la atenuación del proceso inflamatorio y reparativo observado en animales Gal-3 KO ocurrió en forma independiente de cambios en la concentración de IL-6, una citocina proinflamatoria y profibrótica, en la zona del IM. A su vez, esto se acompañó de una exacerbación de la RV adversa y mayor disfunción ventricular, lo que predispone al desarrollo de IC.

Estos resultados refuerzan el concepto de que la magnitud de la respuesta inflamatoria activada durante la reparación de la zona del IM puede ser determinante en la evolución de los cambios estructurales globales. (11, 12) Las citocinas, los leucocitos y los fibroblastos son los efectores de este proceso reparativo

que permite el reemplazo del miocardio necrótico por una cicatriz. (13, 14)

En nuestro trabajo utilizamos un modelo experimental de IM en ratones. En este sentido, ratones C57 y Gal-3 KO fueron sometidos a la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior durante 7 días. Estudios recientes mostraron en ratas con IM que a ese tiempo de evolución alcanzan niveles pico de Gal-3 plasmática. (15) Estos hallazgos podrían implicar que la Gal-3 participa en la etapa inicial del proceso reparativo del IM, regulando su cinética por medio de la magnitud del infiltrado de macrófagos, el grado de fibrosis en la zona infartada y la RV.

Diferentes líneas de investigación mostraron que drogas que son de uso corriente para el tratamiento de la IC reducen la mortalidad y mejoran la evolución de la remodelación luego del IM. Estos efectos se atribuyeron primariamente a la disminución de la carga hemodinámica del ventrículo y después a la disminución de la hipertrofia y la fibrosis. (3) Sin embargo, en trabajos previos mostramos que el bloqueo del receptor AT1 de la angiotensina II desde el comienzo del IM reduce el infiltrado de macrófagos, linfocitos y colágeno en la zona del IM, retrasando la cicatrización de la zona del IM. (6) Por otro lado, otros estudios que evaluaron el rol de la Gal-3 en la respuesta a la lesión miocárdica mostraron que la infusión de angiotensina II *in vivo* incrementaba la expresión cardíaca de Gal-3, sugiriendo que el efecto proinflamatorio de la primera podría ser parcialmente mediado por las lectinas. Conjuntamente, se mostró que la Gal-3 miocárdica incrementa el infiltrado de macrófagos activos, la actividad fagocítica y la síntesis de colágeno. (8) Otra investigación evidenció que la infusión de Gal-3 en el saco pericárdico tiene un efecto proinflamatorio, con producción de miocarditis, fibrosis y disfunción ventricular. (7) En contraste, el déficit de Gal-3 redujo la inflamación en la aterosclerosis. (16) Se sugirió además que los niveles séricos de Gal-3 predicen la mortalidad en pacientes con IC con FEy preservada y que sería un marcador pronóstico de IC incluso por encima del péptido natriurético cerebral. (9)

Aquí mostramos por primera vez que el déficit de Gal-3 incrementa el tamaño del IM y reduce el infiltrado de macrófagos y la fibrosis en la zona de lesión a los 7 días de evolución. Estos resultados difieren de lo observado previamente por Li y colaboradores, (17) quienes mostraron que la delección de Akt2, una serinatreoninaquinasa que fisiológicamente estimula (18) el infiltrado de macrófagos y la expresión de Gal-3 en la zona de lesión miocárdica, estuvo asociada indirectamente con un tamaño mayor del IM, hecho que sugiere que la Gal-3 podría favorecer el infiltrado inflamatorio aumentando el tamaño del IM. Esta discrepancia entre el trabajo de Li y colaboradores y el nuestro podría deberse a que ellos utilizaron un modelo experimental de isquemia y reperfusión, mientras que en nuestros animales realizamos la ligadura permanente de la arteria coronaria.

También mostramos que el déficit de Gal-3 en animales con IM incrementó la dilatación ventricular

y redujo la función sistólica. Estos efectos podrían explicarse, al menos en parte, por el incremento del tamaño del IM y la reducción del infiltrado de macrófagos y de la fibrosis de la zona del IM. En este estudio no pudimos discriminar en qué medida cada uno de estos factores contribuyen a empeorar la remodelación adversa y la disfunción. Sin embargo, y como ya se mencionó, dado que cada uno constituye un factor determinante en la evolución de la RV, la suma de ellos podría explicar el mecanismo por el cual el déficit de Gal-3 produjo un efecto desfavorable sobre la RV y la función ventricular. La concentración de IL-6 en la zona del infarto fue similar entre grupos, lo cual sugiere que al menos a la semana posinfarto los efectos de la Gal-3 sobre el infiltrado de macrófagos y la fibrosis reparativa son independientes de la IL-6. Estos resultados no son sorprendentes, ya que Kobara y colaboradores encontraron recientemente que a los 7 días pos-IM los niveles de IL-6 de la zona del infarto son similares a los valores preisquémicos y a los de la zona remota. (19)

CONCLUSIONES

En resumen, nuestros datos muestran por primera vez que la delección genética de Gal-3 tiene efectos desfavorables sobre la evolución del proceso reparativo pos-IM, pudiendo acelerar el desarrollo de IC. Por ello, nuestros resultados sugieren que la Gal-3 es un factor esencial para el inicio y el desarrollo de dicho proceso, la RV y la función ventricular, tanto en el área del IM como en las zonas no infartadas. A su vez, enfatizan los hallazgos previos de nuestro grupo referidos anteriormente. (6) Investigaciones nuevas sobre los mecanismos intrínsecos regulados por la Gal-3 durante el proceso reparativo del IM y cómo estos podrían contribuir a la remodelación global nos permitirían comprender en detalle su rol en la fisiopatología del IM y la progresión a IC.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web/ Material suplementario).

BIBLIOGRAFÍA

1. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030160>
2. Estadísticas Vitales. Información Básica-Año 2010. Publicación del Ministerio de Salud de la Nación. 2011;5.
3. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367:356-67. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68455-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68455-5)
4. Pfeffer MA, McMurray JJV, Velázquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, et al. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 2003;349:1893-906. <http://doi.org/10.1056/NEJM0309153491893906>
5. Ben Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N, Harel-Adar T, Feinberg MS, Abd Elrahman I, et al. Macrophage subpopulations

- are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1890-901. <http://doi.org/f2qq33>
6. González GE, Seropian IM, Krieger ML, Palleiro J, López Verrilli MA, Gironacci MM, et al. Effect of early versus late AT(1) receptor blockade with losartan on postmyocardial infarction ventricular remodeling in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H375-86. <http://doi.org/b5s4kn>
7. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao T-D, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H404-12. <http://doi.org/dtk5jx>
8. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004;110:3121-8. <http://doi.org/b5bbqs>
9. de Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, van der Meer P, Voors AA, Hillege HL, et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* 2011;43:60-8. <http://doi.org/c9q7rc>
10. Gao S, Ho D, Vatner DE. Echocardiography in mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2011;1:71-83. <http://doi.org/dzjseg>
11. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 2010;121:2437-45. <http://doi.org/bpnhb7>
12. Leuschner F, Panizzi P, Chico-Calero I, Lee WW, Ueno T, Cortez-Retamozo V, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circ Res* 2010;107:1364-73. <http://doi.org/bbv7d2>
13. Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJ, Harmsen MC. Increased inflammatory response and neo-vascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2006;15:83-90. <http://doi.org/cc667k>
14. Morales C, Gonzalez GE, Rodriguez M, Bertolasi CA, Gelpi RJ. Histopathologic time course of myocardial infarct in rabbit hearts. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:339-45. <http://doi.org/bz2rz6>
15. Sanchez-Mas J, Lax A, Asensio-Lopez MC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Garrido IP, et al. Galectin-3 expression in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2014;172:e98-e101. <http://doi.org/4w8>
16. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol* 2008;172:247-55. <http://doi.org/cb6496>
17. Li X, Mikhalkova D, Gao E, Zhang J, Myers V, Zincarelli C, et al. Myocardial injury after ischemia-reperfusion in mice deficient in Akt2 is associated with increased cardiac macrophage density. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H1932-40. <http://doi.org/cr842w>
18. Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martinez de la Torre Y, Vaporidi K, Lagoudaki ED, et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:9517-22. <http://doi.org/4w9>
19. Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 2010;87:424-30. <http://doi.org/femh4h>