







**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

sST2, producción y papel en las enfermedades  
cardiacas.

Director

Prof. Domingo Andrés Pascual Figal

Doctoranda

D<sup>a</sup> María Teresa Pérez Martínez

Murcia 2022



A mi familia



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor y director de tesis, el Profesor Domingo Pascual Figal, por haberme enseñado tanta ciencia y cardiología durante todos estos años. Además, quería agradecerle que haya confiado en mí y su perseverancia para que siguiera con este proyecto. Ha hecho de mí una farmacéutica- “cardióloga”, (fuera de bromas). Trabajando con él, he podido aprender muchísimo, conocer a gente muy enriquecedora y crecer profesionalmente.

A Javier, millones de gracias por creer en mí, por animarme tanto y por quererme tan bien. Gracias por tu ayuda, tu confianza y tu paciencia infinita. Gracias por entenderme y sacarme siempre una sonrisa. Gracias por ayudarme cada día para que pudiera sacar este trabajo adelante. Eres un apoyo para mí, y un ejemplo de trabajo y constancia. Transmites entusiasmo en lo que haces, y me encanta que me cuentes tus proyectos, inquietudes y tus logros. Y lo más importante, gracias por haberme dado este bebe que me vuelve loca cada día, con su risa, sus gestos y sus caras, sus progresos, y su evolución. Alberto es nuestra alegría y nuestra gran revolución.

A Alberto, gracias por haber aparecido en nuestras vidas. Eres mi alegría de vivir.

A Javier Jr y Blanca, gracias por estar a mi lado, por hacerme reír, por contarme vuestras cosas del día a día, y por ayudarme tanto con vuestro hermano. Gracias por vuestro cariño.

A mis padres, gracias por todo, gracias por la educación que he recibido, gracias por haber hecho de mi una mujer responsable, constante y trabajadora. Gracias por haber venido desde Elche todos los días que he necesitado durante los últimos meses para poder avanzar y terminar este proyecto. Gracias por vuestra generosidad. Gracias por cuidar de vuestro nieto tan bien. Gracias por teneros a mi lado.

A Laura y Daniel, gracias por estar ahí y ser tan buenos hermanos conmigo. Os habéis convertido en grandes profesionales y estoy orgullosa de vosotros.

A mi equipo de trabajo, gracias a todos vosotros, los de siempre, los nuevos y los que habéis emprendido nuevos caminos. Gracias por vuestro compañerismo. Quiero agradecer a Álvaro, su ayuda con la estadística en este trabajo. A Carmen y Andrés,

gracias por vuestra buena disposición para ayudarme, siempre estáis ahí. A Iris y Fran, gracias por todos estos años que nos conocemos, por haber confiado en mi trabajo siempre, sois grandes cardiólogos. Y a Antonio y Mari Carmen, que son las verdaderas almas del laboratorio, gracias por vuestra dedicación absoluta a la investigación.



El trabajo desarrollado por María Teresa Pérez Martínez y que presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Pascual-Figal DA, Lax A, Perez-Martinez MT, del Carmen Asensio-Lopez M, Sanchez-Mas J; GREAT Network. Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. Clin Chem Lab Med. 2016 Jan;54(1):29-35. doi: 10.1515/cclm-2015-0074. Factor de impacto: 3,595
- Pérez-Martínez MT, Lacunza-Ruiz J, García de Lara J, Noguera-Velasco JA, Lax A, Hernández-Vicente Á, Asensio-López MC, Januzzi JL Jr, Ibañez B, Pascual-Figal DA. Noncardiac Production of Soluble ST2 in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol. 2018 Sep 18;72(12):1429-1430. doi: 10.1016/j.jacc.2018.06.062. Factor de impacto: 24,094
- Pascual-Figal DA, Pérez-Martínez MT, Asensio-Lopez MC, Sanchez-Más J, García-García ME, Martínez CM, Lencina M, Jara R, Januzzi JL, Lax A. Pulmonary Production of Soluble ST2 in Heart Failure. Circ Heart Fail. 2018 Dec;11(12):e005488. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005488. Factor de impacto: 6,033



# 1. ABREVIATURAS

ACO: anticoagulantes orales

AD: aurícula derecha

AEII: células del epitelio alveolar tipo II

AI: aurícula izquierda

AP: arteria pulmonar

AUC: área bajo la curva

CD: coronaria derecha

CV: cardiovascular

Cx: circunfleja

DA: descendente anterior

DE: desviación estándar

DVI: diámetro ventrículo izquierdo

EAC: enfermedad arterial coronaria

EE: error estándar

FA: fibrilación auricular

FACS: clasificación de células activadas por fluorescencia

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

GC: gasto cardiaco

GTP: gradiente transpulmonar

hsTnT: Troponina T ultrasensible

IAM: Infarto agudo de miocardio

IAMCEST: Infarto agudo con elevación del segmento ST

ICa: índice cardiaco

IC: insuficiencia cardiaca

IDI: índice de mejoría de la discriminación (integrated discrimination improvement)

IL-33: interleuquina-33

IM: Infarto de miocardio

Masa VI: masa ventrículo izquierdo

MR-proADM: la región media de la proadrenomedulina

MSC: muerte súbita cardiaca

NRI: índice de mejoría de la reclasificación (net reclassification improvement)

NT-proBNP: N-terminal del péptido natriurético cerebral

PCP: presión capilar pulmonar

PCR: proteína C reactiva

PPVI: pared posterior ventrículo izquierdo

RA: raíz aórtica

RVP: resistencia vascular pulmonar

SCA: síndrome coronario agudo

SC: seno coronario

SCASEST: síndrome coronario agudo sin elevación del ST

SCACEST: síndrome coronario agudo con elevación del ST

SIV: septo interventricular

ST2: supresor de tumorigenicidad tipo 2

TAPSE: desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo (tricuspid annulus plane systolic excursión)

Tn: Troponina

VI: ventrículo izquierdo

VTD: volumen telediastólico

VTS: volumen telesistólico



## 2. ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b>	
<b>2. ÍNDICE</b>	
<b>3. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>4. ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>5. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
5.1 Efecto cardioprotector IL-33/ST2L inhibido por ST2s.....	1
5.2 sST2 como respuesta inadecuada.....	3
5.3 Valor pronóstico de sST2 .....	4
5.4 Consideraciones analíticas.....	15
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>8. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>9. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32
9.1 Estudio de la fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM .....	32
9.1.1 Estudio clínico.....	32
9.2 Estudio de la fuente de producción de sST2 en pacientes con IC crónica avanzada. ....	38
9.2.1 Estudio clínico.....	38
9.3 Estudio del papel de los pulmones como una fuente de producción de sST2 en la insuficiencia cardiaca. ....	43
9.3.1 Estudio experimental.....	43
9.3.2 Fracción proteica y western blot.....	44
9.3.3 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).....	45
9.3.4 Inmunohistoquímica.....	46
9.3.5 Aislamiento y purificación de células del epitelio alveolar tipo II de pulmones humanos.....	46
9.3.6 Citometría de flujo y clasificación de células pulmonares. ....	48
9.3.7 Tinción por inmunofluorescencia.....	48
9.3.8 Modelo de simulación de stress bioquímico.....	49
9.3.9 Estudio clínico.....	49

9.3.10	Análisis estadístico.....	50
<b>10.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
10.1	Fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM. ....	55
10.2	Fuente de producción de sST2 en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica avanzada. ....	60
10.3	Producción pulmonar de sST2 en la insuficiencia cardiaca:.....	65
10.3.1	Expresión de sST2 extracardiaca en un modelo de IC isquémica. ....	65
10.3.2	Expresión inmunohistoquímica de sST2 en tejido pulmonar.....	69
10.3.3	Neumocitos humanos de tipo II expresan sST2 bajo estrés.....	73
10.3.4	sST2 en aspirado bronquial. ....	76
<b>11.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>82</b>
11.1	Fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM. ....	82
11.2	Fuente de producción del sST2 en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica avanzada. ....	84
11.3	Los pulmones son una fuente significativa de sST2 en el contexto de la IC..	85
<b>12.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>93</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>97</b>
<b>14.</b>	<b>RESUMEN/ ABSTRACT</b> .....	<b>108</b>

### 3. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema IL-33 / ST2 en la respuesta cardíaca al estrés biomecánico.

Figura 2. Diagrama de flujo de la muestra de pacientes del estudio.

Figura 3. Zonas de extracción de sangre en pacientes con IAM.

Figura 4. Concentraciones de biomarcadores según lugar de extracción.

Figura 5. Correlación entre los niveles de sST2 y la FEVI en seno coronario (CS) y vena periférica (PV).

Figura 6. Concentración de sST2 (ng/ml) en cada lugar de extracción en pacientes con ICC avanzada.

Figura 7. Análisis cuantitativo de RT-PCR del nivel de ARNm de sST2, ST2L e IL (interleucina) -33 en pulmón (A), corazón (B), riñón (C) e hígado (D).

Figura 8. Expresión extracardiaca de sST2 después de IM.

Figura 9. Análisis histopatológico (A) y expresión de sST2 (B) de tejidos pulmonares de ratas control (grupo simulado) y con infarto de miocardio (MI).

Figura 10. Espesor del epitelio alveolar tras infarto de miocardio.

Figura 11. Análisis inmunohistoquímico de sST2 de los tejidos pulmonares del grupo control (grupo simulado) (A – C), 1 (D – F) y 24 semanas (G – I) después de un infarto de miocardio en ratas.

Figura 12. Regulación de sST2 en células del epitelio alveolar.

Figura 13. Pureza de neumocitos humanos primarios de tipo II.

Figura 14. Expresión y excreción de sST2 en neumocitos de tipo II humanos bajo estrés.

Figura 15. Concentraciones de sST2 en aspirado bronquial (A) y suero (B) de pacientes con edema agudo de pulmón cardiogénico, bronconeumonía y trastornos cerebrales.

Figura 16. Señalización de ST2 (Receptor 1 de tipo interleucina 1).



## 4. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor pronóstico de sST2 en enfermedades cardíacas agudas y crónicas.

Tabla 2. Resumen de estudios clínicos.

Tabla 3. Características de la población de estudio (pacientes IAM).

Tabla 4. Concentraciones de biomarcadores en cada lugar de extracción.

Tabla 5. Características de la población de estudio (pacientes con IC).

Tabla 6. Concentración de biomarcadores en cada sitio de extracción (pacientes IC).

Tabla 7. Parámetros descriptivos en el estudio anatómico y ecocardiográfico.

Tabla 8. Correlaciones de las variables del paciente con las concentraciones de sST2 en aspirado bronquial y suero.



# **INTRODUCCIÓN**



## 5. INTRODUCCIÓN

El ST2 es un miembro de la familia de receptores de interleucina-1, conocido como receptor de interleucina 1 IL1RL-1. Existen dos isoformas principales: un receptor transmembrana (ST2L) y un receptor soluble truncado que se detecta circulando en suero (sST2) (1). Actualmente, los estudios experimentales consideran el ST2 como un biomarcador clínico con un papel fisiopatológico en las enfermedades cardiovasculares. Además, estudios realizados en diferentes poblaciones han encontrado un valor pronóstico relevante para el sST2.

### 5.1 Efecto cardioprotector IL-33/ST2L inhibido por ST2s.

En 2005, Schmitz et al. identificó la interleucina-33 (IL-33) como el ligando de ST2 (2). La IL-33 es una citoquina similar a la IL-1 que puede ser secretada por la mayoría de las células en respuesta al daño (3). La investigación experimental llevada a cabo en células cardíacas sometidas a tensión biomecánica, así como en modelos animales de infarto de miocardio (IM) y sobrecarga de presión, han demostrado que el sistema IL-33 / ST2L está regulado al alza en respuesta al estrés miocárdico (3–5). Esta regulación al alza parece ser una respuesta defensiva, ya que se ha demostrado que la interacción entre IL-33 y ST2L es cardioprotectora (Figura 1). De hecho, la IL-33 redujo la hipertrofia miocárdica, la fibrosis, la expresión de péptidos natriuréticos, la disfunción ventricular y la mortalidad prematura en ratones sometidos a una sobrecarga de presión ventricular mediante la técnica de constricción aórtica “aortic banding”(4). En un modelo animal de ratas con daño cardíaco por IM, el tratamiento con IL-33 redujo el tamaño del infarto, la fibrosis y la apoptosis, y mejoró la dilatación ventricular, la función contráctil y la supervivencia (6). Estos efectos beneficiosos de IL-33 están mediados específicamente a través del receptor ST2L, ya que el bloqueo del receptor ST2L eliminó los efectos cardioprotectores de IL-33 (4–6).

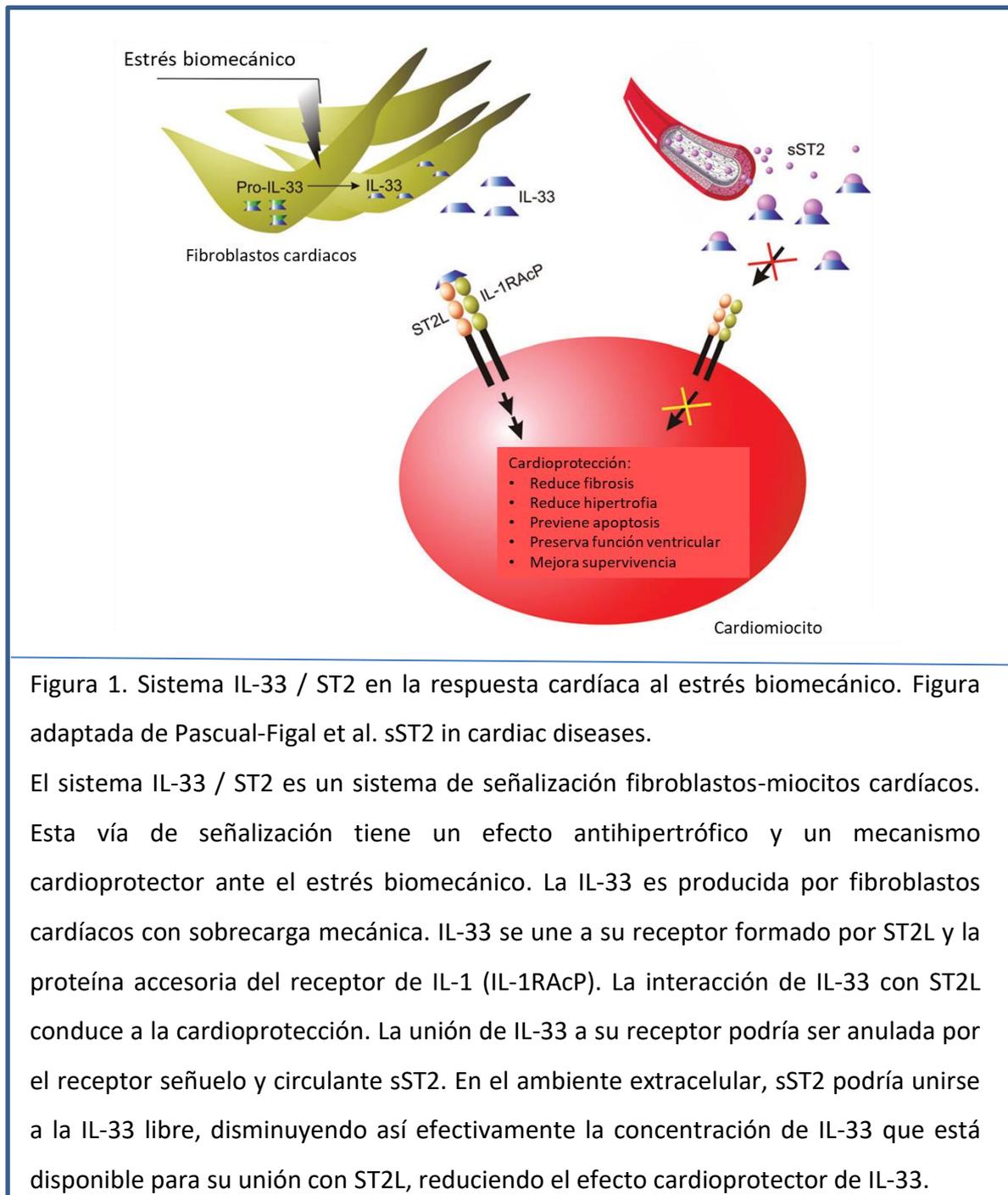


Figura 1. Sistema IL-33 / ST2 en la respuesta cardíaca al estrés biomecánico. Figura adaptada de Pascual-Figal et al. sST2 in cardiac diseases.

El sistema IL-33 / ST2 es un sistema de señalización fibroblastos-miocitos cardíacos. Esta vía de señalización tiene un efecto antihipertrófico y un mecanismo cardioprotector ante el estrés biomecánico. La IL-33 es producida por fibroblastos cardíacos con sobrecarga mecánica. IL-33 se une a su receptor formado por ST2L y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP). La interacción de IL-33 con ST2L conduce a la cardioprotección. La unión de IL-33 a su receptor podría ser anulada por el receptor señuelo y circulante sST2. En el ambiente extracelular, sST2 podría unirse a la IL-33 libre, disminuyendo así efectivamente la concentración de IL-33 que está disponible para su unión con ST2L, reduciendo el efecto cardioprotector de IL-33.

La isoforma circulante sST2 es capaz de unirse con alta afinidad a IL-33, interrumpiendo la interacción entre IL-33 / ST2L, con la consiguiente anulación de su efecto cardioprotector (Figura 1). De hecho, el tratamiento con sST2 revirtió de manera dosis-dependiente el efecto antihipertrófico de IL-33 en cardiomiocitos estimulados con angiotensina II o fenilefrina (4). En presencia de hipoxia, la IL-33 redujo la apoptosis de los cardiomiocitos, pero la adición de sST2 disminuyó este efecto beneficioso (6). Estos

datos sugieren que el sST2 actúa como receptor señuelo que puede secuestrar IL-33, y por tanto, modular la señalización cardíaca de IL-33 / ST2L. Sin embargo, la fuente de sST2 no está bien establecida y, aunque es producida por fibroblastos cardíacos y cardiomiocitos en respuesta a una lesión o estrés, también se ha sugerido una producción no miocárdica a partir de células endoteliales (7,8).

## 5.2 sST2 como respuesta inadecuada

Concentraciones de sST2 circulante elevadas en humanos se asocian con procesos fisiopatológicos relevantes en enfermedades cardíacas. En estudios experimentales y en humanos se ha descrito un vínculo entre el sST2 y fenómenos como el estiramiento miocárdico, la fibrosis, el remodelado adverso, la inflamación, la hemodinámica alterada y las enfermedades vasculares. En pacientes que sufrieron un infarto agudo de miocardio (IAM), las concentraciones circulantes de sST2 se elevaron tempranamente y se correlacionaron con un remodelado cardíaco adverso medido con resonancia magnética (9). En este estudio, Weir et al. mostraron una correlación inversa de sST2 con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y una correlación positiva con el índice de volumen del infarto ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) al inicio del estudio y 24 semanas después del IAM.

La relación entre sST2 y remodelado adverso después de un IAM también está respaldada por los resultados de nuestro grupo en un modelo experimental de IAM, donde la expresión miocárdica de sST2 se incrementó rápidamente durante las primeras 4 semanas y se correlacionó con los procesos en curso de fibrosis e inflamación (5).

Como un paso más en la progresión del remodelado adverso a insuficiencia cardíaca (IC), entre los pacientes con un síndrome coronario agudo (SCA) (ensayo MERLIN-TIMI36), aquellos con concentraciones más altas de sST2 circulante tienen una mayor tasa de desarrollo de IC en el seguimiento temprano y a largo plazo (10).

Por tanto, niveles más altos de sST2 se asocian con un fenotipo de remodelado adverso propenso al desarrollo de IC. Apoyando lo anterior, sST2 también identificó un fenotipo más adverso en pacientes hipertensos, con más hipertrofia del VI e IC (11). El aumento de la concentración plasmática de sST2 también se correlacionó significativamente con

la alteración de los parámetros de estructura y función cardíaca, y de los parámetros hemodinámicos en pacientes con disnea con IC aguda (12). En estos pacientes, el sST2 se correlacionó con varios parámetros ecocardiográficos: ventrículos con una estructura más dilatada con menor función sistólica y hemodinámica alterada, con presiones intracardíacas, pulmonares y venosas más altas. Zielinski y col. también apoyan la correlación entre sST2 y alteraciones hemodinámicas en pacientes con IC que se sometieron a terapia guiada por catéter en arteria pulmonar; en estos pacientes, los niveles más altos de sST2 identificaron una peor respuesta hemodinámica a la terapia temprana (13).

Además de correlacionarse con los marcadores de estiramiento cardíaco, sST2 también se correlaciona con la inflamación. En pacientes con IC aguda, Rehman et al. mostraron asociaciones entre la sST2 y las medidas de inflamación, como la temperatura, el recuento de leucocitos y la proteína C reactiva (PCR) (14). Además, se encontró un nivel más alto de sST2 en pacientes con disnea atribuible a IC más enfermedad inflamatoria pulmonar concomitante en comparación con IC sola o con enfermedad inflamatoria pulmonar sola (15). La asociación entre la inflamación y el sST2 es una característica casi constante en los estudios de correlación, y en general, la inflamación parece ser una piedra angular de la respuesta del sST2. De hecho, el sST2 se identificó originalmente involucrado en enfermedades autoinmunes e inflamatorias mediante la regulación de las respuestas de las células T colaboradoras tipo 2 (3). Por lo tanto, el aumento de sST2 detectado en enfermedades cardíacas agudas representa una respuesta de mala adaptación que anula los efectos beneficiosos del sistema IL-33 / ST2L y da como resultado un fenotipo de enfermedad más adverso, asociado con una progresión alterada de la enfermedad: estiramiento miocárdico, fibrosis, efectos de remodelado adverso, inflamación y peor hemodinámica.

### **5.3 Valor pronóstico de sST2**

Si bien los péptidos natriuréticos se han centrado mucho en la última década en el diagnóstico y la estratificación del riesgo de pacientes con IC, existe un interés creciente en el papel de otros biomarcadores circulantes, como sST2. Las concentraciones de sST2 tienen un valor pronóstico relevante en varias enfermedades

cardiovasculares agudas y crónicas, según numerosos estudios clínicos publicados en los últimos años. Los principales hallazgos se presentan en los siguientes párrafos y se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Valor pronóstico de sST2 en enfermedades cardíacas agudas y crónicas.<sup>33</sup>

<b>Enfermedad cardíaca</b>	<b>Escenario</b>	<b>Valor pronóstico</b>	<b>Comentarios</b>
IC aguda (16–24) IMPROVE-HF	Admisión, servicio de urgencias.	Muerte, muerte CV, re-hospitalización por IC, respuesta al tratamiento	Corto y largo plazo Las medidas repetidas (4 a 5 días o al alta) podrían reclasificar el riesgo de eventos adversos.
Disnea aguda (16)	Admisión, servicio de urgencias.	Muerte, muerte CV, re-hospitalizaciones	Corto y largo plazo Disnea relacionada con IC y no relacionada con IC.
SCACEST (25–27) SCASEST (10)	Primeras 24h.	Muerte, muerte CV, IC	30 días y largo plazo Mayor riesgo de desarrollo de IC.
IC crónica (9,28–36)	Monitorización ambulatoria.	Muerte, muerte CV, MSC, re-hospitalización por IC, respuesta al tratamiento.	A largo plazo Medidas repetidas ( $\geq 3$ meses) podrían reclasificar el riesgo de eventos cardiovasculares adversos y remodelado.
EAC estable (37,38)	Ambulatorio	Muerte, muerte CV	A largo plazo
La concentración de sST2 de 35 ng/mL es el umbral recomendado para identificar un peor pronóstico, utilizando el ensayo Presage ST2. EAC, enfermedad arterial coronaria; CV, cardiovascular; IC, insuficiencia cardíaca; SCACEST: síndrome coronario agudo con elevación del ST; SCASEST: síndrome coronario agudo sin elevación del ST; MSC, muerte súbita cardíaca.			

Tabla 2: Resumen de estudios clínicos.

<b>Estudio</b>	<b>Diseño y población</b>	<b>Resultados principales</b>	<b>Hallazgos adicionales</b>
Januzzi et al. (16)	599 pacientes Disnea aguda, estudio PRIDE	Los sujetos por encima de la mediana de ST2 tenían 11 veces más	El incremento en el AUC de la adición de ST2 o NT-proBNP

	Urgencias Seguimiento: 1 año	probabilidades de muerte (IC del 95%: 5,5-21,4). AUC de 0,80 (IC del 95%: 0,75-0,84) para la mortalidad a 1 año.	entre sí fue significativo (ambos $p = 0,001$ ).
Lassus et al. (17)	5306 pacientes IC aguda, estudio MOCA Urgencias Seguimiento: 30 días y 1 año.	sST2 agregó un NRI (índice de mejoría de la reclasificación “net reclassification improvement”) del 25,5% para predecir la muerte a los 30 días y del 10,3% a 1 año, sobre un modelo de predicción clínica.	sST2 estaba en la parte superior de una gran lista de biomarcadores: NT-proBNP, BNP, PCR, MR-proANP, MR-proADM, TnI, TnT.
Pascual-Figal et al. (19)	136 pacientes IC aguda descompensada Urgencias Seguimiento: mediana 739 días.	Las concentraciones de sST2 predijeron de forma independiente la mortalidad (mediana de 739 días): por 10 ng/ml, HR 1,09, IC del 95%: 1,03-1,15. sST2, hsTnT y NTproBNP proporcionaron información complementaria.	Para cada marcador elevado, el análisis ajustado mostró casi el triple de riesgo de muerte (HR 2,64; IC del 95%: 1,63 - 4,28). Mejora del índice C, NRI e IDI.
Espriella et al. (22)	160 pacientes ICA e insuficiencia renal (TFGe < 60 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ) IMPROVE-HF	Niveles sST2 más elevados fueron significativos y no relacionados linealmente con una deficiencia	Se encontraron valores más altos de sST2 en hombres, y en aquellos pacientes con

	Hospitalización Seguimiento: 30 días	diurética más baja tanto a las 24 como a las 72 horas ( $p = 0,002$ y $p = 0,019$ , respectivamente).	descompensación más severa (menor FEVI y TAS y valores más altos de NT-proBNP y CA125).
Tang et al. (23)	858 pacientes IC aguda ASCEND-HF Seguimiento: 180 días	Niveles más altos de sST2 se asociaron con un mayor riesgo de muerte a los 180 días ([HR] basal: 2,21; HR de seguimiento: 2,64; ambos $p < 0,001$ ).	Los sujetos con niveles persistentemente altos ( $>60$ ng/ml) de sST2 en el seguimiento tuvieron tasas de mortalidad más altas a los 180 días que aquellos con niveles más bajos de sST2 en el seguimiento (HR ajustado: 2,91, $p = 0,004$ ).
Morrow D et al. (24)	694 pacientes IC aguda PIONEER-HF Hospitalización (pacientes estables) Seguimiento: 8 semanas	sST2 inicial se asoció con un 89 % más de riesgo de muerte u hospitalización por IC por cada aumento logarítmico en el biomarcador.	Concentraciones basales más altas de hsTnT, sST2 y NT-proBNP tenían un riesgo absoluto más alto de muerte CV o rehospitalización por IC. Concentraciones elevadas durante el seguimiento (8 semanas) también se

			asociaron con muerte CV posterior o rehospitalización por IC. sST2 HR 2.13(1.31, 3.45) p=0.002.
Aimo et al. (41)	4835 pacientes IC aguda Seguimiento: mediana 13.5 meses	HR log <sub>2</sub> (sST2): <ul style="list-style-type: none"> <li>• sST2 al ingreso y muerte por todas las causas, 2,46 (IC 95%: 1,80 a 3,37; p &lt; 0,001);</li> <li>• sST2 al alta y muerte por todas las causas, 2,06 (IC 95%: 1,37 a 3,11; p &lt; 0,001);</li> <li>• sST2 al ingreso y muerte CV, 2,29 (IC 95%: 1,41 a 3,73; p &lt; 0,001);</li> <li>• sST2 al alta y muerte CV, 2,20 (IC 95%: 1,48 a 3,25; p &lt; 0,001).</li> </ul>	sST2 al alta, pero no sST2 al ingreso, es predictivo de rehospitalización por IC durante el seguimiento.
Ky et al. (28)	1141 pacientes IC crónica, ambulatoria Seguimiento: mediana 2,8 años	Los pacientes en el tercil de ST2 más alto (ST2 > 36,3 ng/ml) tenían un riesgo notablemente mayor de eventos	Adición de ST2 y NT-proBNP al modelo Seattle de IC, reclasificó

		adversos en comparación con el tercil más bajo (ST2 $\leq$ 22,3 ng/ml). El AUC para ST2 fue de 0,75 (IC del 95%: 0,69 - 0,79)	apropiadamente el 14,9% de los pacientes
Bayes-Genis et al. (29)	876 pacientes IC crónica, ambulatoria Seguimiento: mediana 4,2 años	La incorporación de ST2 en un modelo totalmente ajustado (incluido NT-proBNP) para la mortalidad por todas las causas mejoró el estadístico C (0,77) y el NRI (9,4%, IC del 95%: 4,8 - 14,1).	En la comparación directa de modelos, ST2 fue superior a Gal-3.
Pascual-Figal et al. (33)	Estudio de casos y controles: 36 casos de MSC y 63 pacientes controles, con IC crónica y FEVI <45%.	Las concentraciones elevadas de sST2 fueron predictivas de MSC (0,1 ng/ml, OR 1,39, IC del 95%: 1,09 - 1,78).	sST2 y NT-proBNP proporcionan información complementaria para predecir MSC.
Gaggin et al. (31)	151 pacientes IC crónica, estudio PROTECT Seguimiento: 1 año	sST2 agregó información de forma independiente para predecir los eventos cardiovasculares totales ( $p < 0,001$ ). La medición en serie de sST2 cada 3 meses ( $>$ o $\leq$ 35 ng / ml) mejoró la predicción.	El tiempo transcurrido por debajo de 35 ng/ml predijo eventos CV totales (HR 0,86 por cada 10% del tiempo pasado por debajo de 35 ng/ml) y remodelado cardiaco

			adverso (OR 1,22; IC del 95%: 1,04 - 1,43).
Anand et al. (30)	1650 pacientes IC crónica, estudio VAL-HEFT Seguimiento: 1 año	Desde el inicio hasta los 12 meses, para un aumento de 1 ng/ml en sST2, la pendiente del ln HR aumentó significativamente ( $\beta = 0,028$ ; IC del 95%: 0,020 - 0,035) para la predicción de muerte o hospitalización relacionada con IC.	Una disminución de sST2 se asoció con poco o ningún efecto sobre el lnHR. La concentración de 35 ng/mL también se admite como valor umbral.
Miller et al. (35)	180 pacientes IC crónica FEVI $\leq$ 40% Seguimiento: mediana 2 años	Elevaciones de sST2 ( $\geq$ 49,3 ng/mL hombres, $\geq$ 33,5 ng/mL mujeres) predictivas del endpoint primario (muerte y trasplante cardiaco).	Con medidas seriadas, solo sST2 demostró valor incremental en la reclasificación de pacientes a mayor riesgo.
Emdin et al. (36)	4268 pacientes IC crónica FEVI $<$ 40% Seguimiento: mediana 2.4 años	El mejor punto de corte de sST2 para la predicción de muerte CV y por todas las causas y hospitalización por IC fue de 28 ng/ml sST2 proporcionó un valor predictivo fuerte e independiente de mortalidad por todas las	sST2 mantuvo su valor pronóstico independiente en la mayoría de los subgrupos de población.

		causas y mortalidad CV, y hospitalización por IC.	
Aimo et al. (42)	6372 pacientes IC crónica	El HR fue de 1,75 (IC 95 %: 1,37 a 2,22) para muerte por todas las causas y de 1,79 (IC 95 %: 1,22 a 2,63) para muerte CV (ambos $p < 0,001$ ).	El poder predictivo de sST2 fue mayor cuando los pacientes fueron tratados de acuerdo con el tratamiento médico recomendado por las guías actuales.
Sabatine et al. (26)	1239 pacientes IAMCEST, CLARITY-TIMI 28 Seguimiento: 30 días	sST2 se asoció con un riesgo significativamente mayor de muerte CV o IC a los 30 días (tercer cuartil: OR 1,42; IC del 95%: 0,68 a 3,57; cuarto cuartil: OR 3,57; IC del 95%: 1,87 a 6,81), independientemente de los factores de riesgo y complementario a NT-proBNP.	La combinación de ST2 y NT-proBNP mejoró la estratificación del riesgo y la discriminación en comparación con la puntuación de riesgo TIMI solo (estadística $c$ 0,86 frente a 0,82).
Jenkins et al. (27)	1401 pacientes IAMSEST Seguimiento: 5 años	Después de ajustar por edad, sexo, comorbilidades, clase Killip y troponina T, los HR para muerte fueron 1,73 (IC del 95 %: 1,22 a 2,45) y 3,57 (IC del 95 %: 2,57 a 4,96) para los terciles 2 y 3 de sST2.	Para la insuficiencia cardíaca, los HR fueron 1,67 (IC del 95 %: 1,18 a 2,37) y 2,88 (IC del 95 %: 2,05 a 4,05), respectivamente ( $p < 0,001$ ).

		respectivamente (p <0,001).	
Kohli et al. (10)	4426 pacientes SCASEST, MERLIN-TIMI 36 Seguimiento: 30 días y 1 año	sST2 predijo la combinación de muerte cardiovascular y nueva IC o empeoramiento de la IC a los 30 días (HR 2,56; IC del 95%: 1,77 - 3,71)	sST2 predijo la combinación de muerte CV e IC nueva o que empeoraba también al año (HR 1,67; IC del 95%: 1,32 - 2,11)
Dieplinger et al. (37)	1345 pacientes Enfermedad coronaria estable Estudio LURIC Seguimiento: mediana 9,8 años	sST2 fue un predictor independiente de mortalidad por todas las causas (HR 1,16 por aumento de 1 DE en los valores transformados logarítmicamente; IC del 95%: 1,05 - 1,29).	El impacto pronóstico de sST2 fue aditivo para NT-proBNP y hs-TnT. Los pacientes con los tres biomarcadores elevados tuvieron el peor resultado.
Berg et al.(38)	191 pacientes Enfermedad coronaria estable BIOMArCS Seguimiento: 1 año	ST2 alcanzó su punto máximo inmediatamente después del SCA, pero nunca superó el valor de referencia.	La variación dentro del sujeto y el valor de cambio relativo (RCV) de ST2 eran relativamente pequeños (13,8%, RCV 39,7%).
CV, cardiovascular; IC, insuficiencia cardíaca; IDI, índice de mejoría de la discriminación (integrated discrimination improvement); SCASEST síndrome coronario agudo sin elevación del ST; NRI, índice de mejoría de la reclasificación (net reclassification improvement); MSC, muerte cardíaca súbita; IAMCEST, infarto agudo miocardio con elevación del ST.			

En pacientes con disnea aguda atendidos en el servicio de urgencias, las concentraciones séricas de sST2 predicen eficazmente la mortalidad al año en pacientes con IC aguda y en aquellos sin IC (16). Las concentraciones de sST2 fueron significativamente mayores en pacientes con IC que en aquellos con disnea sin IC, pero el rendimiento de sST2 para el diagnóstico de IC aguda fue significativamente inferior a la prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) [área bajo la curva (AUC) de 0,74 frente a 0,94 en la misma cohorte] (16)(41). El sST2 carecía de especificidad para diagnosticar la insuficiencia cardíaca, pero proporcionaba una potente información de pronóstico. De hecho, la capacidad de discriminación de sST2 para predecir la muerte mostró un AUC superior al observado en la misma cohorte con otros biomarcadores, como péptidos natriuréticos, galectina-3, la región media de la proadrenomedulina (MR-proADM), BUN, troponina (Tn) o hemoglobina. En una cohorte multinacional de pacientes con IC aguda, Lassus et al. mostraron que sST2 estaba nuevamente en la cima de los marcadores pronósticos para la predicción de mortalidad a 1 mes y 1 año, y exhibió un valor predictivo más alto que otros biomarcadores, como NT-proBNP, BNP, PCR o troponinas (17). Es importante señalar que el sST2 sigue siendo un predictor independiente de mortalidad sea cual sea la causa de la IC o la fracción de eyección del VI (18). Otro hallazgo repetido, según lo publicado por nuestro grupo y otros, es que la información de pronóstico proporcionada por sST2 es adicional a la proporcionada por otros biomarcadores bien establecidos, como péptidos natriuréticos y troponinas (19). En estudios pequeños se ha sugerido que las medidas seriadas de sST2 en los días posteriores al ingreso podrían mejorar la precisión de la predicción de la mortalidad (20) y los cambios durante la hospitalización podrían clasificar a los pacientes como respondedores o no, lo que también fue predictivo de la mortalidad a un año (21). Todos estos datos se confirman en el metaanálisis de Aimo et al. (39), en el cual el sST2 tiene valor pronóstico con respecto a la muerte por todas las causas y muerte cardiovascular, así como en la combinación de muerte por todas las causas y hospitalización por insuficiencia cardíaca, y los valores de ingreso y alta tienen eficacia pronóstica. El valor de sST2 al alta, pero no al ingreso, es predictivo de rehospitalización por IC durante el seguimiento (39).

De manera similar a lo publicado en estudios de la IC aguda, los estudios de pacientes con IC crónica ambulatoria han demostrado la capacidad pronóstica de ST2 en el seguimiento a largo plazo, en una amplia gama de cohortes. Las concentraciones de sST2 mejoraron la estratificación del riesgo de muerte, muerte cardiovascular y hospitalización por IC, y agregaron información independiente sobre otros biomarcadores, incluidos los péptidos natriuréticos (28,29). Además, cuando se realizan medidas repetidas, aquellos pacientes con valores de sST2 elevados y/o crecientes tienen un riesgo considerablemente mayor de eventos adversos, mientras que un valor descendente puede ser tranquilizador (30,31). Una concentración elevada de sST2 ha demostrado tener un impacto pronóstico muy significativo para predecir eventos relacionados con IC, y se ha observado un mayor beneficio de la adición o titulación de antagonistas de la aldosterona y  $\beta$ -bloqueantes en aquellos con concentraciones elevadas de sST2 (9,32). Estos datos se confirman de nuevo en el metaanálisis de Aimo et al. (40) donde sST2 fue un predictor de muerte por todas las causas y de muerte CV en pacientes ambulatorios con ICC, respaldando este estudio el uso de sST2 para la estratificación del riesgo en pacientes con ICC estable (40).

En el contexto del IAM, los niveles de sST2 en las primeras 24h predicen mortalidad, mortalidad cardiovascular e IC a los 30 días (25). Además, como en la IC aguda, el valor predictivo del nivel de ST2 fue independiente y complementario de los péptidos natriuréticos; la combinación de ST2 y NTproBNP mejoró significativamente la estratificación del riesgo (26). En pacientes con SCA sin elevación del ST, la sST2 también fue predictiva de muerte cardiovascular e insuficiencia cardíaca a los 30 días y al año (10). En la enfermedad coronaria estable, el sST2 también predice la mortalidad y la muerte cardiovascular independientemente de las variables clínicas y los biomarcadores (37). En los pacientes que acudieron al servicio de urgencias con dolor torácico, el ST2 presentó claramente un rendimiento inferior al de la troponina T en el diagnóstico de IAM, con una sensibilidad y especificidad insuficientes (42,43). Sin embargo, mientras en el diagnóstico tiene bajo rendimiento; el desempeño pronóstico fue notable.

Es de especial interés la utilidad potencial del sST2 para predecir la muerte súbita cardíaca (MSC). Un estudio de casos y controles de nuestro grupo sugirió en 2009 que el sST2 se asocia con un mayor riesgo de MSC en pacientes con disfunción sistólica del

VI grave y añade información pronóstica a los péptidos natriuréticos (33). Este hallazgo también ha sido apoyado en un análisis del estudio ACTION-HF, donde los marcadores de fibrosis y el sST2 en particular mejoraron la estratificación del riesgo de MSC (34).

#### 5.4 Consideraciones analíticas

El test Presage ST2 (44)(Critical Diagnostics, San Diego, CA, EE. UU.) es un método que ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA), como ayuda para evaluar el pronóstico de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, y ha recibido la "Conformité Européenne Mark". Otros test se han utilizado ampliamente en ensayos de investigación, pero los resultados entre test no son comparables. El test Presage ST2 (44,45) mide las concentraciones de sST2 en suero y plasma mediante ELISA y tiene varias características favorables: alta estabilidad in vitro del analito, bajos coeficientes intra (<7%) e interensayo (<9%), límite bajo de detección (1,3 ng/mL) y sin influencia del estado de ayuno. Es importante tener en cuenta que los valores de referencia son más altos en hombres que en mujeres (4 - 31 ng/mL en una muestra masculina y 2 - 21 ng/mL en una muestra femenina de donantes de sangre sanos (45)), pero no se ven afectados por la edad y función renal.

El sST2 carece de especificidad para ser útil como prueba diagnóstica, pero representa un poderoso marcador pronóstico en varias enfermedades cardiovasculares. A partir de las revisiones de los estudios existentes utilizando el test Presage ST2, se puede sugerir el valor de >35 ng/ml como el umbral asociado con un peor pronóstico. Cuando se realiza una prueba clínica, la variación biológica de sST2 es baja (46): el valor de cambio de referencia fue del 30%, que se compara muy bien con el 92% del NT-proBNP. Significa que sST2 podría ser más útil como marcador en serie de respuesta al tratamiento que NT-proBNP, debido a su menor variación biológica.



# **JUSTIFICACIÓN**



## 6. JUSTIFICACIÓN

La isoforma soluble de la proteína ST2 (sST2: supresor de tumorigenicidad tipo 2 soluble) es un potente biomarcador pronóstico en los pacientes con patologías cardíacas tales como insuficiencia cardíaca y síndromes coronarios agudos. El ST2 es un miembro de la familia de receptores IL (interleucina) -1 con 2 isoformas principales: transmembrana o celular (ST2L) y una forma soluble circulante (ST2 soluble [sST2])(47). La interacción entre ST2L y su ligando IL-33 han mostrado un efecto cardioprotector en modelos experimentales, lo que resulta en la prevención de la fibrosis miocárdica, hipertrofia y apoptosis(3). Sin embargo, sST2 se une con avidéz a IL-33, lo que da como resultado la interrupción de la interacción entre IL-33 / ST2L; por tanto, sST2 se considera un receptor señuelo, que previene la transducción de efectos favorables de IL-33 a través de ST2L. Como hemos visto, las concentraciones circulantes de sST2 están elevadas en la sangre periférica de pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) e insuficiencia cardíaca (IC)(25,48). En el contexto de un IAM, las concentraciones de sST2 aumentan desde el primer día, se correlacionan con el grado de necrosis y disfunción sistólica ventricular, y se asocian a un mayor riesgo de muerte e IC en el seguimiento(9). La información pronóstica proporcionada por las concentraciones circulantes de sST2 es aditiva sobre otras variables clínicas y biomarcadores, incluidos los péptidos natriuréticos, con valor pronóstico aditivo similar en la IC(25,48,49). En los pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (SCACEST), las concentraciones de sST2 se elevan de forma temprana e identifican a pacientes con un mayor riesgo de muerte, remodelación miocárdica inadecuada e insuficiencia cardíaca en el seguimiento (9,47,50).

**Aunque sabemos que existe un incremento significativo de las concentraciones de sST2 circulante en pacientes que presentan un IAM e IC, se desconoce cuál es la fuente principal de sST2. Por este motivo, realizamos un estudio clínico en pacientes con IAM y un estudio clínico en pacientes con IC para dilucidar si la fuente de producción del sST2 es cardíaca o extracardiaca.**

Por otro lado, aunque conocemos que los fibroblastos cardíacos y los cardiomiocitos son fuentes moleculares de sST2 en respuesta al estrés o una lesión, los datos emergentes sugieren una falta de correlación entre la expresión de ST2 en tejidos y las concentraciones circulantes. Se sabe relativamente poco sobre la producción extracardíaca y la regulación de sST2(3,25,47). Se sabe que las células endoteliales del sistema macrovascular (aórtico y coronario) y microvascular cardíaco pueden liberar sST2(7,8). Sin embargo, la producción vascular de sST2 en otros órganos sigue siendo especulativa. Nuestro grupo investigador junto con otros grupos hemos notado una estrecha relación entre los niveles circulantes de sST2 y las enfermedades pulmonares(51); Algunas de las concentraciones más altas de sST2 en estudios clínicos se han registrado en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda(52). **Por lo tanto, la producción de sST2 en el tejido pulmonar puede explicar las concentraciones circulantes del biomarcador. Por este motivo, evaluamos si los pulmones son una fuente significativa de sST2 en el contexto de la IC.**



# **HIPÓTESIS**



## 7. HIPÓTESIS

Las concentraciones de sST2 están elevadas en pacientes con IAM e IC, pero se desconoce cuál es su fuente de producción. Lo que nos lleva a estudiar en este trabajo cual es la fuente de producción de sST2 con la hipótesis de que la fuente principal de producción de sST2 es de origen extracardiaco.

La identificación de la fuente de producción de sST2 nos permitiría trabajar con terapias dirigidas a disminuir la expresión de sST2, evitando así su producción, lo que sería de utilidad terapéutica al favorecer los efectos cardioprotectores.



## **OBJETIVOS**



## 8. OBJETIVOS

1. Estudiar si la fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM es cardíaca o extracardiaca
2. Estudiar si la fuente de producción de sST2 en pacientes con IC crónica avanzada es cardíaca o extracardiaca
3. Estudiar si los pulmones son una fuente significativa de sST2 en el contexto de la IC.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 9. MATERIAL Y MÉTODOS

### 9.1 Estudio de la fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM

#### 9.1.1 Estudio clínico

##### 9.1.1.1 DISEÑO

Estudio clínico unicéntrico prospectivo de investigación biomédica.

##### 9.1.1.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se reclutaron 20 pacientes, mayores de 18 años, de ambos sexos, con diagnóstico de IAM y elevación del ST, que ingresaron en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, entre febrero de 2016 y marzo 2017, y que iban a ser sometidos a una angioplastia primaria por práctica clínica. Los pacientes fueron reclutados dentro de las 12 horas desde el inicio de los síntomas. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local (CEI Arrixaca) y se obtuvo el consentimiento informado en el momento del procedimiento en cada paciente.

##### - CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con un síndrome coronario agudo con ascenso del ST sometidos a angioplastia primaria en las primeras 12 horas del inicio de los síntomas, en situación hemodinámica estable (a criterio médico del cardiólogo intervencionista responsable).
- Edad mayor de 18 años.
- Pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado por escrito.

##### - CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Shock cardiogénico.
- Procedimiento intervencionista complicado.
- Arritmias ventriculares.
- Pacientes intubados.

### 9.1.1.3 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Tras el procedimiento de revascularización, inmediatamente después de la reperfusión de la arteria coronaria culpable, se obtuvo muestras de sangre en cuatro sitios. Figura 3:

- seno coronario.
- raíz aórtica.
- arteria radial.
- vena braquial.

Para la obtención de sangre del seno coronario se avanzó un catéter MP o JR4 4 French bajo control fluoroscópico a través de la vena antecubital hasta alcanzar la aurícula derecha; una vez allí se posicionó el catéter en el seno coronario, hecho que se confirmó mediante una inyección de contraste yodado. Las muestras de sangre se recogieron simultáneamente de la raíz aórtica y el seno coronario para permitir el cálculo del gradiente transcárdico.

De cada uno de los sitios se extrajo 3 tubos (tubo de bioquímica para la obtención de suero, tubo de EDTA para plasma, y tubo de paxgene para RNA). Después de la recolección, se procesaron las muestras de sangre y se almacenaron a -80°C hasta ser analizadas. El procesamiento y almacenaje se realizó con la colaboración de la plataforma de BIOBANCO del hospital.

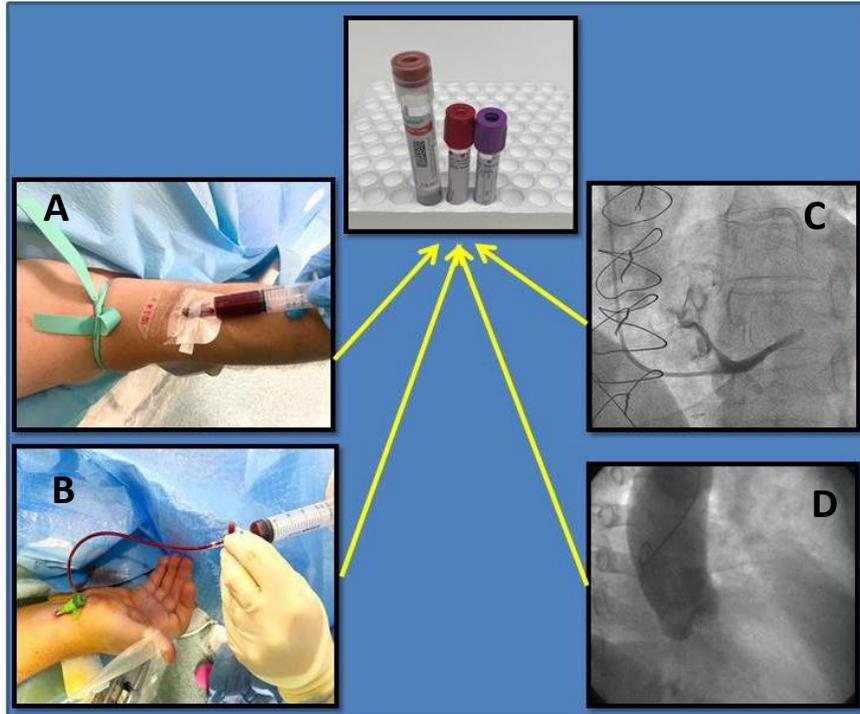


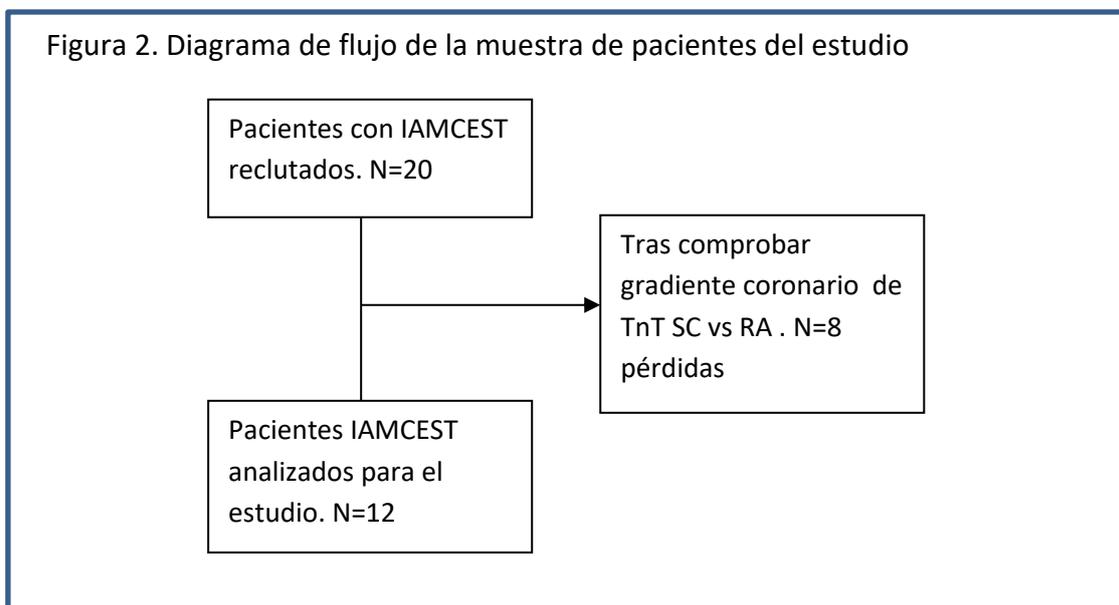
Figura 3: Zonas de extracción de sangre en pacientes con IAM. A: Vena braquial. B: Arteria radial. C: Seno coronario. D: Raíz aórtica. De cada zona se extrajo 3 tubos (tubo de bioquímica, tubo de EDTA, y tubo de paxgene)

Se utilizaron los reactivos comerciales para medir sST2 (Presage ELISA (44), Critical Diagnostics), NTproBNP (Roche diagnostics), hsTnT (Roche diagnostics) y Creatin quinasa MB (CK-MB, Roche diagnostics).

Se reclutaron 20 pacientes, y para comprobar la existencia de gradiente trans-coronario (seno coronario vs raíz aórtica), analizamos el gradiente de hsTnT y CK-MB, ya que es conocido que estos biomarcadores tienen gradiente trans-cardíaco (53). En 8 pacientes no vimos gradiente en las muestras de sangre extraídas, por lo que para el análisis nos quedamos con los 12 pacientes en los que sí existía gradiente de hsTnT y CK-MB.

#### 9.1.1.4 TAMAÑO MUESTRAL

Este estudio evalúa si la producción de sST2 es predominantemente de origen cardiaco en pacientes con IAM. Para dicho estudio se planeó la inclusión de 14 pacientes, siendo esta muestra suficiente para detectar un gradiente de al menos la desviación típica, con una potencia del 80%, un intervalo de confianza del 95% y 10% de pérdidas.



#### 9.1.1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis descriptivos para todas las características demográficas y datos clínicos y analíticos de los pacientes. Debido al tamaño de la muestra y la no normalidad, se utilizó el test de Friedman para ver las diferencias en los valores del biomarcador entre los cuatro sitios (raíz aórtica, seno coronario, vena braquial y arteria radial) y, en caso de ser significativas, se realizó Wilcoxon por parejas con la corrección de las comparaciones múltiples Holm-Bonferroni. El software estadístico R (versión 3.4.3) se utilizó para realizar todos los análisis y gráficos.

### 9.1.1.6 VARIABLES DEL ESTUDIO

Se confeccionó una base de datos donde se recogieron las siguientes variables:

#### Variables demográficas:

Edad	años
Sexo	Hombre/ mujer
Peso	kg
Altura	cm

#### Factores de riesgo:

- Hipertensión
- Dislipemia
- Diabetes Mellitus
- Tabaco
- Enfermedad arterial coronaria

#### Variables relacionadas con el intervencionismo:

- Arteria culpable (Tronco, descendente anterior, circunfleja, coronaria derecha)
- Número de vasos enfermos
- Tiempo de reperfusión (minutos)
- Clase Killip (I, II, III, IV)
- Tensión arterial sistólica (mmHg)
- Tensión arterial diastólica (mmHg)
- Frecuencia cardiaca (lpm)
- Ritmo (sinusal/ FA)

#### Variables relacionadas con la hospitalización:

#### Variables analíticas

- Glucosa (mg/dl)
- Urea (mg/dl)
- Creatinina (mg/dl)
- Sodio (mEq/L)
- Potasio (mEq/L)
- Colesterol total (mg/dl)
- LDL (mg/dl)
- HDL (mg/dl)
- Troponina T ultrasensible (pg/ml)
- GOT (U/L)
- GPT (U/L)
- GGT (U/L)
- Hematíes
- Hemoglobina (g/dl)
- Leucocitos (células \* 1000)
- Plaquetas

**Ecocardiografía:**

- FEVI (%)

**Tratamiento (al alta):**

- AAS
- Antiagregantes (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor)
- Estatinas (atorvastatina, rosuvastatina)
- IECAS (ramipril)
- ARAII (valsartán, irbesartán, telmisartán, losartán)
- Beta-bloqueantes (bisoprolol)
- Antagonistas de aldosterona (epplerenona, espironolactona)
- Diuréticos (furosemida, torasemida, hidroclorotiazida)

## **9.2 Estudio de la fuente de producción de sST2 en pacientes con IC crónica avanzada.**

### **9.2.1 Estudio clínico**

#### **9.2.1.1 DISEÑO**

Estudio clínico unicéntrico prospectivo de investigación biomédica.

#### **9.2.1.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se reclutaron 10 pacientes, mayores de 18 años, varones, con diagnóstico de insuficiencia cardiaca avanzada que ingresaron en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, entre noviembre de 2015 y mayo 2017, y que iban a ser sometidos a cateterismo derecho y coronariografía dentro de un protocolo de estudio pretrasplante cardiaco. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local (CEI Arrixaca) y se obtuvo el consentimiento informado en cada paciente.

##### **- CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada, en estudio pretrasplante cardiaco.
- Edad mayor de 18 años.
- Pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado por escrito.

##### **- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Shock cardiogénico
- Procedimiento intervencionista complicado
- Arritmias ventriculares
- Pacientes intubados

### 9.2.1.3 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Durante el procedimiento se obtuvo medidas hemodinámicas, así como muestras de sangre en los siguientes sitios:

- aorta a nivel de la raíz aórtica.
- seno venoso coronario.
- tronco de la arteria pulmonar.
- capilar pulmonar en el enclavamiento.
- arteria femoral.
- vena femoral.

El catéter de muestreo se colocó en el seno coronario bajo control fluoroscópico, y se confirmó mediante inyección de material de contraste radiográfico. Las muestras de sangre se recogieron simultáneamente de la raíz aórtica y el seno coronario para permitir el cálculo del gradiente transcárdico.

De cada uno de los sitios se extrajo 3 tubos (tubo de bioquímica para la obtención de suero, tubo de EDTA para plasma, y tubo de paxgene para RNA). Después de la recolección, se procesaron las muestras de sangre y se almacenaron a -80°C hasta ser analizadas. El procesamiento y almacenaje se realizó con la colaboración de la plataforma de BIOBANCO del hospital.

Se utilizaron los reactivos comerciales para medir sST2 (Presage ELISA (44), Critical Diagnostics), NTproBNP (Roche diagnostics), hsTnT (Roche diagnostics) y Creatin quinasa MB (CK-MB, Roche diagnostics).

#### 9.2.1.4 TAMAÑO MUESTRAL

Este estudio determina los tejidos y tipos celulares responsables de la síntesis de sST2 en respuesta a la insuficiencia cardíaca crónica avanzada. Para dicho estudio se planeó la inclusión de 10 pacientes, siendo esta muestra suficiente para detectar un gradiente de al menos la desviación típica, con una potencia del 80%, un intervalo de confianza del 95% y 10% de pérdidas.

#### 9.2.1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis descriptivos para todas las características demográficas y datos clínicos y analíticos de los pacientes. Debido al tamaño de la muestra y la no normalidad de la misma, se utilizó el test de Friedman para ver las diferencias en los valores del biomarcador entre los seis sitios (raíz aórtica, seno coronario, arteria pulmonar, capilar pulmonar, vena femoral y arteria femoral) y, en caso de ser significativas, se realizaron Wilcoxon por parejas con la corrección de las comparaciones múltiples Holm-Bonferroni. El software estadístico R (versión 3.4.3) se utilizó para realizar todos los análisis y gráficos.

#### 9.2.1.6 VARIABLES DEL ESTUDIO

Se confeccionó una base de datos donde se recogieron las siguientes variables:

##### **Variables demográficas:**

Edad	años
Sexo	Hombre

##### **Exploración física:**

- Peso

- Altura
- Tensión arterial sistólica
- Tensión arterial diastólica
- Frecuencia cardiaca

**Factores de riesgo:**

- Hipertensión
- Dislipemia
- Diabetes Mellitus
- Tabaco
- Enfermedad arterial coronaria

**Variables relacionadas con la insuficiencia cardiaca:**

- Fecha diagnóstico IC
- Etiología IC (dilatada/ isquémica/ hipertrófica/ valvular/ idiopática)
- Número de ingresos por IC
- Clase NYHA (I/ II/ III/ IV)
- IAMCEST previo
- Angioplastia previa
- Bypass previo
- Angina previa
- Dispositivo (DAI/ DAI-TRC/ MP/ MP-TRC)
- Ritmo (sinusal/ fibrilación auricular/ flutter)

**Variables relacionadas con la hospitalización:**

**Variables analíticas**

- Glucosa (mg/dl)
- Urea (mg/dl)
- Creatinina (mg/dl)
- Sodio (mEq/L)
- Potasio (mEq/L)

- Colesterol total (mg/dl)
- LDL (mg/dl)
- HDL (mg/dl)
- Troponina T ultrasensible (pg/ml)
- NTproBNP (pg/ml)
- GOT (U/L)
- GPT (U/L)
- GGT (U/L)
- Hematíes
- Hemoglobina (g/dl)
- Leucocitos (células \* 1000)
- Plaquetas

**Cateterismo derecho:**

- AD (mmHg)
- AP (mmHg)
- PCP
- GTP
- GC
- IC
- RVP (U Wood)

**Ecocardiografía:**

- FEVI (%)
- SIV (cm)
- PPVI (cm)
- DVI (cm)
- AI (cm)
- Masa VI (g)
- VTD (ml)
- VTS (ml)

- TAPSE (cm)

**Tratamiento:**

- IECAS (ramipril)
- ARAII (valsartán)
- ARNi (sacubitril/ valsartán)
- Beta-bloqueantes (bisoprolol/ carvedilol/ nebivolol)
- Antagonistas de aldosterona (eplerenona, espironolactona)
- Diuréticos (furosemida/ hidroclorotiazida)
- Ivabradina
- AAS
- Antiagregantes (clopidogrel)
- ACO (acenocumarol/ rivaroxabán)
- Estatinas (atorvastatina/ simvastatina/ rosuvastatina/ pitavastatina/ fluvastatina)

### **9.3 Estudio del papel de los pulmones como una fuente de producción de sST2 en la insuficiencia cardiaca.**

#### **9.3.1 Estudio experimental.**

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (número de registro: A13150105). Se compraron ratas macho Wistar de 6 semanas de edad y se albergaron en condiciones estándar de laboratorio en una instalación libre de patógenos con control de ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, a 22 ° C y 60% de humedad, y se alimentaron ad libitum. Después de 7 días de adaptación, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos experimentales para la inducción del IAM. El protocolo de inducción del IAM se describe con todo detalle en el trabajo de nuestro grupo de 2014 de J Sánchez-Mas et

al. (54). El IAM se indujo mediante ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Las ratas infartadas se asignaron aleatoriamente a 4 grupos según el tiempo desde la cirugía hasta el sacrificio: 1, 2, 4 y 24 semanas.

Los animales control operados se sometieron a los mismos procedimientos quirúrgicos, sin provocar ligadura de la arteria coronaria. La mortalidad dentro de las primeras 24 horas después de la inducción del IAM fue del 26% en los animales infartados y no se produjeron muertes después de las 24 horas posteriores al infarto. En cada momento, se sacrificó a las ratas y se extrajo cuidadosamente sus órganos (pulmón, corazón, riñón e hígado). Se fijó con formalina una sección transversal de cada órgano y se incluyó en bloques de parafina para el examen inmunohistoquímico. El resto de cada órgano se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la determinación de la expresión génica. La ecocardiografía transtorácica se realizó el día del sacrificio por un solo operador experimentado de forma ciega, como se describió en el trabajo de nuestro grupo (54).

### **9.3.2 Fracción proteica y western blot.**

Aproximadamente 30 mg de tejido de miocardio infartado se homogeneizó suavemente mediante sonicación y luego se centrifugó a 20.000 xg a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 20 min. El sobrenadante resultante se dividió en alícuotas y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el método del ácido bicinconínico (55). Los lisados de proteínas se cargaron en mini geles de poliacrilamida-SDS. La electroforesis y el análisis de transferencia Western se realizaron como se describió en el estudio de Lax A. et al de nuestro grupo(56), utilizando anticuerpo policlonal anti-IL33 de conejo (sc-98660), anticuerpo policlonal anti-GADPH de conejo (sc-25778) de Santa Cruz Biotechnology, Inc., y anticuerpo monoclonal anti-ST2 de ratón de proteintech (11920-1-AP). Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante ECL utilizando un sistema ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS + con el software Image Lab<sup>TM</sup> de BioRad Laboratories Inc. (Berkeley, CA). Se realizó un análisis cuantitativo con el

software Gel-Pro Analyzer 3.1 (Sigma). Se verificó la igualdad de carga en los carriles con el GAPDH.

### 9.3.3 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).

El RNAm de 30 mg de cada tejido se aisló usando el Dynabeads mRNA Direct Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), y el cDNA se sintetizó usando GeneAmp RNA PCR Kit (Roche, Branchburg, NJ), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR se realizó con SYBR Premix Ex Taq (Takara Biotechnology, Dalian, China) en un sistema LightCycler (Roche). Los genes amplificados fueron IL-33, sST2, ST2L y GAPDH, el último como gen constitutivo. Se evaluó la eficiencia para cada par de cebadores y se amplificó 0,5 µl de ADNc molde mediante 40 ciclos de RT-PCR (10 segundos a 95 ° C, 10 segundos a 60 ° C y 15 segundos a 72 ° C). Los datos se normalizaron a la expresión de GAPDH y se presentaron como incrementos en relación al grupo control. Las secuencias de los cebadores se describieron en un estudio previo (56). Las secuencias de cebadores específicos de genes utilizadas para la detección cuantitativa por PCR en tiempo real fueron:

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTA	CAGAGGTGCCATCCAGAGTT
IL-33	GTGCAGGAAAGGAAGACTCG	TGGCCTCACCATAAGAAAGG
sST2	GGTGTGACCGACAAGGACT	TTGTGAGAGACACTCCTTAC
ST2L	AGTTGTGCATTTACGGGAGAG	GGATACTGCTTTCCACCACAG

### **9.3.4 Inmunohistoquímica.**

Se seccionaron tejidos pulmonares fijados con formalina e incluidos en parafina (3  $\mu\text{m}$ ) y se colocaron en portaobjetos de vidrio recubiertos de poli-L-lisina. Las secciones se desparafinaron y se pretrataron en Dako PT Link durante 20 minutos a 97 ° C usando EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Dako, Dinamarca). Para la tinción de sST2, las secciones rehidratadas se incubaron durante la noche con anticuerpo policlonal contra sST2 (dilución 1:500; Proteintech, Chicago, IL). Tras el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con polímero biotinilado (marcado con biotina) anti-conejo (Dako EnVision), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las secciones finalmente se revelaron con 2,2'-diaminobencidina. La inmunotinción positiva se identificó como un precipitado citoplasmático de color marrón oscuro. Las imágenes de alta resolución se obtuvieron a través de un microscopio Zeiss Axio Scope A10 (Carl Zeiss, Madrid, España).

### **9.3.5 Aislamiento y purificación de células del epitelio alveolar tipo II de pulmones humanos.**

El método de aislamiento se estableció mediante la adaptación y modificación de varios protocolos (57,58). Se utilizó citometría de flujo y clasificación de las células del componente pulmonar para su posterior purificación. A continuación, se explica detalladamente.

En condiciones estériles, se obtuvo tejido de porciones distales del pulmón normal (1-2 g) de pacientes sometidos a resección pulmonar. En un baño de hielo, la muestra se cortó en trozos de 1  $\text{cm}^3$  de tamaño y se lavó con solución salina equilibrada de Hanks sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS) y se complementó con penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza, Verviers, Bélgica), hasta que se volvió transparente. Los trozos de pulmón se trituraron (0,5  $\text{mm}^3$ ) con tijeras oculares y luego se transfirieron a un vaso de precipitados esterilizado que contenía 50 ml de HBSS. Después de mezclar bien, la solución de tejido se filtró pasando a través de un filtro de malla (100  $\mu\text{m}$ ) (BD Falcon, San José, CA). El

tejido restante se lavó un mínimo de tres veces y se incubó en agitación con una solución que contenía 3 ml de tripsina (10,000 U/ml; Sigma, Saint Louis, MO) y 300  $\mu$ l de elastasa (5.1 U/ml; Worthington, Lakerwood, NJ) durante 45 min en una incubadora a 37 ° C. Luego, se añadió DNasa I (150 KU, Sigma, Saint Louis, MO) a 0,015 mg/ml en HBSS y se prolongó la incubación otros 15 min más. La actividad enzimática se detuvo usando 12 ml de solución de inhibición (9ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/mezcla de nutrientes F-12 Ham, 1:1, Sigma, Saint Louis, MO; 3 ml de FBS y 0,03 mg/ml de DNasa I (150 KU, Sigma, Saint Louis, MO) en HBSS. La suspensión digerida se diluyó después mediante la adición de 50 ml de HBSS suplementado con penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza, Verviers, Bélgica) y se homogeneizó minuciosamente usando una pipeta Pasteur durante 10 min. La suspensión se filtró a través de filtros de células de tamaño 100, 75 y 40  $\mu$ m en tándem para recoger la suspensión celular cruda. Después de centrifugar a 480 xg durante 10 min a 4°C, el sedimento se resuspendió en medio de adhesión para macrófagos y fibroblastos (20 ml de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/ mezcla de nutrientes F-12 Ham, 1:1; 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina). El cultivo celular se incubó a 37 °C durante 180 min. Este procedimiento de adhesión diferencial se repitió tres veces, y luego las células AEII en el sobrenadante se recogieron suavemente y se centrifugaron a 300 xg durante 10 min a temperatura ambiente. Los sedimentos se resuspendieron en 3 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/mezcla de nutrientes F-12 Ham, y la suspensión de células crudas se colocó en capas en gradientes de Percoll discontinuos de 1.040-1.089 g/ml. Una solución de 40 ml de baja densidad (1,040 g/ml) que contenía 4 ml de PBS (10x), 12,55 ml de solución Percoll® (MP Biomedicals, Solon, OH) y 23,45 ml de solución estéril (mili-Q-agua). Una solución de 40 ml de alta densidad (1,089 g / ml) que contenía 4 ml de PBS (10x), 25,96 ml de solución Percoll® (MP Biomedicals), 10,04 ml solución estéril (milli-Q-water) y una gota de rojo fenol. Cada solución a 3 ml de volumen se cargó en FBS en tubos de centrifuga de 15 ml, seguido de centrifugación a 300 xg durante 20 min a 4 °C utilizando un rotor oscilante para generar una capa enriquecida de células AEII en la interfaz entre las dos capas de gradientes de Percoll. Los sedimentos celulares enriquecidos se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía 13 ml de HBSS suplementado con penicilina/estreptomicina al 1% y se centrifugaron a 300 xg durante 10 minutos a

temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en HBSS suplementado con penicilina/estreptomicina al 1%, antes de su purificación por citometría de flujo.

### **9.3.6 Citometría de flujo y clasificación de células pulmonares.**

Para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), utilizamos el anticuerpo AESII específico MUC-1 de BD bioscience para su purificación. En pocas palabras, el anticuerpo (5  $\mu$ l) se incubó con las células ( $1 \times 10^6$ ) durante 30 min a 4 °C en HBSS. Clasificamos subpoblaciones vivas y células individuales en función de sus patrones de tinción con MUC-1-B515 utilizando un clasificador de células FACS Aria II y FACS Diva frente al 6.1 (BD Biosciences). Los análisis para FACS se realizaron utilizando el paquete de software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Las células clasificadas se recolectaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/mezcla de nutrientes F-12 Ham (1:1), suplementado con glutamina 2 mM, 10% de FBS, 0,1% de solución de aminoácidos no esenciales MEM y 1% de penicilina/estreptomicina, (medio completo) para análisis adicionales. Paralelamente, aislamos la fracción de fibroblastos.

### **9.3.7 Tinción por inmunofluorescencia.**

Para la tinción por inmunofluorescencia, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Bloqueamos y permeabilizamos las muestras durante 30 min a temperatura ambiente con Triton X al 0,1% / BSA / PBS al 1% que contenía suero al 10% de la misma especie utilizada para generar los anticuerpos secundarios. Incubamos las muestras durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario. En la inmunotinción para TTF-1, se utilizó el kit de etiquetado Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) en lugar de anticuerpos secundarios. Después del montaje de las secciones y la tinción de los núcleos con DAPI (42,6-diamidino-2-fenilindol; Molecular Probes), las muestras se observaron mediante

microscopía confocal (Leica Microsystems). Todos los procedimientos de inmunotinción se realizaron con controles de isotipo apropiados (BD Pharmingen, eBioscience, Sigma-Aldrich y Biolegend).

### **9.3.8 Modelo de simulación de stress bioquímico.**

Se cultivaron células primarias humanas aisladas en medio completo. Para inducir el estrés bioquímico, las células se volvieron quiescentes antes de cualquier tratamiento mediante la disminución del suero bovino fetal al 0,1% y luego se coestimularon con forbol-12-miristato-13-acetato 0,2  $\mu$ M y A23187 0,4  $\mu$ M durante 10 o 24 horas, lo que induce estrés celular sostenido en el tiempo(59). Varios estudios han descrito que estas moléculas se usan a menudo en conjunto para inducir una fuerte respuesta de crecimiento celular hipertrófico cuando se aplican in vitro (59) y anteriormente se ha demostrado que estimulan la síntesis y la secreción de sST2.

### **9.3.9 Estudio clínico.**

#### **9.3.9.1 DISEÑO.**

Estudio clínico unicéntrico prospectivo de investigación biomédica.

#### **9.3.9.2 POBLACIÓN DEL ESTUDIO.**

Se reclutaron prospectivamente 29 pacientes (61% hombres;  $64 \pm 16$  años) ingresados en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Virgen de la Arrixaca que requerían soporte ventilatorio invasivo. Los pacientes tenían los siguientes diagnósticos: edema agudo pulmonar cardiogénico (sin enfermedad pulmonar), bronconeumonía (sin enfermedad cardíaca) y trastornos cerebrales (sin enfermedades pulmonares o cardíacas). En todos los casos se realizó una ecocardiografía para confirmar o descartar

la presencia de disfunción cardíaca. Fue necesario un consenso entre 2 médicos diferentes para confirmar el diagnóstico final de cada paciente.

### **9.3.9.3 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO.**

En el momento de la intubación, se tomaron muestras de aspirado bronquial mediante la inserción de una cánula en el bronquio mayor y, al mismo tiempo, se tomaron muestras de sangre de una vena central.

Los aspirados bronquiales se homogeneizaron mediante sonicación breve en hielo (2 x 30 segundos; Sonopuls HD 2200; Bandelin, Berlín, Alemania) seguido de centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos.

Las muestras de aspiración y suero se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. Las variables clínicas se registraron prospectivamente en el momento de la intubación y durante el ingreso.

Las concentraciones de sST2 en las muestras de suero y aspirado se midieron utilizando el test Presage ST2 humano (Critical Diagnostics, CA) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Cada muestra se midió por duplicado.

### **9.3.10 Análisis estadístico.**

Los datos se expresaron como media  $\pm$  EE de la media o DE cómo se indica en la tabla de resultados. La normalidad se probó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó una prueba t para datos no pareados o la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre 2 grupos. Se utilizó un ANOVA de 1 vía o la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples entre los grupos de IAM y el grupo control, mientras que se utilizaron análisis post hoc con el grupo control. Las correlaciones no paramétricas se estudiaron mediante el método de Spearman. La significación

estadística se asumió en  $p < 0,05$ . Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el programa estadístico SPSS 22 (IBM Corp).



# **RESULTADOS**



## 10. RESULTADOS

### 10.1 Fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM.

Las características de los pacientes reclutados se presentan en la Tabla 3. Veinte pacientes con SCACEST que se sometieron a una angioplastia primaria, de acuerdo con la práctica clínica habitual en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, fueron reclutados en este estudio prospectivo, de los cuales fueron finalmente seleccionados 12 (11 hombres (92%),  $62 \pm 10$  años). La arteria culpable del infarto fue la arteria coronaria derecha en 8 pacientes (63%), la circunfleja en 3 (42%) y la descendente anterior izquierda en 1 (35%). Se recolectaron muestras de sangre de la raíz aórtica y el seno coronario inmediatamente después de la reperfusión, para permitir el cálculo del gradiente transcárdico de sST2. Se obtuvo también muestras de la arteria radial y la vena braquial.

La mediana del tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la reperfusión y la toma de muestras fue de 167 minutos (intervalo intercuartílico [IQR]: 114 a 233 min; rango: 75 a 265 min). La mayoría de los pacientes estaban en clase funcional Killip I (11 de 12); la mediana de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo al alta fue del 60% (IQR: 56% a 65%; rango: 40% al 74%).

**Tabla 3.** Características de la población de estudio (pacientes IAM).

Variables	Total (n=12)
Edad, años	$62.2 \pm 10.3$
Hombres	11 (92%)
Índice de masa corporal, $\text{kg}/\text{m}^2$	$28.1 \pm 4.0$
Factores de riesgo	
Hipertensión	6 (50.0%)
Dislipemia	5 (41.7%)
Diabetes Mellitus	4 (33.3%)
Fumador	8 (66.7%)
Enfermedad arterial coronaria previa	2 (16.7%)
Procedimiento	

Arteria culpable	
Descendente anterior	1 (8.3%)
Circunfleja	3 (25.0%)
Coronaria derecha	8 (66.7%)
Número de vasos enfermos	1.00 [1.00, 2.25]
Tiempo de reperfusión, min	167 [114, 233]
Clase Killip I/II/III/IV	11/1/0/0
Tensión arterial sistólica, mmHg	119 ± 20
Tensión arterial diastólica, mmHg	72 ± 10
Frecuencia cardíaca	75 ± 12
Ritmo sinusal	11 (91.7%)
Hospitalización	
24-horas hsTnT pico, pg/mL	1490 [1005-3057]
Absoluta hsTnT pico, pg/mL	2512 [1538-3457]
FEVI al alta, %	60 [57-65]
Creatinina, mg/dl	0.96 ± 0.24
Colesterol total, mg/dl	164 ± 39
LDL colesterol, mg/dl	114 [55, 122]
Hemoglobina, g/dL	13.65 ± 1.63
Leucocitos, células* 1000	10.53 ± 2.18

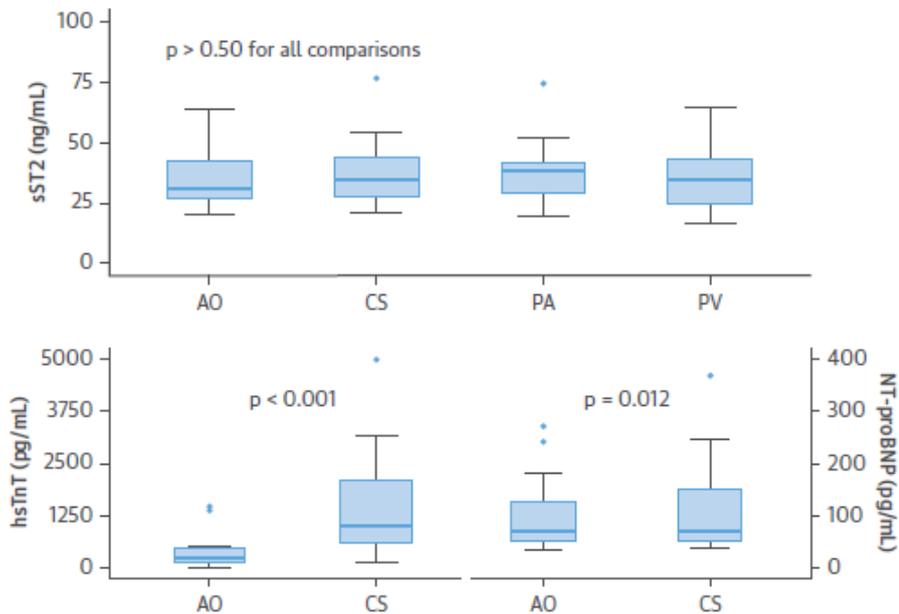
---

Los datos se expresan como número (%), media ± DE, mediana [percentil 25, percentil 75].

Las concentraciones de biomarcadores se detallan en Figura 4 y la tabla 4. Se utilizó el test de Friedman y Wilcoxon por pares con corrección de Bonferroni-Holm para estudiar las diferencias.

Los biomarcadores de necrosis cardiaca, troponina T y creatin quinasa MB mostraron un gradiente transcardíaco significativo ( $p < 0,001$ ); el péptido natriurético de tipo N-terminal pro-B (mediana: 64 pg/ml; IQR: 54 a 126 pg/ml) también mostró un gradiente pequeño pero significativo ( $p = 0,012$ ). La concentración media de sST2 fue 34,7 pg/ml (IQR: 27,7 a 43,3 pg/ml; rango: 21,0 a 76,4 pg/ml), pero sin evidencia de gradiente transcardíaco significativo, y no se encontraron diferencias significativas entre los distintos sitios de extracción de la muestra ( $p > 0,50$ ). No se encontraron tampoco diferencias en los niveles de sST2 en función de la arteria responsable del infarto o en aquellos pacientes con niveles de sST2  $> 35$  pg/ml. Exploramos todas las correlaciones clínicas de sST2, y la única significativa fue una mayor concentración de sST2 tras la reperfusión en pacientes con menor fracción de eyección ventricular izquierda al alta ( $r > 0,70$ ;  $p < 0,001$ ). La figura 5 muestra la correlación entre la FEVI y los niveles de sST2 en seno coronario ( $r = -0.71$ ,  $p = 0.009$ ) y vena periférica ( $r = -0.79$ ,  $p = 0.005$ ).

Figura 4. Concentraciones de biomarcadores según lugar de extracción.



Concentración de biomarcadores en todos los sitios de extracción: raíz aórtica (AO); seno coronario (CS); arteria periférica (PA); vena periférica (PV). Para cada biomarcador se han representado gráficos boxplot. En los gráficos boxplot se representa: con una barra central la mediana, con la caja el 50% de los valores (rango intercuartílico, RIC) y con los bigotes los límites  $1.5 \times \text{RIC}$ . Más allá de los bigotes se consideran valores atípicos y se representan los valores como puntos.

hsTnT= troponina T ultrasensible; NT-proBNP= porción N-terminal del pro-peptido natriurético tipo B; sST2= isoforma soluble de ST2

**Tabla 4.** Concentraciones de biomarcadores en cada sitio de extracción.

Biomarcador	Sitio				p
	Raíz Aórtica	Seno coronario	Arteria periférica	Vena periférica	
ST2, ng/mL	31.24 [27.35, 42.20]	34.50 [27.66, 43.32]	38.05 [29.09, 41.65]	34.70 [25.04, 42.56]	0.475
TnT, pg/mL	235.00 [167.50, 454.00]	1019.00 [627.25, 2079.75] #	301.00 [204.00, 461.00]	338.50 [173.25, 662.50]	<0.001
CKMB, U/L	20.43 [13.18, 29.98]	60.09 [30.62, 98.30] #	23.19 [14.08, 38.26]	25.28 [14.75, 44.68]	<0.001
pBNP pg/mL	70.00 [52.50, 126.25]	71.50 [53.25, 150.00] &	70.00 [55.75, 120.25]	64.00 [54.50, 125.75]	0.0116

Los datos se expresan como mediana [IQR].

Se utilizó la prueba de Friedman para contrastar las diferencias generales por sitio. En casos significativos, se realizó un análisis de comparación múltiple por pares (prueba de Wilcoxon) con corrección de Bonferroni-Holm.

# Resultados significativos con respecto a todos los demás sitios (comparaciones por pares)

& Resultados significativos con respect RA (SC-RA)

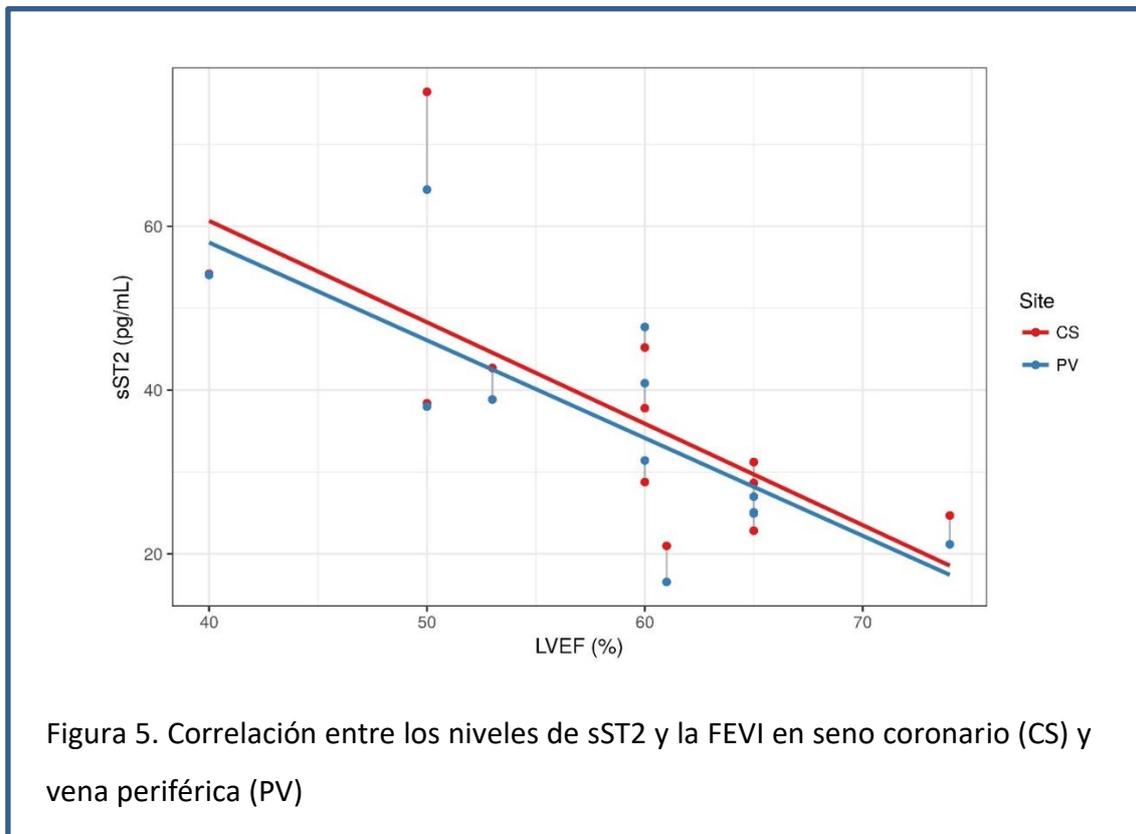


Figura 5. Correlación entre los niveles de sST2 y la FEVI en seno coronario (CS) y vena periférica (PV)

## 10.2 Fuente de producción de sST2 en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica avanzada.

10 pacientes con IC avanzada sometidos a cateterismo derecho y coronariografía dentro de un protocolo de estudio pretrasplante cardiaco, de acuerdo con la práctica clínica habitual en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, fueron incluidos en este estudio prospectivo (100% varones,  $57 \pm 6$  años). Se recolectó muestras de sangre de la raíz aórtica, seno coronario, capilar pulmonar y arteria pulmonar durante el procedimiento. Se obtuvo también muestras de la arteria femoral y la vena femoral.

Se utilizó test comercializados para medir el sST2 (Presage ST2, Critical Diagnostics, San Diego, California) así como otros marcadores cardíacos (NTproBNP (Roche diagnostics), hsTnT (Roche diagnostics) y Creatin quinasa MB (CK-MB, Roche diagnostics)).

A continuación, se presenta la tabla 5 con las características de la población.

**Tabla 5.** Características de la población de estudio (pacientes con IC)

<b>Variables</b>	<b>Total n=10</b>
Edad (media (DE))	57.51 (5.80)
Sexo = Hombre (%)	10 (100.0)
Peso (media (DE))	86.60 (12.85)
Talla (media (DE))	169.90 (8.79)
TAS (media (DE))	98.90 (8.06)
TAD (media (DE))	61.30 (4.32)
FC (media (DE))	66.90 (9.39)
Hipertensión = Sí (%)	6 (60.0)
Dislipemia = Sí (%)	5 (50.0)
Diabetes = Sí (%)	4 (40.0)
Tabaco = Exfumador (%)	5 (50.0)
Etiología_IC (%)	
Dilatada	7 (70.0)
Isquémica	2 (20.0)
Valvular	1 (10.0)
Nº Ingresos IC (mediana [IQR])	2.50 [1.25, 3.00]
NYHA = III (%)	8 (88.9)

IAMCEST_previo = Sí (%)	1 (10.0)
Angioplastia_previa = Sí (%)	2 (20.0)
Bypass_previo = Sí (%)	1 (10.0)
Angina_previa = Sí (%)	2 (20.0)
Dispositivo (%)	
DAI	2 (20.0)
DAI-TRC	4 (40.0)
MP-TRC	1 (10.0)
NO	3 (30.0)
Ritmo (%)	
Estimulado	1 (10.0)
Fibrilación auricular	3 (30.0)
Sinusal	6 (60.0)
Glucosa_mg/dl (media (DE))	107.10 (24.27)
Urea_mg/dl (media (DE))	57.70 (24.24)
Creatinina_mg/dl (media (DE))	1.23 (0.27)
Na_mEq/L (media (DE))	136.70 (5.91)
K_mEq/L (media (DE))	4.10 (0.61)
TropT_HS (mediana [IQR])	26.00 [16.50, 45.50]
NTproBNP (mediana [IQR])	3880.00 [2138.25, 5838.25]
TGC (media (DE))	101.56 (72.71)
Colest_total (media (DE))	123.22 (41.84)
LDL (media (DE))	65.33 (22.73)
HDL (media (DE))	36.22 (17.49)
GOT (media (DE))	23.60 (10.68)
GPT (media (DE))	32.30 (25.25)
GGT (mediana [IQR])	52.00 [33.75, 71.00]
Hb (media (DE))	12.38 (2.40)
Hematíes (media (DE))	4.46 (0.72)
Leucocitos (media (DE))	6.93 (1.69)
Plaquetas (media (DE))	169.70 (47.43)
FEVI (media (DE))	28.03 (14.55)
SIV_cm (media (DE))	1.00 (0.20)
PPVI_cm (media (DE))	1.00 (0.26)
DVI_cm (media (DE))	5.72 (2.10)
AI_cm (media (DE))	5.26 (1.19)
MasaVI_g (media (DE))	295.54 (109.46)
VTD_ml (media (DE))	224.36 (134.02)
VTS_ml (media (DE))	169.55 (111.09)
TAPSE_cm (media (DE))	1.60 (0.36)
Éxitus = SI (%)	2 (20.0)
Traspl_CAR = SI (%)	3 (30.0)
AD_mmHg (media (DE))	10.86 (5.76)
AP_mmHg (media (DE))	31.67 (12.07)
PCP (media (DE))	18.80 (7.69)
GTP (media (DE))	16.67 (9.89)
GC (media (DE))	3.75 (0.77)

IC (media (DE))	1.93 (0.42)
RVP_U_Wood (media (DE))	3.24 (1.97)

Los datos se expresan como número (%), media  $\pm$  DE, mediana [percentil 25, percentil 75].

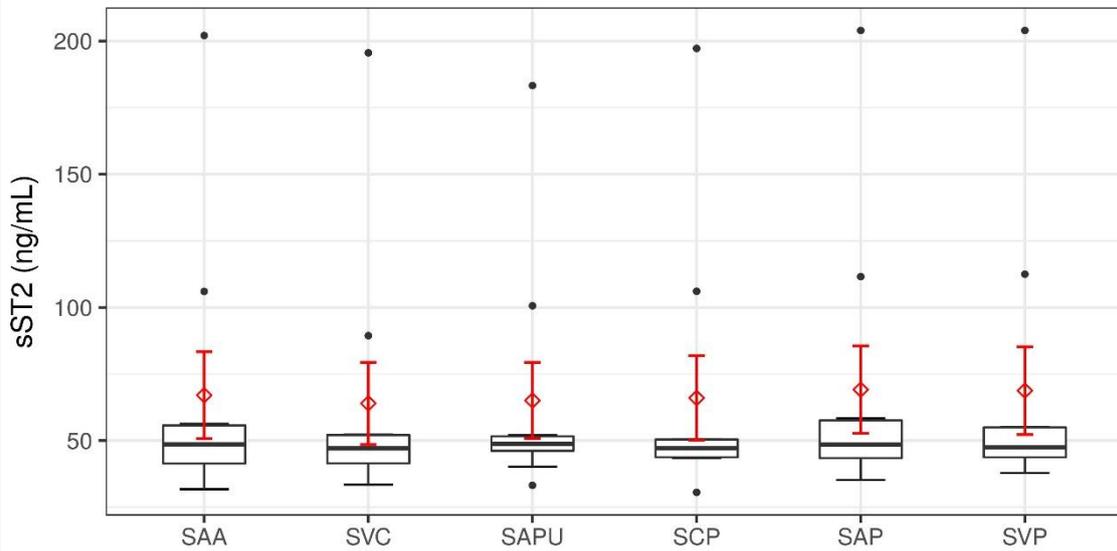
El 60% de los pacientes eran hipertensos, el 50% dislipémicos y el 40% diabéticos. El 50% de los pacientes había sido fumador. La etiología de la miocardiopatía dilatada fue idiopática en 7 pacientes, isquémica en 2 y valvular en un paciente. El 70% era portador de un dispositivo (DAI-TRC, MP-TRC o DAI). La FEVI fue de  $28 \pm 15\%$ , con un índice cardiaco de  $1,93 \pm 0,42$  l/min/m<sup>2</sup>, PCP de  $19 \pm 8$  mmHg y gradiente traspulmonar  $17 \pm 10$  mmHg.

Las concentraciones en sangre periférica de biomarcadores fueron: hsTnT mediana 26 (cuartiles: 16,5-45,5), NTproBNP mediana 3.888 pg/ml (cuartiles: 2.138-5.838) y sST2 mediana 47,45 ng/ml (cuartiles: 43,73-54,97).

No hubo diferencias significativas en la concentración de sST2 en los diferentes sitios de extracción de las muestras ( $p > 0,5$ , figura 6).

La concentración de sST2 se correlacionó con la de NT-proBNP ( $r = 0,95$ ,  $p < 0,001$ ) y con el volumen telesistólico ( $r=0,67$ ,  $p=0.034$ ), pero no se correlacionó con ningún parámetro hemodinámico ni otras variables clínicas o ecocardiográficas.

Figura 6: Concentración de sST2 (ng/ml) en cada sitio de extracción en pacientes con ICC avanzada.



Concentración de sST2 (ng/ml) en los diferentes lugares de extracción de las muestras. SAA: sangre arteria aorta, SVC: seno venoso coronario, SAPU: sangre arteria pulmonar, SCP: sangre capilar pulmonar, SAP: sangre arterial periférica, SVP: sangre venosa periférica.

Tabla 6: Concentración de biomarcadores en cada sitio de extracción (pacientes IC).

	SAA	SVC	SAPU	SCP	SAP	SVP	p	signif
n	10	10	10	10	10	10		
ST2 (median [IQR])	48.60 [41.42, 55.69]	47.07 [41.47, 52.12]	48.74 [46.17, 51.62]	47.19 [43.75, 50.43]	48.54 [43.41, 57.61]	47.45 [43.73, 54.97]	0.0219	*
TnT (median [IQR])	23.00 [13.50, 38.00]	25.00 [14.50, 42.75]	23.00 [13.50, 40.25]	24.50 [14.25, 39.75]	25.00 [14.25, 40.75]	24.00 [14.50, 41.25]	0.0515	.
CKMB (median [IQR])	1.61 [1.35, 1.95]	1.76 [1.62, 2.08]	1.73 [1.29, 1.99]	1.77 [1.30, 1.88]	1.65 [1.33, 2.11]	1.74 [1.22, 2.05]	0.629	
pBNP (median [IQR])	3977.50 [1924.50, 5642.25]	4200.00 [1982.50, 4910.00]	3675.50 [1907.25, 5293.00]	3910.00 [1909.75, 5720.00]	4114.00 [1966.75, 5654.75]	4179.50 [1871.75, 5392.75]	0.494	

Concentración de biomarcadores en cada sitio de extracción. SAA: sangre arterial aórtica (raíz aórtica); SVC: seno venoso coronario; SAPU: sangre arteria pulmonar; SCP: sangre capilar pulmonar; SAP: sangre arterial periférica; SVP: sangre venosa periférica.

Los datos se expresan como mediana [IQR] (rango intercuartílico)

Se utilizó la prueba de Friedman para contrastar las diferencias generales por sitio. En casos significativos, se realizó un análisis de comparación múltiple por pares (prueba de Wilcoxon) con corrección de Bonferroni-Holm.

### 10.3 Producción pulmonar de sST2 en la insuficiencia cardiaca:

#### 10.3.1 Expresión de sST2 extracardiaca en un modelo de IC isquémica.

Las ratas del modelo de infarto experimental, después del IAM y el desarrollo de IC, mostraron un aumento en el peso del corazón, el hígado y los pulmones, en comparación con el grupo control. El examen ecocardiográfico, realizado inmediatamente antes del sacrificio, mostró remodelado cardíaco adverso y disfunción sistólica del ventrículo izquierdo en las ratas infartadas en comparación con el grupo control. El análisis descriptivo se muestra en la Tabla 7.

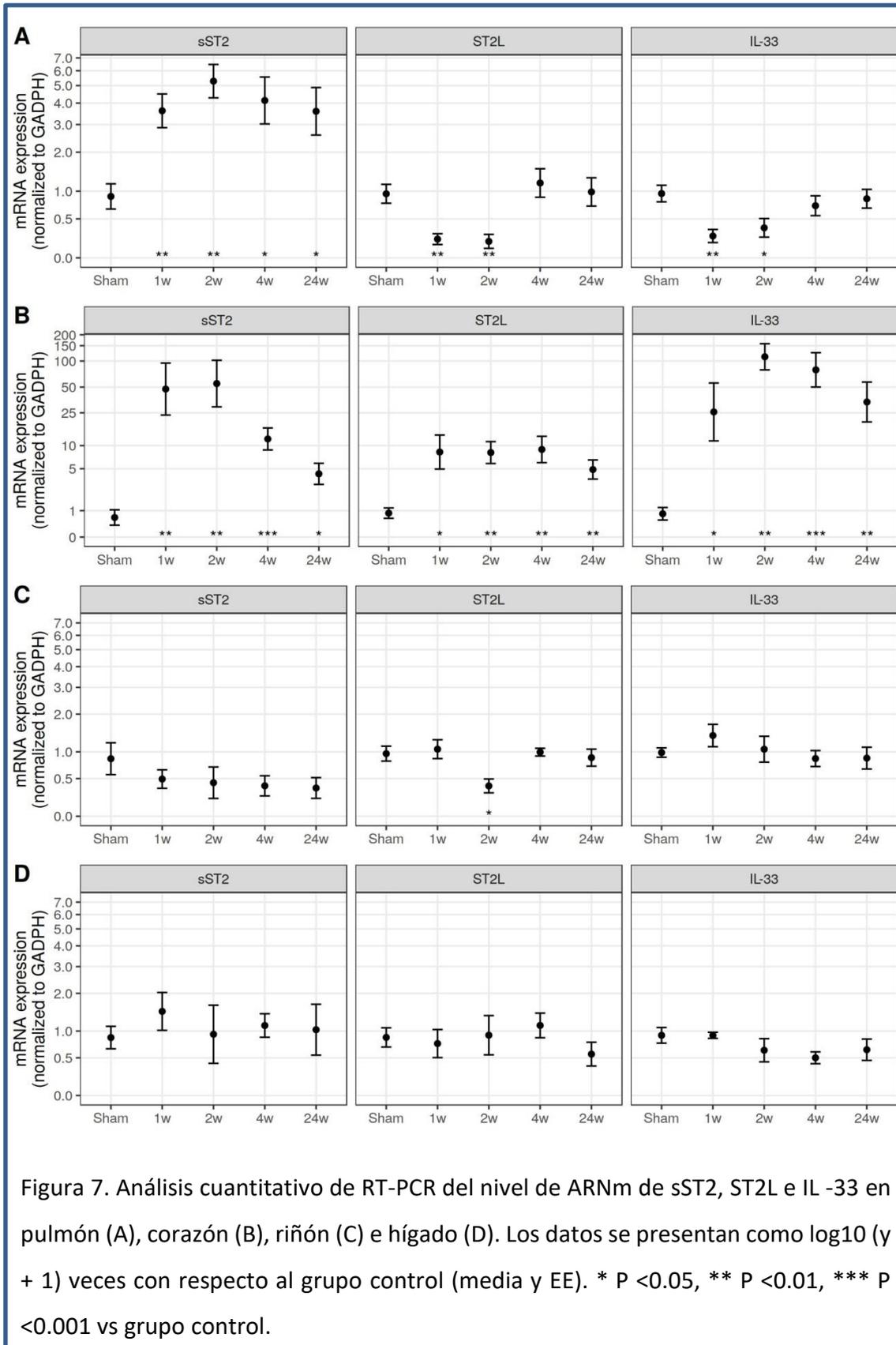
TABLA 7. Parámetros descriptivos en el estudio anatómico y ecocardiográfico.

	Control	1-semana	2-semanas	4-semanas	24-semanas
número	8	10	10	10	10
<b>Anatomía</b>					
PC (g)	311±23	288±30	297±29	317±50	502±67
PCo/PC (mg/g)	2.41±0.20	3.04±0.22***	2.94±0.14**	3.04±0.33***	2.50±0.52
PH/PC (mg/g)	28.80±4.64	33.82±4.45*	30.35±1.45	32.6±2.81*	26.5±2.04
PP/PC (mg/g)	4.42±0.65	6.94±0.93***	6.5±0.82***	5.03±0.43*	4.82±1.73
PR/PC (mg/g)	3.11±0.53	3.22±0.33	3.24±0.41	3.33±0.44	2.91±0.23
<b>Ecocardiografía</b>					
Tamaño IM (%)	0	19±11***	21±10***	22±9***	25±6***
WMSI	1.00±0.00	1.43±0.30***	1.44±0.25***	1.50±0.24***	1.63±0.14***
FEVI (%)	53±10	39±10*	37±11*	34±9**	32±9**
VTDVI (μl)	310±60	450±90**	480±70**	547±130**	720±150***

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. N, número de ratas incluidas en el análisis; PC, peso corporal al sacrificio; PCo, peso corazón; PH, peso hígado; PP, peso pulmón; PR, peso riñón; WMSI, índice de motilidad regional; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VTDVI, volumen telediastólico del VI; Tamaño IM medido por ecocardiografía como porcentaje de segmentos acinéticos o discinéticos. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 vs. Grupo control.

El nivel de expresión de ARNm de IL-33, sST2 y ST2L se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en corazón, pulmón, riñón e hígado (Figura 7). En los pulmones (panel A), la expresión de ARNm de sST2 fue significativamente mayor durante la primera semana después del IAM ( $P = 0,004$ ) y se mantuvo estable hasta 24 semanas después del IM; por el contrario, la expresión de ARNm de IL-33 y ST2L en los pulmones disminuyó de forma aguda 1 semana después del IAM y volvió a niveles control después de 4 semanas. En el miocardio (panel B), se incrementó la expresión de ARNm de todas las moléculas relacionadas (sST2, ST2L e IL-33). Por lo tanto, ST2L/IL-33 mostraron un patrón diferente en respuesta al IAM entre los pulmones (disminución) y el miocardio (aumento).

Estos resultados se confirmaron en el análisis de proteínas (Figura 8). En consecuencia, la expresión de sST2 se correlacionó con ST2L de manera opuesta en pulmón y corazón: inversamente en pulmones ( $\rho = -0,58$ ;  $P < 0,001$ ) y positivamente en corazón ( $\rho = 0,59$ ;  $P < 0,001$ ). La respuesta de ST2L se correlacionó fuertemente con la respuesta de IL-33 en corazón ( $\rho = 0,77$ ;  $P < 0,001$ ) o pulmón ( $\rho = 0,93$ ;  $P < 0,001$ ). A diferencia de los pulmones y el corazón, no se encontraron cambios o correlaciones significativas en el riñón y el hígado (Figura 7) en la expresión de ARNm de sST2, IL-33 o ST2L, en comparación con el grupo control.



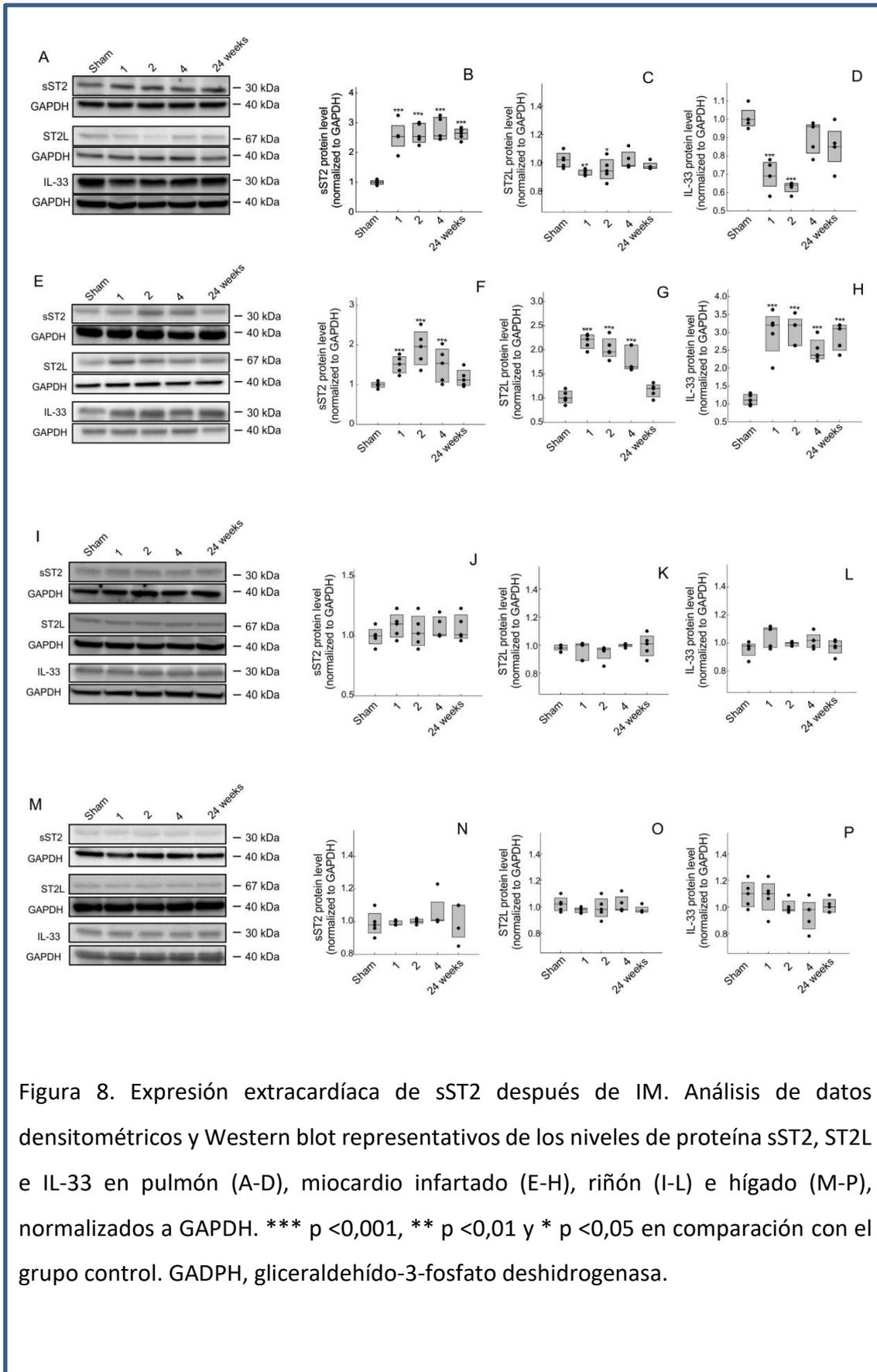
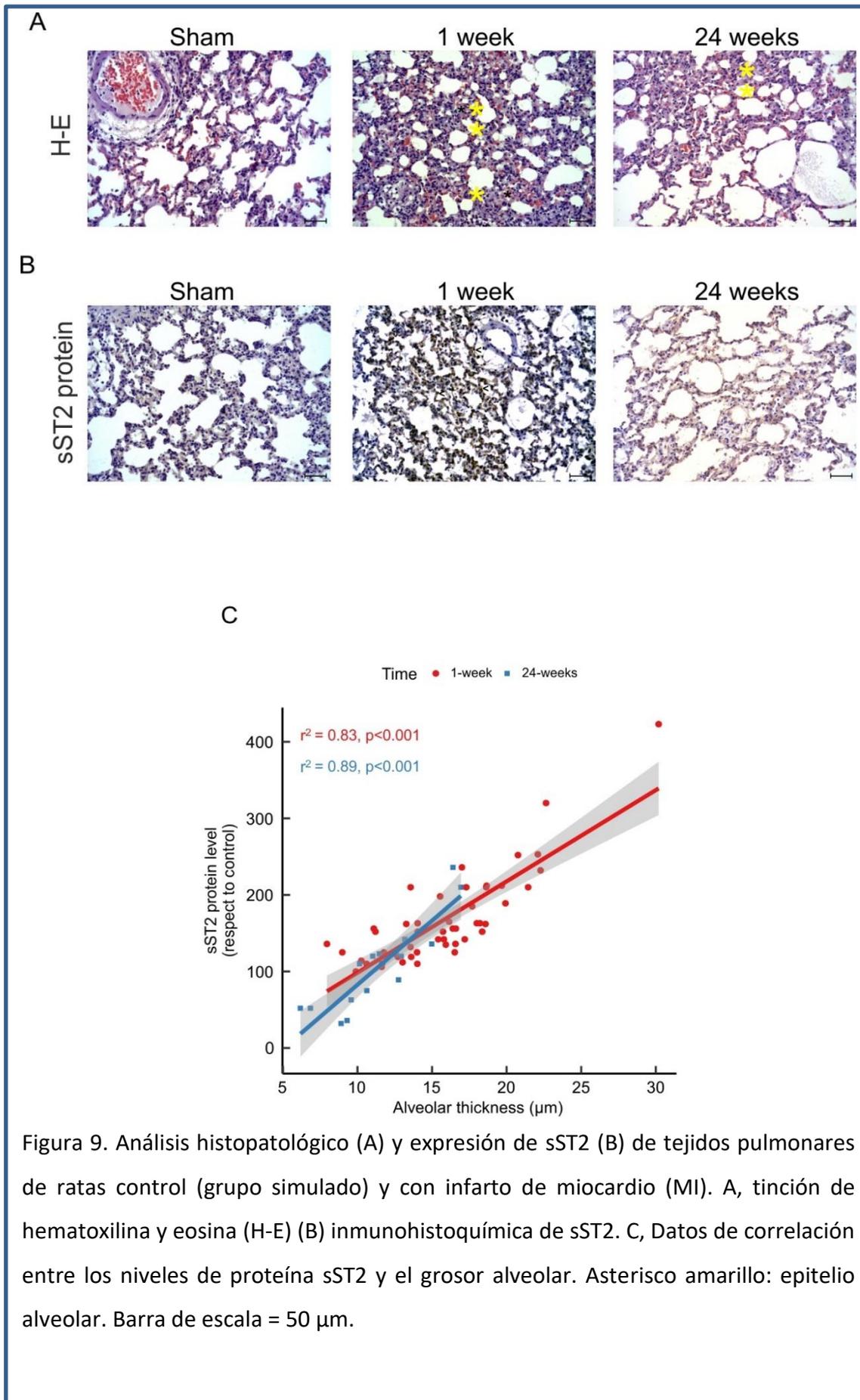


Figura 8. Expresión extracardíaca de sST2 después de IM. Análisis de datos densitométricos y Western blot representativos de los niveles de proteína sST2, ST2L e IL-33 en pulmón (A-D), miocardio infartado (E-H), riñón (I-L) e hígado (M-P), normalizados a GAPDH. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 y \* p < 0,05 en comparación con el grupo control. GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

### **10.3.2 Expresión inmunohistoquímica de sST2 en tejido pulmonar.**

El examen histopatológico del tejido pulmonar (Figura 9A) reveló una reducción de los espacios alveolares con aumento del edema parenquimatoso y engrosamiento de la pared alveolar, en comparación con el grupo control (grupo simulado) (Figura 10). Estos cambios patológicos fueron prominentes a la semana y persistieron hasta las 24 semanas desde el IAM. De manera similar, la proteína sST2 se detectó intensamente en el epitelio alveolar en la primera semana y permaneció visible después de 24 semanas del IAM (Figura 9B). Encontramos una correlación positiva entre el grosor de la pared alveolar y la proteína sST2 en las semanas 1 y 24 ( $\rho = 0,83$ ,  $P < 0,001$ ;  $\rho = 0,89$ ,  $P < 0,001$ , respectivamente; Figura 9C).



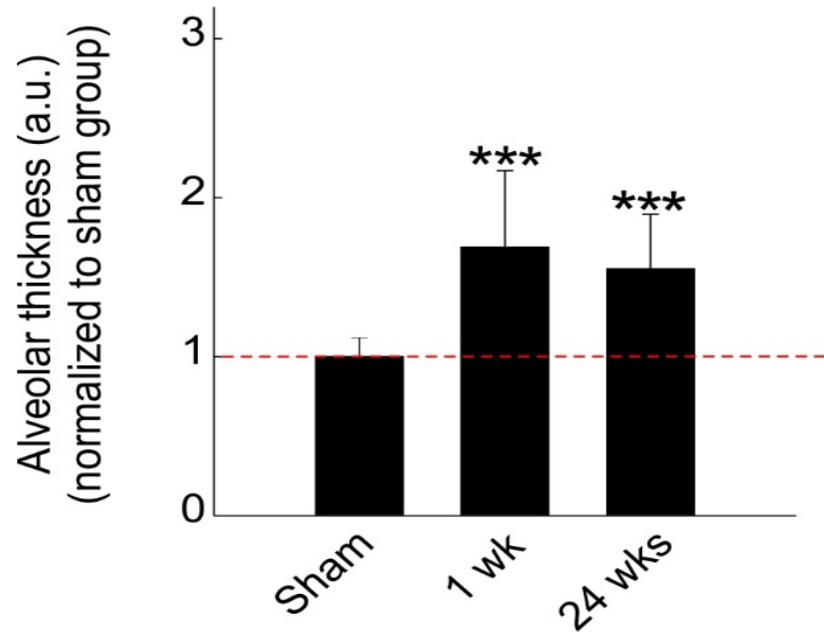


Figura 10. Espesor del epitelio alveolar tras infarto de miocardio. En comparación con el grupo control, el engrosamiento del epitelio alveolar fue significativamente mayor en la semana 1 y permaneció alto después de 24 semanas. \*\*\*  $p < 0,001$  frente al grupo control.

Como se muestra en la Figura 11, la inmunexpresión de sST2 se detectó intensamente en los neumocitos alveolares epiteliales a la semana 1 y persistió después de 24 semanas (paneles A a C, asteriscos rojos). Además, se observó una expresión débil de sST2 en una pequeña población de macrófagos positivos para el parénquima (flechas verdes). Imágenes adicionales representativas y detalladas del epitelio alveolar y neutrófilos polimorfonucleares parenquimatosos se incluyen como Figura 12. No se pudo detectar expresión de sST2 en estructuras bronquiales (incluyendo epitelio y células de músculo liso), vasos (incluyendo endotelio, células de músculo liso y células de fibroblastos), tejido linfoide asociado a mucosa o neutrófilos polimorfonucleares (flechas amarillas; Figura 11, paneles D a I).

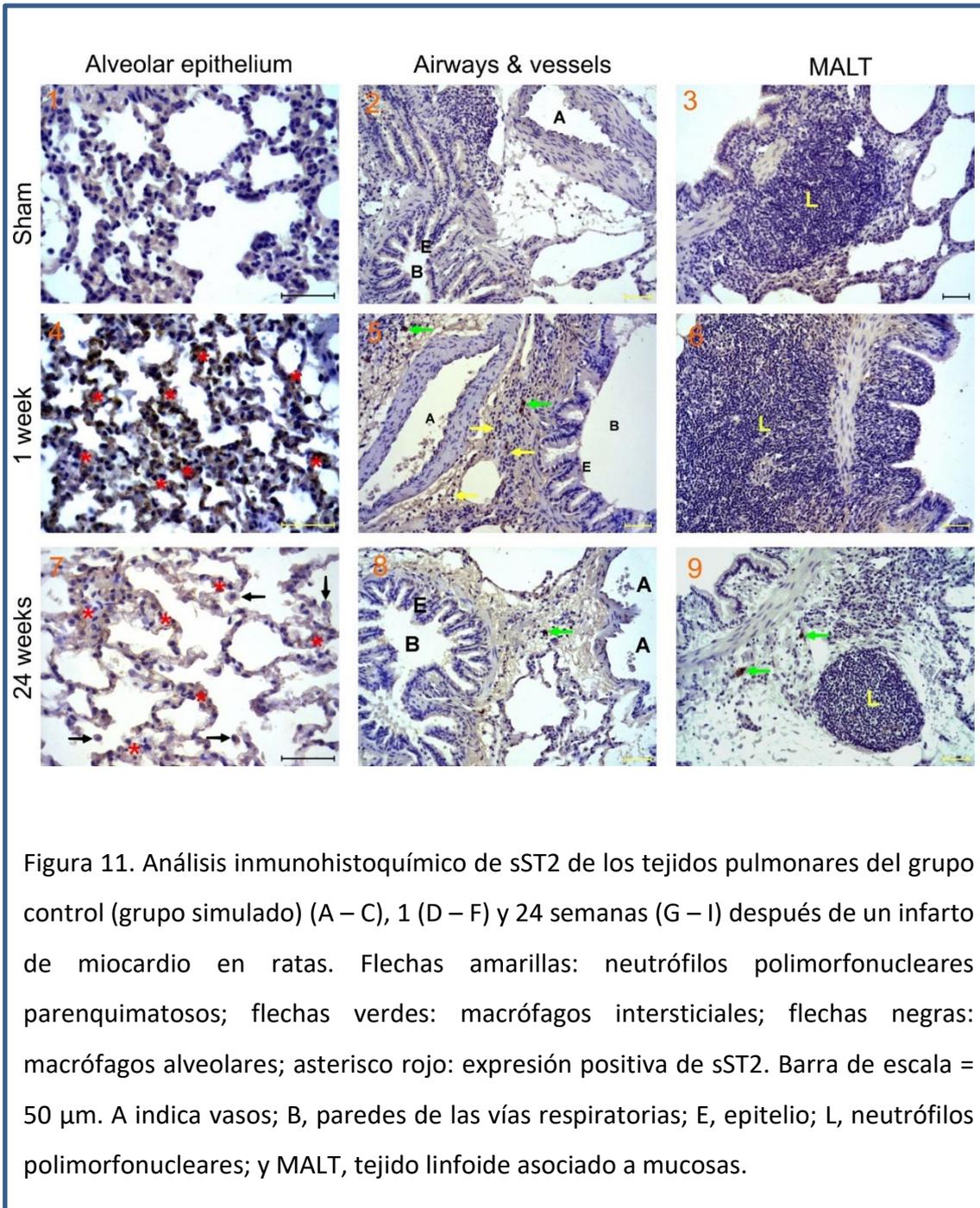


Figura 11. Análisis inmunohistoquímico de sST2 de los tejidos pulmonares del grupo control (grupo simulado) (A – C), 1 (D – F) y 24 semanas (G – I) después de un infarto de miocardio en ratas. Flechas amarillas: neutrófilos polimorfonucleares parenquimatosos; flechas verdes: macrófagos intersticiales; flechas negras: macrófagos alveolares; asterisco rojo: expresión positiva de sST2. Barra de escala = 50  $\mu$ m. A indica vasos; B, paredes de las vías respiratorias; E, epitelio; L, neutrófilos polimorfonucleares; y MALT, tejido linfoide asociado a mucosas.

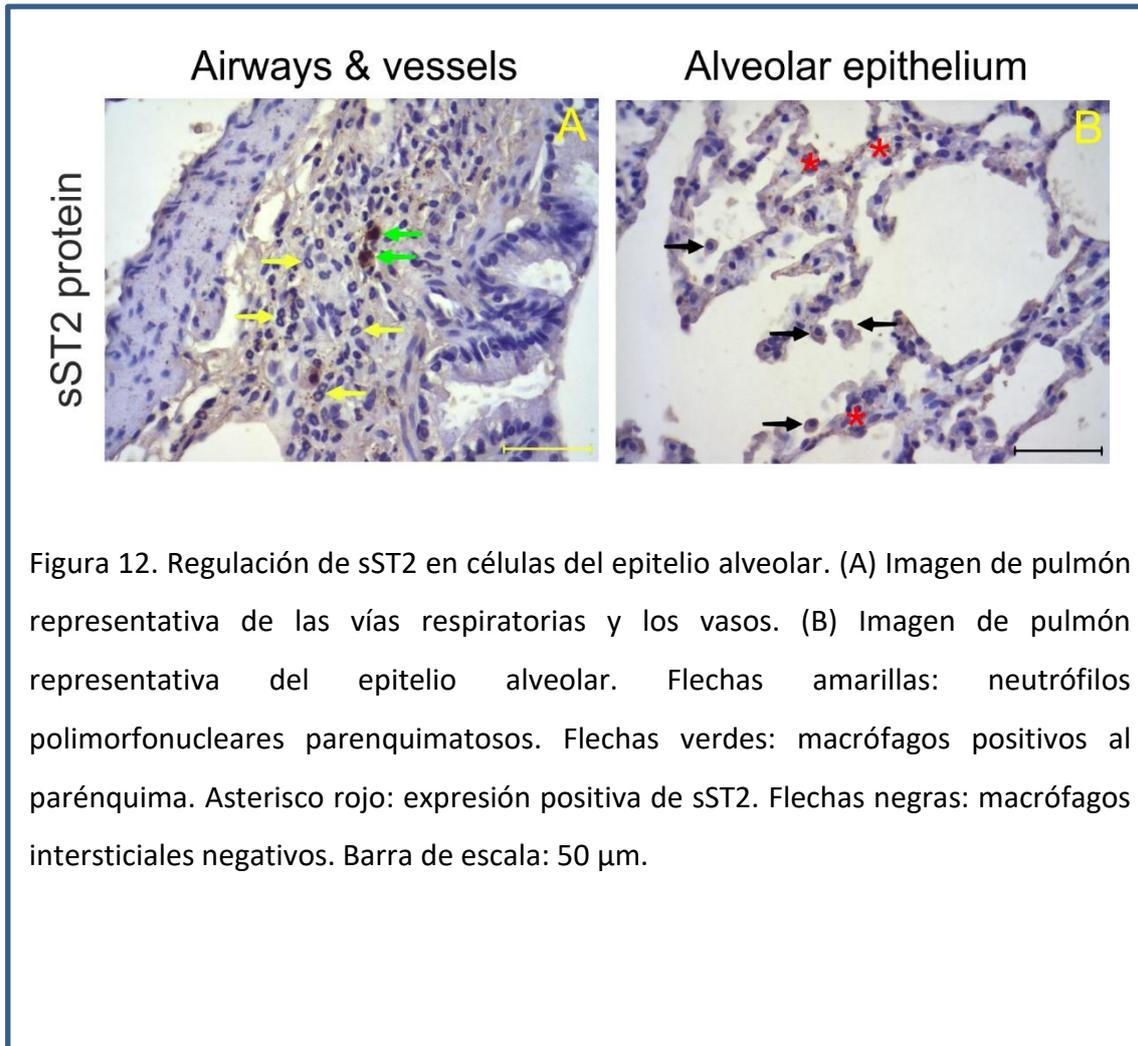
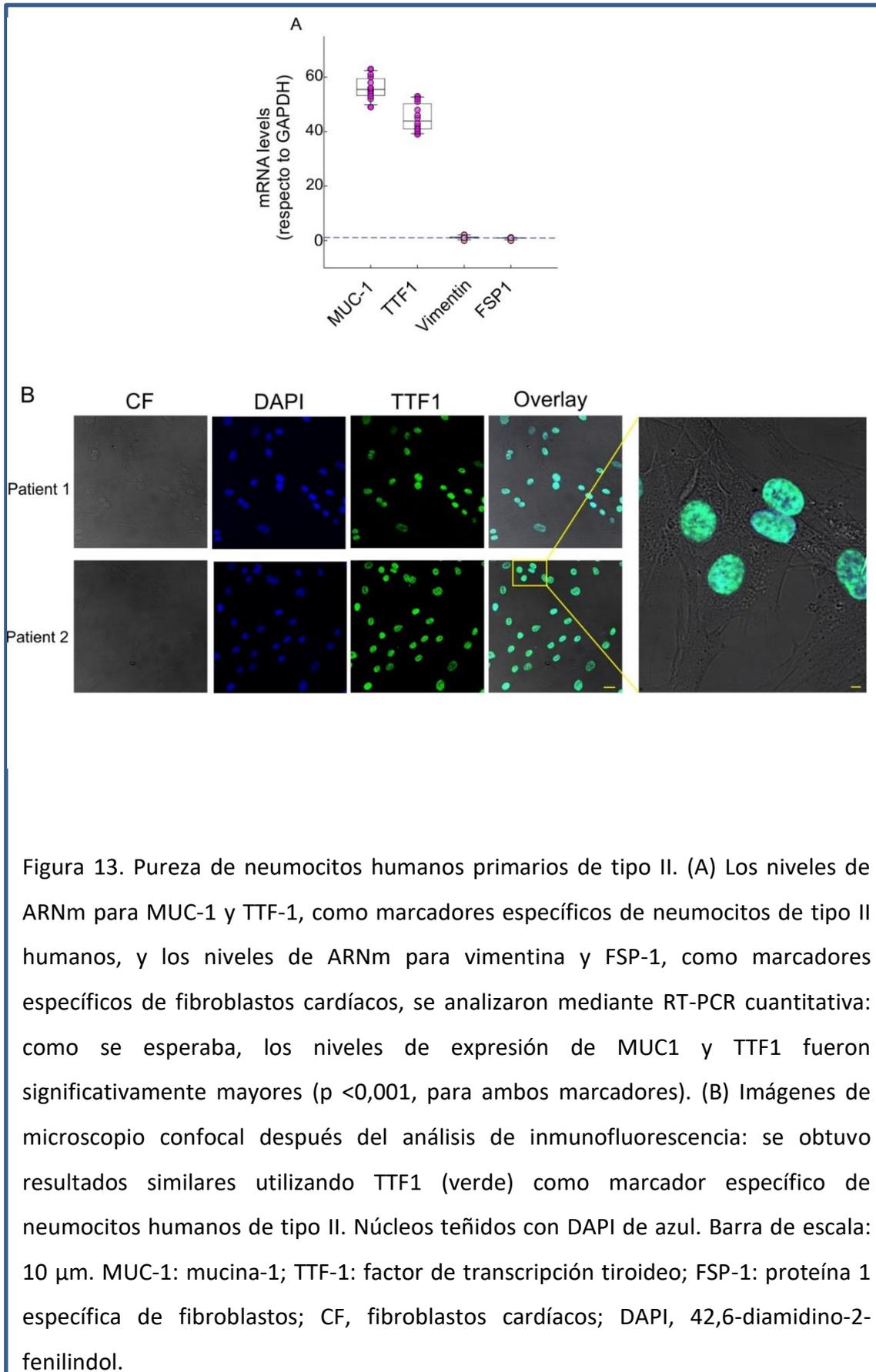


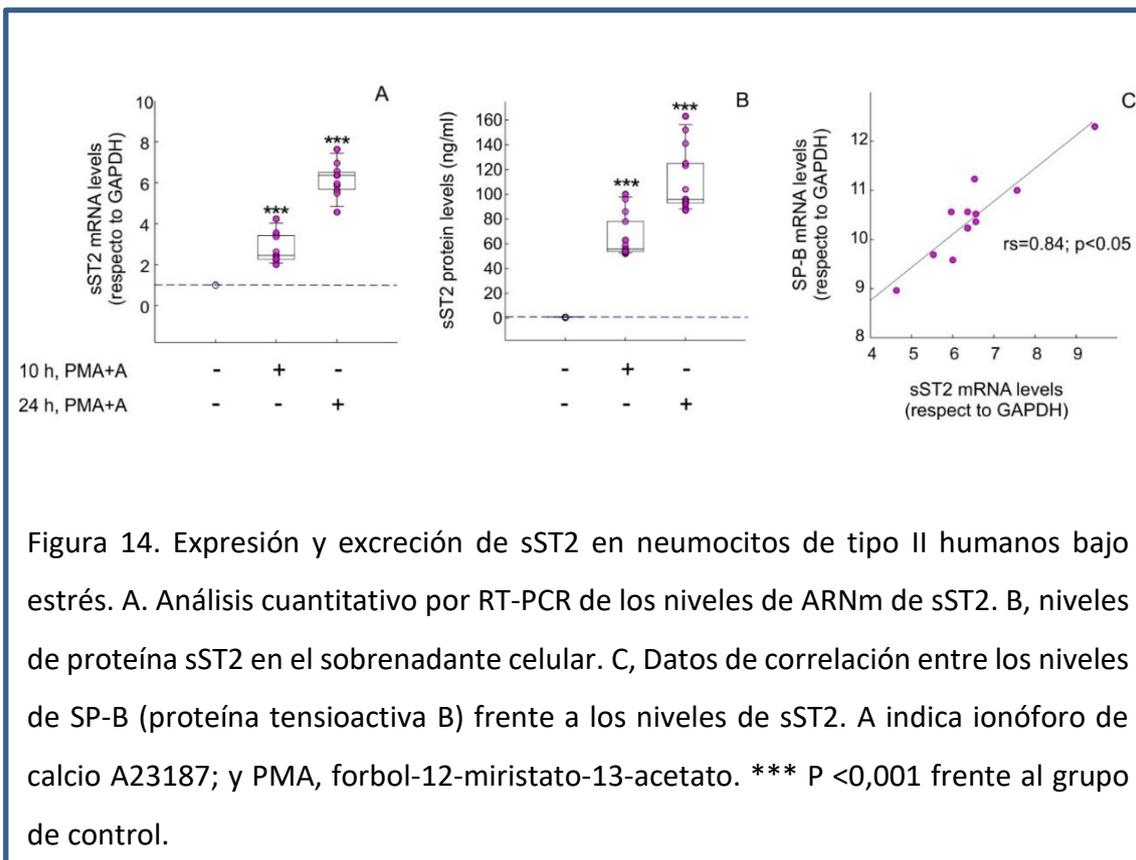
Figura 12. Regulación de sST2 en células del epitelio alveolar. (A) Imagen de pulmón representativa de las vías respiratorias y los vasos. (B) Imagen de pulmón representativa del epitelio alveolar. Flechas amarillas: neutrófilos polimorfonucleares parenquimatosos. Flechas verdes: macrófagos positivos al parénquima. Asterisco rojo: expresión positiva de sST2. Flechas negras: macrófagos intersticiales negativos. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### 10.3.3 Neumocitos humanos de tipo II expresan sST2 bajo estrés.

Obtuvimos fracciones de células primarias de neumocitos de tipo II humano y su pureza se confirmó en experimentos adicionales (Figura 13).



Para probar si los neumocitos humanos de tipo II están involucrados en la producción de la isoforma sST2, utilizamos un modelo experimental de estrés biomecánico e hipertrofia por coestimulación con forbol-12-miristato-13-acetato y A23187. Se observó un aumento significativo en la expresión de ARNm de sST2 (Figura 14A) después de 10 y 24 horas de estrés biomecánico, en comparación con el control ( $P < 0,001$ ). Se obtuvieron resultados similares cuando evaluamos la liberación de sST2 en el sobrenadante celular (Figura 14B). Los niveles de expresión de sST2 se correlacionaron positivamente con los de la proteína surfactante pulmonar tipo B ( $\rho = 0,84$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 14C), un marcador de daño alveolar y neumocítico.



#### 10.3.4 sST2 en aspirado bronquial.

Obtuvimos aspirados bronquiales y suero en el momento de la intubación endotraqueal en pacientes con edema agudo de pulmón cardiogénico (n = 12), bronconeumonía grave (n = 9) y trastornos neurológicos (n = 8). El sST2 se midió en suero a una concentración mediana de 297 (rango intercuartílico [IQR], 119–342) ng/mL y en los broncoaspirados a una concentración mediana de 7.0 (IQR, 2.9–128.8) ng/mL; se encontró una correlación significativa entre las concentraciones en ambos lugares ( $\rho = 0.50$ ;  $P = 0.006$ ). La Figura 15 muestra las concentraciones de sST2 en aspirado bronquial (panel A) y suero (panel B) según la patogénesis. Las concentraciones séricas de sST2 no difirieron entre pacientes con insuficiencia cardíaca aguda y causas no cardíacas; sin embargo, las concentraciones de sST2 en los aspirados pulmonares fueron sustancialmente más altas en presencia de edema pulmonar cardiogénico (n = 12; mediana, 228; [IQR, 28,4-324,0] ng / ml) que la bronconeumonía (n = 9; mediana, 5,5 [IQR, 1,6–6,5] ng / mL;  $P < 0,001$ ) o trastornos neurológicos (n = 8; mediana, 2,9 [IQR, 1,7–10,1] ng / mL;  $P < 0,001$ ). La concentración de sST2 en el aspirado bronquial se correlacionó con los niveles séricos de sST2 ( $\rho = 0,71$ ;  $P = 0,008$ ) y parámetros cardíacos (FEVI, péptidos natriuréticos y troponina T), hemodinámicos (presión arterial sistólica) y medidas metabólicas (lactato y lactato deshidrogenasa; Tabla 8).

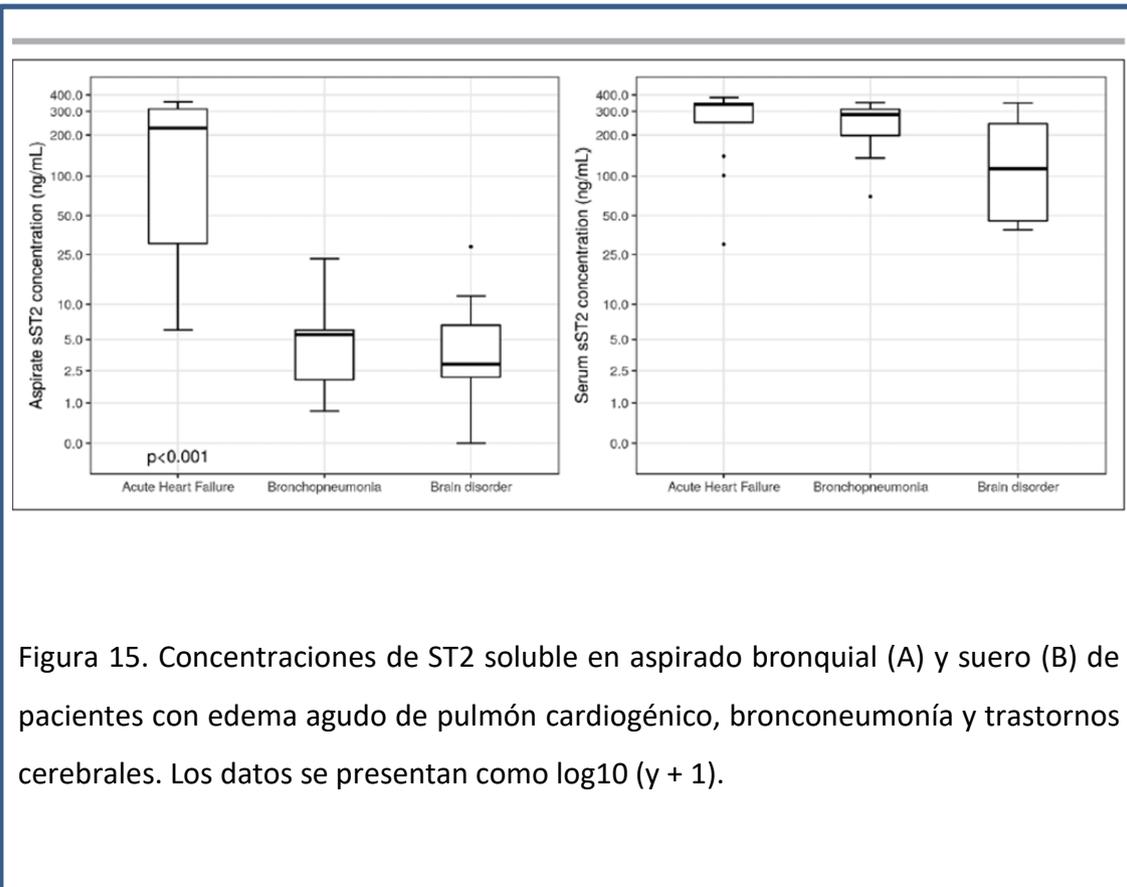


Figura 15. Concentraciones de ST2 soluble en aspirado bronquial (A) y suero (B) de pacientes con edema agudo de pulmón cardiogénico, bronconeumonía y trastornos cerebrales. Los datos se presentan como  $\log_{10}(y + 1)$ .

Tabla 8. Correlaciones de las variables del paciente con las concentraciones de sST2 en aspirado bronquial y suero.

		Correlación de niveles de sST2			
		Aspirado bronquial		Suero	
	Valores	r	p	r	p
FEVI, %	43±13	-0.583	0.02	-0.423	0.12
Edad, years	64±16	-0.363	0.05	-0.395	0.03
Lactato, mmol/L	1.8 (1.13-4.37)	0.481	0.01	0.404	0.03
NT-proBNP, pg/ml	1726 (506-8593)	0.393	0.04	0.150	0.44
hsTnT, pg/ml	36 (26-155)	0.443	0.02	0.043	0.82
Lactato deshidrogenasa, U/L	269 (195-557)	0.414	0.04	0.503	0.009
Presión arterial sistólica, mmHg	117±30	-0.386	0.04	-0.472	0.01
Proteína C reactiva, mg/dl	9.1 (4.6-16.1)	0.059	0.77	0.297	0.12
Frecuencia cardiaca, bpm	93±17	-0.129	0.50	-0.029	0.88
Leucocitos, 10 <sup>3</sup> células/ml	11.1 (8.2-16.9)	-0.187	0.33	0.280	0.14
Creatinina, mg/dL	1.28±0.72	0.028	0.89	-0.254	0.18
Procalcitonina, mg/dl	0.56 (0.20-3.46)	0.229	0.24	0.435	0.02



## **DISCUSIÓN**



## 11. DISCUSIÓN.

### 11.1 Fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM.

El sitio de producción de sST2 representa una brecha en el conocimiento sobre este biomarcador relevante en las enfermedades cardiovasculares y, en particular, en la insuficiencia cardíaca. Este estudio demuestra por primera vez que, a diferencia de los marcadores bien establecidos de necrosis y estrés, el sST2 estaba elevado en la circulación periférica, pero no muestra una liberación a la circulación coronaria ni gradiente trans-cardíaco en el contexto de un IAMCEST.

En estudios clínicos previos, las concentraciones de sST2 en la circulación periférica aumentan dentro de las primeras horas después del inicio de los síntomas en el IAMCEST (25,26,49,60). En nuestro estudio, el sST2 se midió en las primeras 5 horas y las concentraciones de sST2 fueron similares en todos los sitios con una mediana de 34,5 pg/ml, reflejando que la mitad de los pacientes estaban por encima del punto de corte pronóstico de 35 pg/ml (44). Por el contrario, el NT-proBNP mostró un gradiente trans-cardíaco leve pero significativo, lo que indica una producción de miocardio incluso cuando las concentraciones estaban dentro del rango normal. La precocidad de las muestras y la ausencia de insuficiencia cardíaca excluye la presencia de concentraciones más altas de péptidos natriuréticos en el momento de la reperfusión.

Por lo tanto, las concentraciones de sST2 se elevan tempranamente en el entorno de la isquemia y la necrosis miocárdica, pero la fuente puede provenir de órganos distintos del miocardio. Estos resultados están de acuerdo con los publicados en el estudio de Bartunek et al (7). En este estudio, no se encontró gradiente transcárdaco de sST2 en pacientes con IC crónica sometidos a implante de marcapasos biventriculares, en contraste con los péptidos natriuréticos que sí mostraron un gradiente cardíaco. Bartunek et al demostraron que las células endoteliales arteriales y venosas tenían la capacidad de secretar la proteína ST2 y plantearon la hipótesis de que la carga diastólica es el principal determinante de la secreción de sST2 en la circulación. Demyanetis et al (8) también encontraron expresión de ST2 en células endoteliales, incluidas las de

arterias coronarias y la microvasculatura miocárdica. Los resultados de nuestro estudio no apoyan una producción coronaria o miocárdica significativa. Además, el hecho de que no haya elevación de péptidos natriuréticos en nuestra población también está en contra de que la carga diastólica es el principal determinante de la producción de ST2 en el IAMCEST. La participación de sST2 en diferentes respuestas inflamatorias (3) (47), podría explicar la elevación precoz y sistémica de sST2 en IAMCEST. De hecho, se sabe que la secreción de ST2 es estimulada por varias citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral) en las células endoteliales arteriales y venosas (7),

Entre las limitaciones de nuestro estudio, la vida media desconocida de la sST2 y la posición del catéter podrían influir en los resultados; aunque no encontramos signos de un gradiente transcárdico, es posible que existan diferencias sutiles que podrían quedar ocultas debido a la naturaleza del diseño de nuestro estudio. Aunque la secreción autocrina y paracrina de ST2 procedente de tejidos es importante en los procesos de reparación después de infarto (56), nuestros resultados actuales sugieren que la mayoría de la sST2 se secreta en órganos distintos del corazón.

Otro hallazgo que merece ser discutido es la correlación entre los niveles de sST2 en el momento de la reperfusión y la FEVI al alta. Trabajos anteriores han sugerido que el sST2 predice tanto la insuficiencia cardíaca como el remodelado en el seguimiento tras el IAM(9,61). En el trabajo de Weir et al, los niveles de sST2 medidos de forma precoz no sólo se correlacionaron con el tamaño del infarto sino que, además, predijeron la recuperación funcional y el remodelado del VI a medio plazo (9). De forma similar, la correlación entre los niveles de sST2 medidos en la reperfusión y la FEVI en el momento del alta apoya una participación fisiopatológica en la recuperación tras el IM. Aunque la producción de sST2 no es cardíaca, tanto la sST2 como otras señales inflamatorias han sido implicadas repetidamente en los procesos de reparación tras el IAM, en particular en la supervivencia celular y en las respuestas profibróticas (5,62).

En conclusión, este estudio muestra por primera vez que no hay una liberación cardíaca de sST2 en el contexto del IAMCEST. Sin embargo, los niveles de sST2 están elevados en una fase temprana en la circulación y la señalización de ST2 parece participar en el remodelado cardíaco tras el IM. Por lo tanto, son necesarios esfuerzos adicionales para

regular esta respuesta extracardíaca y evaluar su impacto en los procesos de reparación tras el IM.

En resumen, las concentraciones de sST2 están elevadas precozmente en la circulación de los pacientes que sufren un IAMCEST, pero la ausencia de un gradiente transcárdico apoya la hipótesis de que la mayor parte de la sST2 circulante puede no ser de origen cardíaco. Se necesitan más datos para comprender mejor el sistema de la ST2.

### **11.2 Fuente de producción del sST2 en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica avanzada.**

El sST2 en pacientes con insuficiencia cardíaca se encuentra elevado y sus concentraciones correlacionan con un peor pronóstico y mayor mortalidad. Su fuente de producción no está aclarada y, aunque se ha propuesto que es un marcador cardíaco en respuesta al estrés miocárdico con un papel fisiopatológico, también se conoce su papel inflamatorio y en la respuesta inmune, y se ha sugerido su producción por las células endoteliales arteriales y venosas. En nuestro estudio las concentraciones de sST2 en la circulación periférica estaban por encima del límite pronóstico de 35 pg / ml en todos los pacientes (mediana 47,45 ng/ml (cuartiles: 43,73-54,97)), y fueron similares en todos los lugares de extracción.

El sST2 no muestra gradiente de producción cardíaca, ni correlación significativa con parámetros hemodinámicos, por lo que estos resultados apoyan que su fuente de producción se sitúa a nivel extracárdico. La falta de un gradiente transcárdico apoya la hipótesis de que la mayoría de la sST2 puede ser de origen no cardíaco. Son necesarios más estudios para comprender mejor el sistema ST2.

Estos resultados están de acuerdo con los publicados en el estudio de Bartunek et al (7). En este estudio, no se encontró gradiente transcárdico de sST2 en pacientes con IC crónica sometidos a implante de marcapasos biventriculares. Bartunek et al demostraron que las células endoteliales arteriales y venosas tenían la capacidad de secretar la proteína ST2 y plantearon la hipótesis de que la carga diastólica es el principal

determinante de la secreción de sST2 en la circulación. Demyanets et al (8) también encontraron expresión de ST2 en células endoteliales, incluidas las de arterias coronarias y la microvasculatura miocárdica. Los resultados de nuestro estudio no apoyan una producción coronaria o miocárdica.

### **11.3 Los pulmones son una fuente significativa de sST2 en el contexto de la IC.**

En este trabajo, hemos tratado de examinar la siguiente cuestión: si los pulmones representan una fuente significativa de producción de sST2 en las enfermedades cardíacas. Encontramos en un modelo experimental de IAM e IC isquémica, una producción pulmonar sustancial y sostenida de sST2, donde las células epiteliales alveolares representaban una fuente relevante en respuesta al estrés mecánico. La relevancia de los pulmones en la producción de sST2 en las enfermedades cardíacas se confirmó después en el aspirado bronquial obtenido de pacientes con edema pulmonar cardiogénico.

La presencia de concentraciones elevadas de sST2 en la circulación identifica un peor pronóstico en las enfermedades cardíacas (25,48). Se ha descrito que la señalización ST2L/IL-33 intacta y de funcionamiento normal en el cardiomiocito es inducida biomecánicamente y es cardioprotectora (25), mientras que la forma soluble y circulante de ST2 se ha identificado como un receptor señuelo de la IL-33 capaz de anular la acción protectora de la unión ST2L/IL-33. En este escenario, la fuente de sST2 en las enfermedades cardiovasculares no se ha aclarado, pero varios grupos, incluido el nuestro, han sugerido una producción extracardíaca relevante (7,8,63–65). Aunque la expresión miocárdica de la sST2 está bien documentada, la relación con las concentraciones circulantes es más difícil de alcanzar.

Bartunek et al (7) fueron los primeros en sugerir la producción no miocárdica de la proteína sST2, y luego Demyanets et al (8) propusieron también a los endotelios como fuente principal de la proteína ST2. Los estudios invasivos que incluyen la toma de

muestras del seno coronario no han demostrado la existencia de un gradiente transcardíaco de sST2 (7,63,66). La producción extracardiaca también está respaldada por el papel fisiológico del ST2 como mediador de la inflamación y la inmunidad en varias enfermedades. De hecho, el sST2 modula la actividad de la IL-33 durante las respuestas inflamatorias, y ambas están elevadas en pacientes con exacerbaciones de enfermedades alérgicas y autoinmunes. En un modelo de asma en ratones, el sST2 se producía predominantemente en los pulmones y leucocitos (67), y, en ratones con anafilaxia, el sST2 era liberado por los mastocitos, tanto los derivados de la sangre periférica como los de la médula ósea (68). Además, el sST2 circulante está fuertemente potenciado en otras enfermedades asociadas a la inflamación, como la sepsis, los traumatismos, los accidentes cerebrovasculares o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (69–73).

En este trabajo, utilizamos por primera vez un modelo animal de IC isquémica tras un IAM. En este modelo experimental, ya habíamos demostrado que la IL-33 y la sST2 estaban reguladas al alza en el miocardio infartado durante la primera semana después del IAM (5,56). En nuestro trabajo hemos observado que el hígado y el riñón no muestran expresión de sST2, pero los pulmones expresaban un aumento temprano e intenso de sST2, tanto en términos de niveles de ARN como de expresión proteica. Nuestros resultados coinciden con los de Chen et al, (64) que descubrieron que los niveles de ARNm del sST2 eran mayores en los pulmones entre los órganos vitales de los ratones con constricción aórtica transversal. Estos resultados también están de acuerdo con Mildner et al, (65) que analizaron un conjunto de cDNAs específicos de órganos y encontraron la mayor expresión de sST2 en los epitelios alveolares y bronquiales y propusieron el tejido pulmonar como fuente principal de sST2. Nuestros datos amplían estas observaciones al estado de enfermedad más relevante del IAM y la IC, donde las pruebas de sST2 se aplican más comúnmente; también mostramos que los epitelios alveolares son una fuente principal de sST2. Curiosamente, encontramos una asociación entre el aumento del grosor del alveolo y la regulación al alza de la sST2, lo que sugiere una relación entre la gravedad del edema pulmonar y la producción de sST2. Estos resultados sugieren que el sST2 puede aumentar en el pulmón como consecuencia de la tensión alveolar tras el edema pulmonar. Para respaldar este argumento, utilizamos un

modelo experimental de estrés mediante la coestimulación con el éster de forbol-12-miristato-13-acetato y el ionóforo A23187, que inducen un estrés celular sostenido en el tiempo (59). En este modelo de estrés de neumocitos, encontramos un aumento de la expresión de ARNm de ST2 acompañado de un aumento de la concentración de sST2 en el sobrenadante celular. El aumento de la concentración de sST2 fue paralelo al de la SP-B (proteína surfactante B), un marcador de daño en la barrera alveolar-capilar. De hecho, ambos mostraron una correlación positiva significativa cuando los neumocitos humanos tipo II fueron sometidos a tensión. Estos resultados apuntan directamente a las células epiteliales alveolares como fuente de producción de sST2 en las enfermedades cardíacas.

La producción coincidente de ARNm y proteína de sST2 junto con una menor expresión de ARNm de ST2L sugiere que la elevación de sST2 es una respuesta inducible resultante del splicing alternativo más que de la escisión proteolítica de ST2L en el pulmón. Además, las respuestas inversas de IL-33/ST2L (disminución en los pulmones y aumento en el miocardio) podrían sugerir diferentes regulaciones y respuestas locales adaptativas en las células epiteliales alveolares (antiinflamatorias) y en los cardiomiocitos (cardioprotectoras).

Entre los pacientes que requerían asistencia ventilatoria en el contexto de una IC aguda y de afecciones agudas no cardíacas (bronconeumonía y accidente cerebrovascular), observamos concentraciones séricas elevadas de sST2, lo que concuerda con el hecho de que el sST2 circulante está elevado en un amplio espectro de enfermedades agudas, (69) incluidas las infecciones pulmonares (70,71), la sepsis y el traumatismo (72) y el accidente cerebrovascular (73). Sin embargo, la presencia de sST2 en el aspirado bronquial difiere significativamente en función de la patogénesis de la enfermedad: mientras que los pacientes con IC aguda presentaban concentraciones elevadas de sST2 en el aspirado bronquial, los que no padecían enfermedades cardíacas no lo hacían. Hasta donde sabemos, no hay informes sistemáticos previos sobre la presencia de sST2 en el líquido bronquial de pacientes con una serie de enfermedades cardíacas y no cardíacas. Aunque podría plantearse la hipótesis de que las concentraciones de sST2 en los aspirados bronquiales representan simplemente la translocación de sST2 en el edema pulmonar, nuestros hallazgos en los modelos experimentales apoyan un papel

activo de este órgano en la producción de ST2. La correlación entre la concentración de sST2 en los aspirados y las medidas hemodinámicas, cardíacas y metabólicas sugiere que una congestión más grave en el contexto de la IC puede dar lugar a la inducción de la expresión pulmonar de ST2. Sin embargo, el escaso número de pacientes y la falta de mediciones directas de las presiones pulmonares mediante cateterismo derecho impiden extraer conclusiones definitivas.

Todavía no está claro en qué medida (si es que hay alguna) el sST2 circulante producido en los pulmones da lugar a alteraciones cardiovasculares. El presente trabajo es un estudio generador de hipótesis, dado que el papel del pulmón en la fisiopatología de la sST2 en la enfermedad cardíaca no se ha propuesto previamente (figura 16). La principal limitación del presente trabajo es que sólo se estudiaron las asociaciones y, por tanto, no se puede establecer la causalidad. Son necesarios más estudios para comprender mejor cómo podría aprovecharse la modulación de la expresión pulmonar de ST2 como posible vía terapéutica en los pacientes con IC.

En conclusión, el presente estudio sugiere que los pulmones son una fuente relevante de sST2 en la IC y podrían desempeñar un papel activo en la fisiopatología de la respuesta de ST2. Son necesarios más estudios para dilucidar esta respuesta y sus consecuencias.

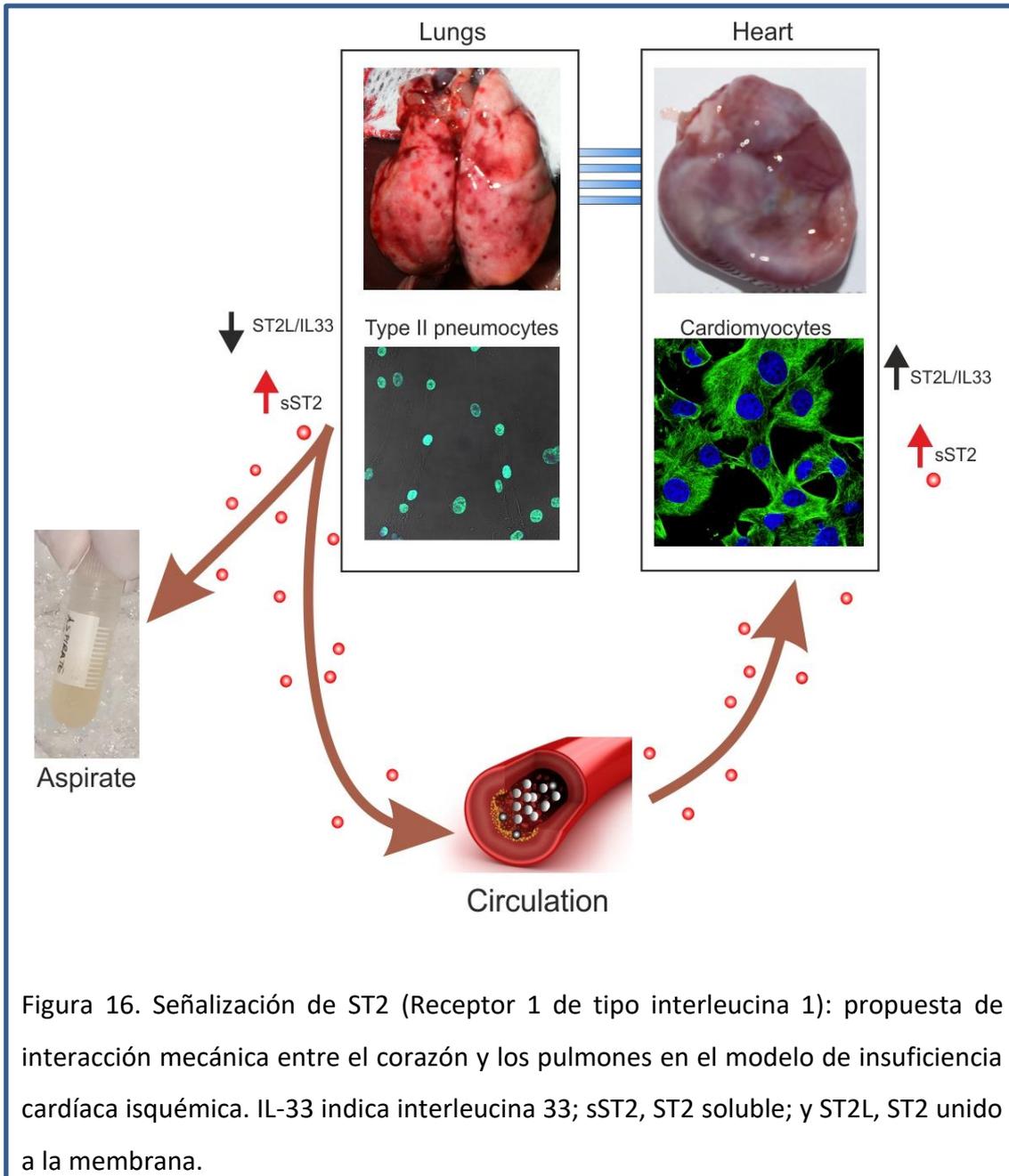


Figura 16. Señalización de ST2 (Receptor 1 de tipo interleucina 1): propuesta de interacción mecánica entre el corazón y los pulmones en el modelo de insuficiencia cardíaca isquémica. IL-33 indica interleucina 33; sST2, ST2 soluble; y ST2L, ST2 unido a la membrana.



## **CONCLUSIONES**



## 12. CONCLUSIONES

1. El sST2 se eleva tempranamente en la circulación de pacientes con IAMCEST, de forma similar a los marcadores bien establecidos de necrosis (troponinas y CK-MB) y estrés (NTproBNP).
2. El sST2 no muestra una liberación a la circulación coronaria ni un gradiente transcardiaco en pacientes con IAMCEST, por lo que podemos deducir que la fuente de producción de sST2 en pacientes con IAMCEST es no cardíaca.
3. En pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada no se observa gradiente de ST2 transcardiaco, por lo que la fuente de producción de sST2 en pacientes con insuficiencia cardíaca es no cardíaca.
4. La producción de sST2 está aumentada en numerosas patologías (pulmonares, cardíacas, traumatismos craneoencefálicos), pero en aquellas de origen cardiovascular este incremento es mucho más notable.
5. En el modelo experimental de infarto en ratas existe una producción pulmonar de sST2, en términos de expresión de ARNm y proteica, pero no en otros tejidos (hígado y riñón).
6. El examen histopatológico del pulmón en ratas infartadas presenta una expresión aumentada de sST2, que coincide temporalmente con los cambios típicos de la congestión pulmonar (edema parenquimatoso y engrosamiento de la pared alveolar).
7. La inmunohistoquímica nos permite confirmar que la producción de sST2 ocurre en las células del epitelio alveolar y no en otros tipos celulares.
8. Los neumocitos humanos de tipo II bajo estrés mecánico aumentan la expresión de sST2 y de ARNm de la propia molécula, lo cual se correlaciona con el grado de daño alveolar y neumocítico.
9. En aspirados bronquiales de pacientes sometidos a ventilación mecánica, las concentraciones de sST2 fueron más altas en pacientes con edema pulmonar cardiogénico y se correlacionaron con parámetros cardíacos (FEVI), hemodinámicos (TAS), y bioquímicos (péptidos natriuréticos y troponina T).
10. Por todo ello, los pulmones son una fuente relevante de sST2 en la IC.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *The EMBO journal*. 1994 Mar 1;13(5).
2. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 Nov;23(5).
3. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nature reviews Drug discovery*. 2008 Oct;7(10).
4. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Jun;117(6).
5. Sánchez-Más J, Lax A, Asensio-López MDC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Santarelli G, et al. Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: correlation with cardiac remodelling markers. *European journal of clinical investigation*. 2014 Jul;44(7).
6. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circulation Heart failure*. 2009 Nov;2(6).
7. Bartunek J, Delrue L, van Durme F, Muller O, Casselman F, de Wiest B, et al. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 Dec 16;52(25).
8. Demyanets S, Kaun C, Pentz R, Krychtiuk KA, Rauscher S, Pfaffenberger S, et al. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013 Jul;60.
9. Weir RAP, Miller AM, Murphy GEJ, Clements S, Steedman T, Connell JMC, et al. Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010 Jan 19;55(3).

10. Kohli P, Bonaca MP, Kakkar R, Kudinova AY, Scirica BM, Sabatine MS, et al. Role of ST2 in non-ST-elevation acute coronary syndrome in the MERLIN-TIMI 36 trial. *Clinical chemistry*. 2012 Jan;58(1).
11. Ojji DB, Opie LH, Lecour S, Lacerda L, Adeyemi OM, Sliwa K. The effect of left ventricular remodelling on soluble ST2 in a cohort of hypertensive subjects. *Journal of human hypertension*. 2014 Jul;28(7).
12. Shah R v., Chen-Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RRJ, Januzzi JL. Serum Levels of the Interleukin-1 Receptor Family Member ST2, Cardiac Structure and Function, and Long-Term Mortality in Patients With Acute Dyspnea. *Circulation: Heart Failure*. 2009 Jul;2(4).
13. Zilinski JL, Shah R v, Gaggin HK, Gantzer M lou, Wang TJ, Januzzi JL. Measurement of multiple biomarkers in advanced stage heart failure patients treated with pulmonary artery catheter guided therapy. *Critical care (London, England)*. 2012 Jul 25;16(4).
14. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL. Characteristics of the Novel Interleukin Family Biomarker ST2 in Patients With Acute Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 Oct;52(18).
15. Dieplinger B, Gegenhuber A, Kaar G, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. Prognostic value of established and novel biomarkers in patients with shortness of breath attending an emergency department. *Clinical Biochemistry*. 2010 Jun;43(9).
16. Januzzi JL, Peacock WF, Maisel AS, Chae CU, Jesse RL, Baggish AL, et al. Measurement of the Interleukin Family Member ST2 in Patients With Acute Dyspnea. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Aug;50(7).
17. Lasso J, Gayat E, Mueller C, Peacock WF, Spinar J, Harjola V-P, et al. Incremental value of biomarkers to clinical variables for mortality prediction in acutely decompensated heart failure: The Multinational Observational Cohort on Acute Heart Failure (MOCA) study. *International Journal of Cardiology*. 2013 Oct;168(3).
18. Manzano-Fernández S, Mueller T, Pascual-Figal D, Truong QA, Januzzi JL. Usefulness of soluble concentrations of interleukin family member ST2 as predictor of mortality in patients with acutely decompensated heart failure relative to left ventricular ejection fraction. *The American journal of cardiology*. 2011 Jan 15;107(2).
19. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernández S, Boronat M, Casas T, Garrido IP, Bonaque JC, 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. *European journal of heart failure*. 2011 Jul;13(7).

20. Manzano-Fernández S, Januzzi JL, Pastor-Pérez FJ, Bonaque-González JC, Boronat-García M, Pascual-Figal DA, et al. Serial monitoring of soluble interleukin family member ST2 in patients with acutely decompensated heart failure. *Cardiology*. 2012;122(3).
21. Breidthardt T, Balmelli C, Twerenbold R, Mosimann T, Espinola J, Haaf P, et al. Heart failure therapy-induced early ST2 changes may offer long-term therapy guidance. *Journal of cardiac failure*. 2013 Dec;19(12).
22. Espriella RD la, Bayés-Genis A, Revuelta-LÓPEZ E, Miñana G, Santas E, Llàcer P, et al. Soluble ST2 and Diuretic Efficiency in Acute Heart Failure and Concomitant Renal Dysfunction. *Journal of cardiac failure*. 2021;27(4):427–34.
23. Tang WHW, Wu Y, Grodin JL, Hsu AP, Hernandez AF, Butler J, et al. Prognostic Value of Baseline and Changes in Circulating Soluble ST2 Levels and the Effects of Nesiritide in Acute Decompensated Heart Failure. *JACC Heart failure*. 2016 Jan;4(1):68–77.
24. Morrow DA, Velazquez EJ, DeVore AD, Prescott MF, Duffy CI, Gurmu Y, et al. Cardiovascular biomarkers in patients with acute decompensated heart failure randomized to sacubitril-valsartan or enalapril in the PIONEER-HF trial. *European heart journal*. 2019;40(40):3345–52.
25. Shimp M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM, et al. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 May 11;109(18).
26. Sabatine MS, Morrow DA, Higgins LJ, MacGillivray C, Guo W, Bode C, et al. Complementary roles for biomarkers of biomechanical strain ST2 and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2008 Apr 15;117(15).
27. Jenkins WS, Roger VL, Jaffe AS, Weston SA, AbouEzzeddine OF, Jiang R, et al. Prognostic Value of Soluble ST2 After Myocardial Infarction: A Community Perspective. *The American journal of medicine*. 2017;130(9):1112.e9-1112.e15.
28. Ky B, French B, McCloskey K, Rame JE, McIntosh E, Shahi P, et al. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circulation Heart failure*. 2011 Mar;4(2).
29. Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, Peñafiel J, Galán A, Barallat J, et al. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014 Jan 21;63(2).

30. Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, Snider J, Cohn JN. Prognostic value of soluble ST2 in the Valsartan Heart Failure Trial. *Circulation Heart failure*. 2014 May;7(3).
31. Gaggin HK, Szymonifka J, Bhardwaj A, Belcher A, de Berardinis B, Motiwala S, et al. Head-to-head comparison of serial soluble ST2, growth differentiation factor-15, and highly-sensitive troponin T measurements in patients with chronic heart failure. *JACC Heart failure*. 2014 Feb;2(1).
32. Gaggin HK, Motiwala S, Bhardwaj A, Parks KA, Januzzi JL. Soluble concentrations of the interleukin receptor family member ST2 and  $\beta$ -blocker therapy in chronic heart failure. *Circulation Heart failure*. 2013 Nov;6(6).
33. Pascual-Figal DA, Ordoñez-Llanos J, Tornel PL, Vázquez R, Puig T, Valdés M, et al. Soluble ST2 for predicting sudden cardiac death in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009 Dec 1;54(23).
34. Ahmad T, Fiuzat M, Neely B, Neely ML, Pencina MJ, Kraus WE, et al. Biomarkers of myocardial stress and fibrosis as predictors of mode of death in patients with chronic heart failure. *JACC Heart failure*. 2014 Jun;2(3).
35. Miller WL, Saenger AK, Grill DE, Slusser JP, Bayes-Genis A, Jaffe AS. Prognostic Value of Serial Measurements of Soluble Suppression of Tumorigenicity 2 and Galectin-3 in Ambulatory Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of cardiac failure*. 2016 Apr;22(4):249–55.
36. Emdin M, Aimo A, Vergaro G, Bayes-Genis A, Lupón J, Latini R, et al. sST2 Predicts Outcome in Chronic Heart Failure Beyond NT-proBNP and High-Sensitivity Troponin T. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(19):2309–20.
37. Dieplinger B, Egger M, Haltmayer M, Kleber ME, Scharnagl H, Silbernagel G, et al. Increased soluble ST2 predicts long-term mortality in patients with stable coronary artery disease: results from the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Clinical chemistry*. 2014 Mar;60(3).
38. van den Berg VJ, Umans VAWM, Brankovic M, Oemrawsingh RM, Asselbergs FW, van der Harst P, et al. Stabilization patterns and variability of hs-CRP, NT-proBNP and ST2 during 1 year after acute coronary syndrome admission: results of the BIOMArCS study. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2020;58(12):2099–106.
39. Aimo A, Vergaro G, Ripoli A, Bayes-Genis A, Pascual Figal DA, de Boer RA, et al. Meta-Analysis of Soluble Suppression of Tumorigenicity-2 and Prognosis in Acute Heart Failure. *JACC Heart failure*. 2017;5(4):287–96.

40. Aimo A, Vergaro G, Passino C, Ripoli A, Ky B, Miller WL, et al. Prognostic Value of Soluble Suppression of Tumorigenicity-2 in Chronic Heart Failure: A Meta-Analysis. *JACC Heart failure*. 2017;5(4):280–6.
41. Januzzi JL, Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *The American journal of cardiology*. 2005 Apr 15;95(8).
42. Brown AM, Wu AHB, Clopton P, Robey JL, Hollander JE. ST2 in emergency department chest pain patients with potential acute coronary syndromes. *Annals of emergency medicine*. 2007 Aug;50(2).
43. Aldous SJ, Richards AM, Troughton R, Than M. ST2 has diagnostic and prognostic utility for all-cause mortality and heart failure in patients presenting to the emergency department with chest pain. *Journal of cardiac failure*. 2012 Apr;18(4).
44. Mueller T, Dieplinger B. The Presage<sup>®</sup> ST2 Assay: analytical considerations and clinical applications for a high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2. *Expert review of molecular diagnostics*. 2013 Jan;13(1).
45. Dieplinger B, Januzzi JL, Steinmair M, Gabriel C, Poelz W, Haltmayer M, et al. Analytical and clinical evaluation of a novel high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2 in human plasma--the Presage ST2 assay. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009 Nov;409(1–2).
46. Wu AHB, Wians F, Jaffe A. Biological variation of galectin-3 and soluble ST2 for chronic heart failure: implication on interpretation of test results. *American heart journal*. 2013 Jun;165(6).
47. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *The American journal of cardiology*. 2015 Apr 2;115(7 Suppl):3B-7B.
48. Aimo A, Vergaro G, Ripoli A, Bayes-Genis A, Pascual Figal DA, de Boer RA, et al. Meta-Analysis of Soluble Suppression of Tumorigenicity-2 and Prognosis in Acute Heart Failure. *JACC Heart failure*. 2017;5(4):287–96.
49. O'Donoghue ML, Morrow DA, Cannon CP, Jarolim P, Desai NR, Sherwood MW, et al. Multimarker Risk Stratification in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(5).
50. Richards AM, di Somma S, Mueller T. ST2 in stable and unstable ischemic heart diseases. *The American journal of cardiology*. 2015 Apr 2;115(7 Suppl):48B-58B.
51. Bajwa EK, Mebazaa A, Januzzi JL. ST2 in Pulmonary Disease. *The American Journal of Cardiology*. 2015 Apr;115(7):44B-47B.

52. Alladina JW, Levy SD, Hibbert KA, Januzzi JL, Harris RS, Matthay MA, et al. Plasma Concentrations of Soluble Suppression of Tumorigenicity-2 and Interleukin-6 Are Predictive of Successful Liberation From Mechanical Ventilation in Patients With the Acute Respiratory Distress Syndrome\*. *Critical Care Medicine*. 2016 Sep;44(9):1735–43.
53. Okamoto R, Hirashiki A, Cheng XW, Yamada T, Shimazu S, Shinoda N, et al. Usefulness of serum cardiac troponins T and I to predict cardiac molecular changes and cardiac damage in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *International heart journal*. 2013;54(4):202–6.
54. Sánchez-Más J, Lax A, Asensio-López MDC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Santarelli G, et al. Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: correlation with cardiac remodelling markers. *European journal of clinical investigation*. 2014 Jul;44(7).
55. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985 Oct;150(1).
56. Lax A, Sanchez-Mas J, Asensio-Lopez MC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Garrido IP, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and interleukin-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. *JACC Heart failure*. 2015 Jan;3(1).
57. Mao P, Wu S, Li J, Fu W, He W, Liu X, et al. Human alveolar epithelial type II cells in primary culture. *Physiological reports*. 2015 Feb 1;3(2).
58. Chen J, Chen Z, Narasaraju T, Jin N, Liu L. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004 Jun;84(6).
59. Reid BG, Stratton MS, Bowers S, CavaSin MA, Demos-Davies KM, Susano I, et al. Discovery of novel small molecule inhibitors of cardiac hypertrophy using high throughput, high content imaging. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;97.
60. Jenkins WS, Roger VL, Jaffe AS, Weston SA, AbouEzzeddine OF, Jiang R, et al. Prognostic Value of Soluble ST2 After Myocardial Infarction: A Community Perspective. *The American journal of medicine*. 2017;130(9):1112.e9-1112.e15.
61. Dhillon OS, Narayan HK, Quinn PA, Squire IB, Davies JE, Ng LL. Interleukin 33 and ST2 in non-ST-elevation myocardial infarction: comparison with Global Registry of Acute Coronary Events Risk Scoring and NT-proBNP. *American heart journal*. 2011 Jun;161(6):1163–70.

62. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research*. 2016;119(1):91–112.
63. Pérez-Martínez MT, Lacunza-Ruiz J, García de Lara J, Noguera-Velasco JA, Lax A, Hernández-Vicente Á, et al. Noncardiac Production of Soluble ST2 in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(12):1429–30.
64. Chen W-Y, Hong J, Gannon J, Kakkar R, Lee RT. Myocardial pressure overload induces systemic inflammation through endothelial cell IL-33. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Jun 9;112(23):7249–54.
65. Mildner M, Storka A, Lichtenauer M, Mlitz V, Ghannadan M, Hoetzenecker K, et al. Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *Cardiovascular research*. 2010 Sep 1;87(4):769–77.
66. Truong QA, Januzzi JL, Szymonifka J, Thai W, Wai B, Lavender Z, et al. Coronary sinus biomarker sampling compared to peripheral venous blood for predicting outcomes in patients with severe heart failure undergoing cardiac resynchronization therapy: the BIOCRT study. *Heart rhythm*. 2014 Dec;11(12):2167–75.
67. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Sep 7;282(36):26369–80.
68. Bandara G, Beaven MA, Olivera A, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33. *European journal of immunology*. 2015 Nov;45(11):3034–44.
69. Dieplinger B, Egger M, Koehler W, Firlinger F, Poelz W, Lenz K, et al. Prognostic value of soluble ST2 in an unselected cohort of patients admitted to an intensive care unit - The Linz Intensive Care Unit (LICU) study. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012 Mar 22;413(5–6):587–93.
70. Hoogerwerf JJ, Tanck MWT, van Zoelen MAD, Wittebole X, Laterre P-F, van der Poll T. Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. *Intensive care medicine*. 2010 Apr;36(4):630–7.
71. Bradley-Stewart A, Jolly L, Adamson W, Gunson R, Frew-Gillespie C, Templeton K, et al. Cytokine responses in patients with mild or severe influenza A(H1N1)pdm09. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013 Sep;58(1):100–7.

72. Brunner M, Krenn C, Roth G, Moser B, Dworschak M, Jensen-Jarolim E, et al. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive care medicine*. 2004 Jul;30(7):1468–73.
73. Andersson C, Preis SR, Beiser A, DeCarli C, Wollert KC, Wang TJ, et al. Associations of Circulating Growth Differentiation Factor-15 and ST2 Concentrations With Subclinical Vascular Brain Injury and Incident Stroke. *Stroke*. 2015 Sep;46(9):2568–75.



## **RESUMEN/ ABSTRACT**



## 14. RESUMEN/ ABSTRACT

### RESUMEN

---

#### INTRODUCCIÓN

Las concentraciones séricas del ST2, un miembro de la familia de receptores interleucina-1 (IL-1), son un importante marcador pronóstico en enfermedades cardíacas. sST2 está elevado en la sangre periférica de pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) e insuficiencia cardíaca (IC). Concentraciones altas de sST2 se correlacionan con el grado de necrosis y disfunción sistólica ventricular, asociándose a un mayor riesgo de muerte e IC en el seguimiento. La fuente de producción sST2 como respuesta al IAM y en la IC no se conoce, pero la identificación de las fuentes de sST2 es relevante para diseñar estrategias capaces de modular su señalización y poder desarrollar terapias dirigidas a disminuir su producción.

#### OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son los siguientes: 1) Estudiar si la fuente de producción de sST2 en respuesta al IAM es cardíaca o extracardiaca. 2) Estudiar si la fuente de producción de sST2 en pacientes con IC crónica avanzada es cardíaca o extracardiaca. 3) Estudiar si los pulmones son una fuente significativa de sST2 en el contexto de la IC.

#### METODOLOGÍA

Se han realizado tres estudios clínicos: 1) Determinación de concentraciones de sST2 en pacientes con IAM y elevación del ST sometidos a una angioplastia primaria. Inmediatamente tras el procedimiento de revascularización, se obtuvo sangre en seno coronario, raíz aórtica, arteria radial y vena braquial. 2) Determinación de concentraciones de sST2 en pacientes con IC avanzada. Durante la realización de un cateterismo derecho e izquierdo, se obtuvo sangre de la raíz aórtica, seno venoso coronario, tronco de la arteria pulmonar, capilar pulmonar y arteria y vena femoral. 3) Determinación de concentraciones de sST2, en aspirado bronquial y sangre de pacientes con soporte ventilatorio ingresados en la unidad de cuidados intensivos por edema agudo pulmonar cardiogénico, bronconeumonía y trastornos cerebrales. En este mismo

estudio se desarrolló una fase experimental usando un modelo animal de IAM en rata, mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior. Se realizaron técnicas de biología molecular para cuantificación de proteína sST2 y modelos de estrés bioquímico en células para estimular la síntesis de sST2.

## **RESULTADOS**

En los pacientes con IAM las concentraciones de sST2 eran elevadas, pero similares en todos los sitios de extracción y sin gradiente transcárdico entre raíz aórtica y seno coronario.

Obtuvimos resultados similares en los pacientes con IC avanzada: ausencia de gradiente significativo entre las distintas zonas de extracción de muestras.

En el modelo experimental de IC tras un IAM, el hígado y el riñón no mostraron expresión de sST2, pero los pulmones expresaban un aumento temprano e intenso de sST2, tanto en términos de niveles de ARN como de expresión proteica. La expresión de ST2L/IL-33 mostró un patrón diferente en respuesta al IAM entre los pulmones, donde disminuyó la expresión tras el IAM, y el miocardio, donde aumentó su expresión tras el IAM. En el examen histopatológico, se detectó sST2 intensamente en el epitelio alveolar, y los neumocitos de tipo II humanos primarios secretaron sST2 en respuesta al estrés mecánico. La relevancia de los pulmones en la producción de sST2 en las enfermedades cardíacas se confirmó después en el aspirado bronquial obtenido de pacientes con edema pulmonar cardiogénico, obteniendo niveles de sST2 más altos que en los pacientes con bronconeumonía o trastornos neurológicos.

## **CONCLUSIONES**

La ausencia de gradiente transcárdico en pacientes con IAM e IC avanzada apoya la hipótesis de una fuente de producción de sST2 no cardíaca. Los pulmones son una fuente relevante de sST2 en la IC. Estos resultados pueden tener implicaciones en la comprensión de la progresión de la enfermedad y en el desarrollo de terapias dirigidas al sistema ST2 en pacientes con IC.

## **ABSTRACT**

---

### **INTRODUCTION**

Serum concentrations of ST2, a member of the interleukin-1 (IL-1) receptor family, represent a significant prognostic marker in heart disease. sST2 is elevated in the peripheral blood of patients with acute myocardial infarction (AMI) and heart failure (HF). High concentrations of sST2 correlate with the degree of necrosis and ventricular systolic dysfunction, and are associated with a higher risk of death and HF during follow-up. The source of sST2 production in response to AMI and in HF is not known, but the identification of the sources of sST2 is relevant to design strategies capable of modulating its signaling and developing therapies aimed to reduce its production.

### **OBJECTIVES**

The objectives of this study are as follows: 1) to study whether the source of sST2 production in response to AMI is cardiac or extracardiac. 2) To study whether the source of sST2 production in patients with advanced chronic HF is cardiac or extracardiac. 3) To study whether the lungs are a significant source of sST2 in the context of HF.

### **METHODOLOGY**

Three clinical studies have been carried out:

- 1) Determination of sST2 concentrations in patients with AMI and ST elevation who underwent primary angioplasty. After the revascularization procedure, blood samples were obtained from the coronary sinus, aortic root, radial artery and brachial vein.
- 2) Determination of sST2 concentrations in patients with advanced HF. During right and left catheterism procedures, samples were obtained from the aortic root, coronary venous sinus, main pulmonary artery, pulmonary capillary and femoral artery and vein.
- 3) Determination of sST2 concentrations, in bronchial aspirate and blood, in patients with ventilatory support admitted to the intensive care unit because of acute cardiogenic pulmonary edema, bronchopneumonia and brain disorders. In the same study, an experimental sub study was carried out using a rat model of myocardial

infarction by ligation of the anterior descending coronary artery. Molecular biology techniques for sST2 quantification and biochemical stress models in cells to stimulate sST2 synthesis were performed.

## **RESULTS**

In patients with AMI, sST2 concentrations were elevated but similar at all extraction sites and without a transcardiac gradient between the aortic root and coronary sinus.

We obtained similar results in patients with advanced heart failure: no significant gradient was obtained between the different sampling sites.

In the experimental model of HF after AMI, the liver and kidney did not show sST2 expression, but the lungs expressed an early and intense increase in sST2, both in terms of RNA levels and protein expression. ST2L/IL-33 expression showed a different pattern in response to AMI between lungs, where expression was decreased after AMI, and myocardium, where expression was increased after AMI. On histopathological examination, sST2 was strongly detected in the alveolar epithelium, and primary human type II pneumocytes secreted sST2 in response to mechanical stress. The relevance of the lungs in the production of sST2 in cardiac diseases was further confirmed in bronchial aspirates obtained from patients with cardiogenic pulmonary edema, where sST2 levels were higher than in patients with bronchopneumonia or neurological disorders.

## **CONCLUSIONS**

The absence of a transcardiac gradient in patients with AMI and advanced HF supports the hypothesis of a noncardiac source of sST2 production. The lungs are a relevant source of sST2 in heart failure. These results may have implications in the comprehension of disease progression and the development of therapies targeting the ST2 system in patients with heart failure.

