

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA**

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

upna

Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**TESIS DOCTORAL**

**“Papel del sST2 en la fibrosis miocárdica en la estenosis  
aórtica severa”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Vanessa Arrieta Paniagua

DIRECTORA

Natalia López-Andrés

<https://doi.org/10.48035/Tesis/2454/44478>

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

1. La válvula aórtica y el ventrículo izquierdo: anatomía, estructura y función
  - 1.1. La válvula aórtica
  - 1.2. El ventrículo izquierdo
2. La estenosis aórtica
  - 2.1. Etiología
  - 2.2. Fisiopatología
  - 2.3. Presentación clínica
    - a) Historia clínica
    - b) Exploración física
  - 2.4. Herramientas diagnósticas
    - a) Pruebas complementarias básicas: electrocardiograma y radiografía de tórax
    - b) Ecocardiografía
    - c) Prueba de esfuerzo
    - d) Determinación de BNP en analítica de sangre
    - e) Cateterismo cardiaco
    - f) Técnicas de imagen avanzadas: TAC y RMN cardiaca
  - 2.5. Historia natural
  - 2.6. Tratamiento
3. La fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica
  - 3.1. Fisiopatología de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica
    - a) Papel de los fibroblastos cardiacos
    - b) La muerte del cardiomiocito
    - c) Participación de la inflamación y el estrés oxidativo
  - 3.2. Importancia pronóstica
  - 3.3. Cómo podemos evaluar la fibrosis miocárdica
4. Evaluación de la fibrosis focal de reemplazo mediante RMN cardiaca en pacientes con estenosis aórtica
5. sST2 como biomarcador de fibrosis miocárdica
  - 5.1. Biología del ST2
  - 5.2. Papel fisiopatológico del sST2 en la estenosis aórtica
  - 5.3. Papel pronóstico del sST2 en la estenosis aórtica

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

1. Hipótesis
2. Objetivos

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

1. Experimentos con fibroblastos cardiacos humanos
  - 1.1. Cultivo de fibroblastos cardiacos humanos
  - 1.2. Tratamientos
  - 1.3. Análisis proteómico por espectrometría de masas
  - 1.4. Silenciamiento de NRP-1 por edición genómica mediante CRISP/Cas9
2. Modelo animal
3. Análisis de biopsias miocárdicas
4. Técnicas de laboratorio empleadas
  - 4.1. Análisis histológico
  - 4.2. ELISA
  - 4.3. PCR en tiempo real por transcripción reversa
  - 4.4. Western blot
5. Estudio de una cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa con indicación quirúrgica
  - 5.1. Análisis del suero de los pacientes
  - 5.2. Ecocardiografía
  - 5.3. Resonancia magnética cardiaca
6. Análisis estadístico
  - 6.1. In vitro y animales
  - 6.2. Cohorte clínica

## **RESULTADOS**

1. Análisis proteómico cuantitativo de los efectos de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos adultos
2. Tratamiento con sST2 en fibroblastos cardiacos
  - 2.1. sST2 modifica la expresión de MFN-1 mitocondrial y de moléculas relacionadas con estrés oxidativo en fibroblastos cardiacos humanos
  - 2.2. sST2 promueve la activación de fibroblastos y aumenta la expresión de NRP-1 en fibroblastos cardiacos humanos

3. Estudio de la vía intracelular de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos
  - 3.1. NF- $\kappa$ B media los efectos proinflamatorios, prooxidantes y profibróticos del sST2 en fibroblastos cardiacos humanos
  - 3.2. La NRP-1 media los efectos profibróticos de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos
    - a) Expresión de sST2 en fibroblastos cardiacos “NRP-1 knockdown”
    - b) Tratamiento con NRP-1 exógena en fibroblastos cardiacos humanos
    - c) Expresión cardiaca de sST2 y NRP-1 en un modelo animal de sobrecarga de presión
4. sST2, estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa
5. Evaluación del sST2 circulante y la fibrosis focal miocárdica de reemplazo mediante RMN cardiaca con secuencias de realce tardío en una cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa
  - 5.1. Características clínicas y de laboratorio de la cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa
  - 5.2. La presencia de realce tardío en pacientes con estenosis aórtica severa está asociada con mayor remodelado ventricular izquierdo y disfunción ventricular
  - 5.3. Los niveles circulantes de sST2 predicen la presencia de realce tardío en pacientes con estenosis aórtica severa
  - 5.4. La masa de realce tardío está asociada con el remodelado ventricular izquierdo y con los niveles circulantes de sST2
  - 5.5. La fibrosis intramiocárdica está asociada con mayores niveles de sST2 circulante en la estenosis aórtica severa
  - 5.6. La presencia de realce tardío y la elevación de los niveles de sST2 como marcadores de enfermedad más avanzada

## **DISCUSIÓN**

1. Papel fisiopatológico del sST2 en la estenosis aórtica severa
  - 1.1. Consideraciones generales sobre los hallazgos del papel del sST2 en el estrés oxidativo y la inflamación en fibroblastos cardiacos humanos
  - 1.2. Consideraciones generales sobre los hallazgos del papel del sST2 en la fibrosis en fibroblastos cardiacos humanos

- 1.3. Integración de los efectos del sST2 como inductor de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en fibroblastos cardiacos humanos
2. Utilidad clínica del sST2 en pacientes con estenosis aórtica severa

## **CONCLUSIONES**

## **BIBLIOGRAFÍA**

# ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso $\alpha$
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARA II	Antagonistas de los receptores de la angiotensina II
ARM	Antagonistas del receptor mineralocorticoide
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Aortic stenosis (estenosis aórtica)
AST	Área de la sección transversal
AUC	Área bajo la curva
AVA	Área valvular aórtica
Bbloq	Betabloqueante
BMP-2	Proteína morfógena ósea 2
BNP	Péptido natriurético cerebral
CCL-2	Proteína quimiotáctica de monocitos
CF	Clase funcional
CML	Carboximetil-lisina
Col	Colágeno
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindrome repeats
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DM	Diabetes mellitus
DRP-1	Dynamin-related-protein-1
DTDVI	Diámetro telediastólico de ventrículo izquierdo
DTSVI	Diámetro telesistólico de ventrículo izquierdo
E	Especificidad
EA	Estenosis aórtica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECO TT	Ecocardiografía transtorácica
ESC	Sociedad Europea de Cardiología
FA	Fibrilación auricular
FEVI	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FG	Filtrado glomerular
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos-2



GADPH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
Gal-3	Galectina 3
Hb	Hemoglobina
HLP	Hiperlipidemia
HTA	Hipertensión arterial
HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC	Insuficiencia cardiaca
IECA	Inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina
IL	Interleuquina
ITV	Integral velocidad-tiempo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MACE	Eventos cardiovasculares mayores
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógeno
MDA	Malondialdehido
MFN	Mitofusina
MMP	Metaloproteinasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NRP-1	Neurofilina 1
NYHA	New York Heart Association
OPA-1	Proteína de atrofia óptica 1
PBS	Tampón fosfato salino
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ co-activator 1 $\alpha$
PHB	Prohibitina
PPVI	Espesor de pared posterior de ventrículo izquierdo
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Realce tardío
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S	Sensibilidad

SIV	Septo interventricular
ST2	Suppression of tumorigenicity 2
sST2	ST2 soluble
ST2L	ST2 receptor transmembrana
TAC	Tomografía axial computerizada
TAVI	Implantación de válvula aórtica transcatóter
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TSVI	Tracto de salida de ventrículo izquierdo
VA	Válvula aórtica
VI	Ventrículo izquierdo
VTDVI	Volumen telediastólico de ventrículo izquierdo
VTSVI	Volumen telesistólico de ventrículo izquierdo

# RESUMEN

## **Introducción:**

Los pacientes con estenosis aórtica desarrollan hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI) en respuesta a la sobrecarga de presión. La fibrosis miocárdica tiene un papel fisiopatológico importante en este proceso de remodelado VI, así como claro valor pronóstico. La resonancia magnética nuclear (RMN) cardíaca con las secuencias de realce tardío (RT) nos permite identificar y cuantificar la fibrosis focal de reemplazo, la cual está asociada a una evolución desfavorable en los pacientes con estenosis aórtica severa. El ST2 soluble (sST2) es un marcador de fibrosis cardíaca y está involucrado en enfermedades inflamatorias. En la estenosis aórtica está elevado y parece tener valor pronóstico. En este estudio hemos investigado los efectos del sST2 en fibroblastos cardíacos humanos sobre el estrés oxidativo, la inflamación, la activación de miofibroblastos y la síntesis de colágeno, así como su papel patológico en la estenosis aórtica. Por otro lado, hemos investigado si los niveles de sST2 en sangre se asocian con el RT evaluado mediante RMN en pacientes con estenosis aórtica severa.

## **Métodos y resultados:**

Se realizó un análisis proteómico para estudiar las proteínas moduladas por sST2 en fibroblastos cardíacos humanos e identificamos dos proteínas de interés: mitofusina-1 (MFN-1), proteína reguladora de la fusión mitocondrial, cuya expresión estaba reprimida, y la neurofilina-1 (NRP-1), proteína reguladora del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) de acción profibrótica, cuya expresión estaba aumentada.

El tratamiento con sST2 en fibroblastos cardíacos humanos disminuyó la expresión de MFN-1, afectando a la función mitocondrial y aumentando los marcadores de estrés oxidativo (nitrotirosina, MDA, CML, peróxido de hidrógeno) y citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL1 $\beta$  y CCL-2). Por otro lado, observamos que el tratamiento con sST2 aumentó la expresión de marcadores de activación de miofibroblastos ( $\alpha$ -SMA y vimentina), la fibronectina, el colágeno y otros marcadores profibróticos (Gal-3, CTGF y TGF- $\beta$ ).

La inhibición farmacológica del factor nuclear transcripcional  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) restauró los niveles de MFN-1 y mejoró el estado oxidativo y la inflamación en fibroblastos cardíacos humanos. En paralelo, la inhibición de NF- $\kappa$ B restauró los niveles de NRP-1 y bloqueó los efectos profibróticos inducidos por sST2. En células silenciadas para NRP-1, sST2 no

consiguió ejercer efectos profibróticos. El tratamiento con NRP-1 exógena aumentó la activación de fibroblastos cardiacos y la síntesis de colágeno vía NF- $\kappa$ B.

En un modelo de rata de sobrecarga de presión, los niveles de sST2 estaban elevados en asociación con marcadores de fibrosis cardiaca y se correlacionaron positivamente con los niveles de NRP-1.

En biopsias miocárdicas de 26 pacientes con estenosis aórtica severa, observamos un aumento de los niveles de sST2 y una disminución de MFN-1, en comparación con controles. Los niveles cardiacos de sST2 se correlacionaron inversamente con los niveles de MFN-1 y positivamente con IL-6 y CCL-2.

Estudiamos a 79 pacientes (60,8% hombres,  $72,2 \pm 8$  años) con estenosis aórtica severa que fueron remitidos a nuestro centro para cirugía de sustitución valvular aórtica. A todos los pacientes se realizó RMN cardiaca con secuencias de RT para evaluar la fibrosis focal miocárdica de reemplazo y se realizó análisis de sangre para medir los niveles de sST2. Los pacientes con RT + (53,2%) presentaron un mayor remodelado VI, con VI más dilatados, con mayor masa VI y peor FEVI. Los niveles de sST2 fueron significativamente mayores en los pacientes con RT + comparando con RT - ( $34,7 \pm 7,7$  vs.  $18 \pm 5,7$  ng/mL,  $p < 0,000$ ). Estableciendo un punto de corte de sST2 de 28,2 mg/mL podemos identificar a los pacientes con RT + con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 100%. La masa de RT se correlacionó de forma positiva con los parámetros de remodelado y disfunción ventricular, así a más masa de RT, mayor volumen VI, mayor masa VI y menor FEVI. Los niveles de sST2 se correlacionaron positivamente con la masa de RT y con la masa VI. Los pacientes con RT intramiocárdico (54,8% de los pacientes con RT+), aquellos con tendencia a presentar VI más hipertróficos, presentaron mayores niveles de sST2 que los pacientes con RT subendocárdico. Todos los pacientes con FEVI  $< 50\%$  tenían RT +. Entre los pacientes con FEVI  $> 50\%$  aquellos con RT + presentaron niveles significativamente mayores de sST2 ( $36,6 \pm 5,3$  vs  $17,97 \pm 5,7$  ng/mL,  $p < 0,001$ ) identificando a un grupo de pacientes de interés clínico con una enfermedad más avanzada que precede a la disfunción ventricular.

### **Conclusiones:**

El tratamiento con sST2 disminuye la expresión de MFN-1 en fibroblastos cardiacos humanos, afectando la fusión mitocondrial, lo cual promueve un aumento del estrés oxidativo y la inflamación. Paralelamente sST2 induce la sobreexpresión de NRP-1 en

fibroblastos cardiacos humanos, promoviendo su diferenciación a miofibroblatos, aumentando la síntesis de colágeno y otras moléculas profibróticas.

NF- $\kappa$ B es la vía que media los efectos prooxidativos, proinflamatorios y profibróticos del sST2 en fibroblastos cardiacos humanos.

En el miocardio de modelos de rata con sobrecarga de presión, los niveles de sST2 se correlacionaron positivamente con los niveles de NRP-1.

En biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa, los niveles de sST2 se asociaron con una reducción de MFN-1 y un aumento de marcadores de inflamación.

Los pacientes con estenosis aórtica severa con RT en RMN cardiaca presentan niveles de sST2 en sangre significativamente mayores que aquellos sin RT. Los niveles de sST2 en sangre se correlacionan positivamente con la masa de RT y con la masa VI en los pacientes con estenosis aórtica severa. Niveles elevados de sST2 permiten identificar a los pacientes con estenosis aórtica severa con RT, sin tener que realizar una RMN cardiaca, de una forma sencilla que puede ser aplicada en la práctica clínica habitual.

# ABSTRACT

## **Introduction:**

Patients with severe aortic stenosis develop left ventricular hypertrophy in response to pressure overload. Myocardial fibrosis plays an important role in the left ventricular remodeling process and has prognostic value. Focal myocardial replacement fibrosis is identified and quantified using late gadolinium enhancement (LGE) on cardiac magnetic resonance (CMR). LGE is associated with an adverse outcome in patients with severe aortic stenosis. Soluble ST2 (sST2) is a marker of cardiac fibrosis and it is involved in inflammatory diseases. Circulating levels of sST2 are increased in aortic stenosis and associated with poor prognosis. We herein investigated sST2 effects on oxidative stress, inflammation, myofibroblasts activation and collagen synthesis in human cardiac fibroblasts and its pathological role in human aortic stenosis. Moreover, from a clinical viewpoint, we investigated whether sST2 levels could be associated with LGE on CMR in patients with severe aortic stenosis.

## **Methods and results:**

Using a quantitative proteomic and immunodetection approaches, we have identified two main proteins modulated by sST2 in human cardiac fibroblasts: mitofusin-1 (MFN-1), a protein involved in mitochondrial fusion, that is down-regulated, and neuropilin-1 (NRP-1), a regulator of the profibrotic transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), that is upregulated.

sST2 treatment decreased the expression of MFN-1, affecting mitochondrial fusion in human cardiac fibroblasts. Stimulation with sST2 increased oxidative stress markers (nitrotyrosine, MDA, CML and peroxide) and enhanced the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL1 $\beta$  and CCL-2). In parallel, sST2 increased the expression of the myofibroblast activation markers ( $\alpha$ -SMA and vimentin), collagen and other profibrotic markers (Gal-3, CTGF and TGF- $\beta$ ).

Pharmacological inhibition of the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) restored MFN-1 levels and improved oxidative status and inflammation in cardiac fibroblasts. Also, NF- $\kappa$ B inhibition restored NRP-1 levels and blocked profibrotic effects induced by sST2. In NRP-1 knockdown cells, sST2 failed to induce fibroblast activation and collagen synthesis. Exogenous NRP-1 enhanced cardiac fibroblast activation and collagen synthesis via NF- $\kappa$ B.



In a pressure overload rat model, sST2 was elevated in association with cardiac fibrosis and it was positively correlated with NRP-1 expression.

In myocardial biopsies from 26 aortic stenosis patients, sST2 up-regulation paralleled a decrease in MFN-1. Cardiac sST2 inversely correlated with MFN-1 levels and positively associated with IL-6 and CCL-2 in myocardial biopsies from AS patients.

A total of 79 patients (60.8% men, mean age  $72.2 \pm 8$  years-old) with severe aortic stenosis referred to our hospital to aortic valve replacement surgery were recruited. CMR examination was performed to evaluate LGE as a marker of focal myocardial replacement fibrosis. sST2 levels were also determined. LGE + patients (53.2%) displayed higher structural abnormalities and functional impairment of the LV. LGE + patients had higher LV dilatation, enhanced LV mass and lowered EF. sST2 levels were higher in LGE + patients as compared to LGE – patients ( $34.7 \pm 7.7$  vs.  $18 \pm 5.7$  ng/mL,  $p$  0.000). sST2 > 28.2 ng/mL cut-off was able to predict LGE + with 88% sensitivity and 100% specificity. LGE mass positively correlated with remodelling parameters and ventricular dysfunction. sST2 levels were correlated with LGE mass and LV mass. Midwall LGE patients (54,8% LGE + patients), that usually exhibited more hypertrophic left ventricle, had higher sST2 levels as compared to those presenting subendocardial LGE. All patients with LV dysfunction (EF <50%) had LGE. Among patients with EF >50%, those with LGE + had higher levels of sST2 ( $36.6 \pm 5.3$  vs  $17.97 \pm 5.7$  ng/mL,  $p$  0.001), identifying an interesting group of patients with more advanced LV remodeling preceding the development of LV dysfunction.

### **Conclusions:**

sST2 treatment decreases MFN-1 expression, affecting mitochondrial fusion in human cardiac fibroblasts, increasing oxidative stress production and inflammatory markers secretion. In parallel, sST2 induces NRP-1 expression in human cardiac fibroblasts, enhancing myofibroblast differentiation, increasing collagen synthesis and profibrotic molecules production. All the above effects induced by sST2 are mediated by NF- $\kappa$ B pathway.

In the myocardium of pressure overloaded rats, increased sST2 levels correlated positively with the expression of NRP-1.

In human myocardial biopsies from patients with severe aortic stenosis, cardiac sST2 levels are associated with decreased MFN-1 levels and increased expression of inflammatory markers.

Patients with severe aortic stenosis that show LGE in CMR have higher sST2 levels than those without LGE. sST2 levels positively correlates with LGE mass and LV mass in severe aortic stenosis patients. Thus, our results suggest that sST2 levels could identify aortic stenosis patients with myocardial focal fibrosis. We propose that the determination of sST2 concentration in aortic stenosis patients could have an added value or even replace CMR, and should be included in clinical practice for a better management of this pathological condition.

# INTRODUCCIÓN

# 1. La válvula aórtica y el ventrículo izquierdo: anatomía, estructura y función

El corazón es una bomba muscular doble, que se regula de manera automática y se encarga de impulsar la sangre a través de los vasos sanguíneos hacia las distintas regiones del organismo. El corazón posee cuatro cámaras: dos aurículas (derecha e izquierda) y dos ventrículos (derecho e izquierdo). La aurícula de cada lado es el área receptora que bombea la sangre hacia el ventrículo. El ventrículo es la cavidad de descarga. La mitad derecha del corazón recibe la sangre desoxigenada del organismo y la bombea hacia los pulmones, mientras que el lado izquierdo recibe la sangre oxigenada de los pulmones y la bombea por la aorta para su distribución por el resto del organismo.

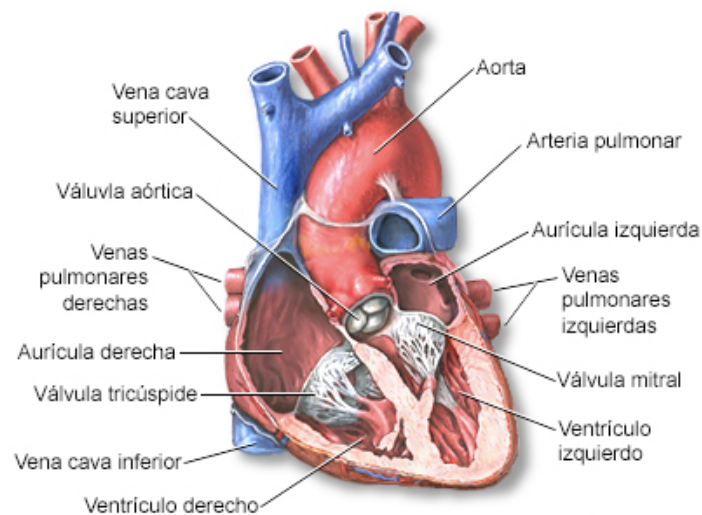


Figura 1. Anatomía cardíaca. Cámaras, válvulas y grandes vasos.

## 1.1 La válvula aórtica

La válvula aórtica es la válvula que separa el ventrículo izquierdo de la arteria aorta. Está formada por tres valvas semilunares que se insertan en un anillo fibroso.

La válvula aórtica normal se abre completamente durante la sístole cardíaca, con la contracción ventricular, permitiendo una eyección completa de la sangre oxigenada desde el ventrículo izquierdo a la arteria aorta. El cierre de la válvula aórtica durante la diástole, con la relajación ventricular, impide el flujo sanguíneo retrógrado desde la aorta al ventrículo izquierdo, y permite que el ventrículo izquierdo se llene solamente desde la aurícula izquierda en preparación para el próximo latido. La apertura y el cierre se realizan de forma pasiva: se abren cuando un gradiente de presión anterógrado empuja la sangre

hacia adelante, y se cierran cuando un gradiente de presión retrógrado empuja la sangre hacia atrás.

En condiciones normales el área del orificio de la válvula cuando está abierta es aproximadamente de 2,5-3,5 cm<sup>2</sup>. En situaciones normales, cuando la válvula aórtica está abierta, las presiones a ambos lados de la misma son prácticamente iguales, ofreciendo poca o nula resistencia al flujo anterógrado de sangre desde el ventrículo izquierdo a la aorta.

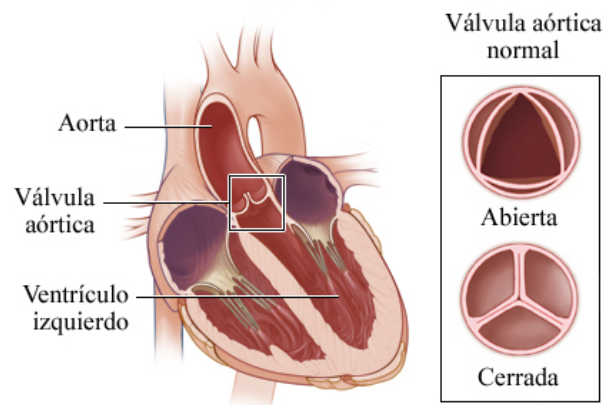


Figura 2. Válvula aórtica. Localización. Válvula aórtica abierta y cerrada.

## 1.2 El ventrículo izquierdo

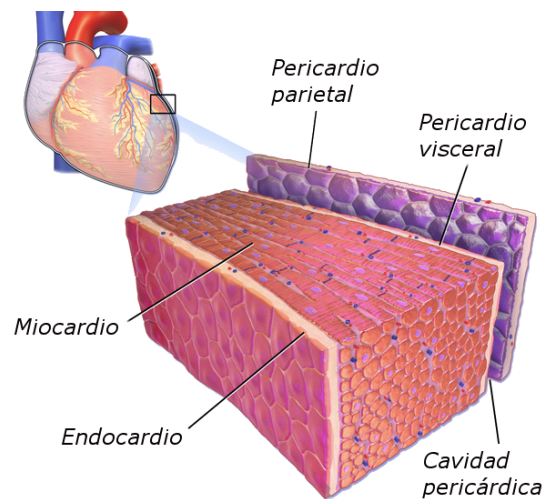
El ventrículo izquierdo es una de las cuatro cavidades del corazón, junto al ventrículo derecho y las dos aurículas. Recibe la sangre oxigenada desde la aurícula izquierda a través de la válvula mitral, para expulsarla hacia la aorta a través de la válvula aórtica.

En condiciones normales, el ventrículo izquierdo tiene un espesor de pared de unos 6-10 mm, con una masa muscular mucho mayor que la del resto de cavidades, ya que debe expulsar la sangre a la circulación sistémica que es una circulación de alta presión, a diferencia de la circulación pulmonar.

Está formado por tres capas:

- 1) Endocardio: capa endotelial que tapiza la cavidad interna quedando en contacto con la sangre.
- 2) Miocardio: capa más ancha que representa la mayor parte del grosor del corazón y contiene la masa muscular contráctil.
- 3) Pericardio: membrana fibroserosa que envuelve al corazón como si fuera una bolsa.

El miocardio, a nivel histológico, está formado por cardiomiocitos y tejido conectivo. Los cardiomiocitos son las células musculares especializadas del corazón, con capacidad contráctil de forma autónoma. El tejido conectivo está formado a su vez fundamentalmente por fibroblastos y una matriz extracelular. Los fibroblastos son células mesenquimales que forman una red de células interconectadas entre el colágeno de la matriz extracelular y los cardiomiocitos. Se encargan de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular, son fuente de factores de crecimiento y citoquinas, y respondiendo a estímulos mecánicos, eléctricos o bioquímicos, ayudan a distintas funciones fisiológicas mediante interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular. La matriz extracelular es el esqueleto tridimensional que da soporte, y permite la comunicación entre las células para coordinar la función contráctil.



*Figura 3. Capas del ventrículo izquierdo. Endocardio, miocardio y pericardio.*

## **2. La estenosis aórtica**

La estenosis aórtica es la enfermedad valvular más frecuente en Europa y Norte América<sup>1</sup>. Fundamentalmente de causa degenerativa, se presenta en adultos de edad avanzada, afectando al 2-7% de la población mayor de 65 años. La prevalencia de la estenosis aórtica aumenta con la edad siendo del 3-4% en la población de 70-80 años y del 9% en la población de 80-90 años<sup>2</sup>. Representa un problema de salud importante, teniendo en cuenta el creciente envejecimiento de la población.

La estenosis aórtica se caracteriza por un anormal estrechamiento del orificio de la válvula aórtica, dificultando la eyección de la sangre del ventrículo izquierdo. Esto va a generar una sobrecarga crónica de presión sobre el ventrículo izquierdo, provocando su hipertrofia como mecanismo de compensación.

## 2.1 Etiología

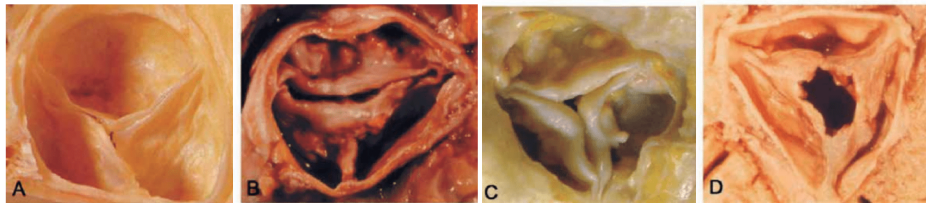
La estenosis aórtica tiene tres causas principales, en orden de frecuencia: degenerativa, congénita y reumática.

La **estenosis aórtica degenerativa o calcificada** es la causa más frecuente, presentándose en adultos de edad avanzada. Se va produciendo una progresiva fibrosis, engrosamiento y calcificación de las valvas de una válvula tricúspide normal. La calcificación es progresiva, iniciándose en la base de los velos y progresando hacia el borde libre, llevando poco a poco a su inmovilización. Subyacente a este proceso se encuentran cambios proliferativos e inflamatorios, con acumulación de lípidos, aumento de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina, aumento del estrés oxidativo e infiltración de macrófagos y linfocitos T, y aumento de la producción local de proteínas como la osteopontina, la osteocalcina y la proteína morfógena ósea 2 (BMP-2) que conduce finalmente a la formación de hueso de una forma similar a la calcificación vascular<sup>3</sup>.

La **válvula aórtica bicúspide** es una anomalía congénita en la que la válvula aórtica posee dos velos en lugar de tres. Se da en alrededor el 1-2% de la población y es más frecuente en hombres. La mayoría de las válvulas bicúspides funcionan normalmente hasta fases tardías de la vida. La presentación de la estenosis aórtica severa suele comenzar después de los 50 años, al desarrollar con la edad un engrosamiento progresivo y calcificación de los velos que reduce su movilidad. Las características histopatológicas de las válvulas bicúspides son similares a las tricúspides normales, pero se ha propuesto que el flujo turbulento y la mayor sobrecarga sobre la valva causada por la arquitectura anómala da lugar a cambios valvulares acelerados, lo que explica la menor edad media en el momento de la presentación de los pacientes con una válvula bicúspide estenosada, que los pacientes con una válvula trivalva. Es frecuente su asociación con aortopatía, con una dilatación de la porción ascendente de la aorta relacionada con una degeneración acelerada de la media aórtica.

La **estenosis aórtica reumática** es una afectación valvular en la edad adulta secundaria a la fiebre reumática, una complicación inflamatoria de una infección faríngea por estreptococo grupo A sufrida generalmente en la infancia. Es muy poco prevalente en

nuestro medio, siendo actualmente una patología más propia de países en vías de desarrollo. Se producen adherencias y fusiones de las comisuras, engrosamiento y fibrosis de los velos, llevando a una retracción y rigidez de los bordes libres. Aparecen nódulos calcificados en las dos superficies y el orificio se reduce a una abertura redonda o triangular pequeña. Es muy frecuente la afectación concomitante de la válvula mitral.



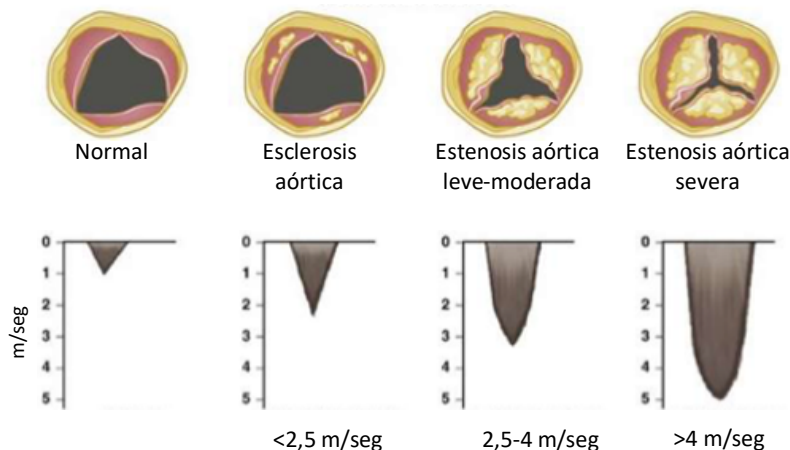
**Figura 4. Principales tipos de estenosis de la válvula aórtica.** A. Válvula aórtica normal. B. Estenosis aórtica sobre válvula bicúspide congénita. C. Estenosis aórtica degenerativa calcificada. D. Estenosis aórtica reumática.

## 2.2 Fisiopatología

En pacientes con válvulas aórticas normales, el área efectiva de la válvula aórtica abierta es similar al área transversal del tracto de salida del ventrículo izquierdo, aproximadamente 3-4 cm<sup>2</sup> en adultos. De este modo, cuando la válvula está abierta, las presiones a ambos lados de ésta son prácticamente iguales, no existiendo resistencia al flujo anterógrado de la sangre desde el ventrículo izquierdo a la aorta.

Cuando se inicia el proceso de engrosamiento y calcificación valvular (esclerosis aórtica), la velocidad del flujo anterógrado permanece normal.

Pero esta enfermedad es crónica y progresiva, y este equilibrio sólo se mantiene hasta que el área de la válvula aórtica disminuye por debajo de la mitad de su superficie normal. Entonces se comienza a generar un gradiente de presión entre el ventrículo izquierdo y la aorta, que representa la presión adicional que el ventrículo izquierdo tiene que superar para poder eyectar la sangre a través de la válvula estenosada.



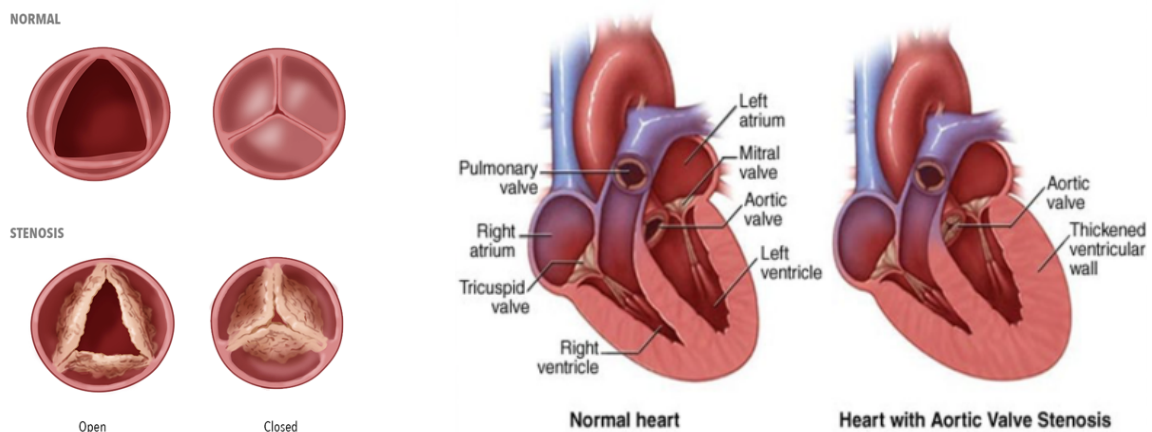
**Figura 5. Anatomía de la válvula aórtica y velocidad del jet aórtico por Doppler.** A partir de la velocidad del jet se calcula el gradiente de presión entre VI y Ao<sup>4</sup>.



La estenosis aórtica no hay que considerarla sólo como una enfermedad valvular, sino que hay que entenderla como una enfermedad de la válvula y del miocardio. Cuando la estenosis aórtica se hace hemodinámicamente significativa, la sobrecarga crónica de presión da lugar a una hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo como mecanismo adaptativo compensatorio para mantener un estrés de pared normal. De esta manera, el mayor espesor de la pared permite que la fracción de eyección, el gasto cardiaco y la presión telediastólica del ventrículo izquierdo permanezcan normales durante un periodo de tiempo prolongado.

Sin embargo, cuando la severidad de la estenosis y la hipertrofia continúan progresando, la mayor masa de células miocárdicas y la mayor fibrosis intersticial dan lugar a un ventrículo menos distensible y la presión telediastólica del ventrículo tiende a aumentar. La disfunción diastólica contribuye al inicio de los síntomas y puede persistir incluso después de la corrección de la estenosis. En este momento, la hipertrofia del ventrículo izquierda deja de ser adaptativa, llevando finalmente a la insuficiencia cardiaca.

La hipertrofia ventricular izquierda también conduce a un patrón de flujo coronario anómalo y a una disminución de la reserva de flujo coronario, que conduce a un estado de isquemia miocárdica relativa.



**Figura 6. Fisiopatología de la estenosis aórtica. Izquierda.** Válvula aórtica normal y válvula con estenosis aórtica. **Derecha.** Ventrículo izquierdo normal y ventrículo izquierdo hipertrofiado en respuesta a la sobrecarga crónica de presión.

Es interesante que el grado de hipertrofia ventricular izquierda se correlaciona solo débilmente al grado de obstrucción valvular. Parece que el grado de la respuesta hipertrofica está más asociado con otros factores, como la edad avanzada, el sexo masculino, la obesidad o la coexistencia de hipertensión arterial. Se cree que factores genéticos pueden modular el grado de hipertrofia en pacientes con estenosis aórtica,

habiéndose encontrado asociación entre polimorfismos del gen ACE<sub>1</sub>/D y variaciones en la masa ventricular izquierda<sup>5</sup>.

## 2.3 Presentación clínica

### a) Historia clínica

Los síntomas cardinales de la estenosis aórtica son la disnea de esfuerzo (sensación de falta de aire), la angina (opresión torácica), el síncope (pérdida brusca de conocimiento) y, finalmente, la insuficiencia cardiaca. Los síntomas suelen aparecer a la edad de 50-70 años en la estenosis aórtica sobre válvula bicúspide y por encima de los 70 años con la estenosis de una válvula trivalva calcificada.

La **disnea de esfuerzo** es la manifestación clínica más frecuente. Está en relación con la disfunción diastólica del ventrículo izquierdo, con un aumento excesivo de la presión telediastólica que lleva a una congestión pulmonar. También puede estar en relación con una capacidad limitada de aumentar el gasto cardiaco con el esfuerzo.

La **angina de esfuerzo** aparece en aproximadamente dos tercios de los pacientes con estenosis aórtica severa, de los que alrededor del 50% tienen una obstrucción arterial coronaria significativa asociada. En los pacientes sin enfermedad arterial coronaria, la angina se debe a la combinación de un aumento de la demanda de oxígeno por el miocardio hipertrofiado y una reducción del transporte de oxígeno secundario a una compresión excesiva de los vasos coronarios. En los pacientes con enfermedad arterial coronaria, la angina se debe a una combinación de obstrucción de arterias coronarias epicárdicas y un desequilibrio del oxígeno característico de la estenosis aórtica.

El **síncope** aparece como síntoma de presentación en aproximadamente el 10% de los pacientes con estenosis aórtica severa sintomática (o aproximadamente 3% de todos los pacientes con estenosis aórtica severa). Suele deberse a una reducción de la perfusión cerebral que se produce cuando la presión arterial se reduce a consecuencia de la vasodilatación sistémica inducida por el esfuerzo, en presencia de un gasto cardiaco fijo. También puede ser de causa arrítmica: fibrilación auricular transitoria con pérdida de la contribución auricular al llenado ventricular izquierdo que causa una reducción precipitada del gasto cardiaco, un bloqueo auriculoventricular transitorio causado por la extensión de la calcificación valvular hasta el sistema de conducción, o de forma poco frecuente por arritmias ventriculares.

Los síntomas de **insuficiencia cardiaca** como disnea intensa de esfuerzo, ortopnea, disnea paroxística nocturna y edema pulmonar, aparecen en fases relativamente tardías de la enfermedad.

b) Exploración física

A la auscultación cardiaca destaca un soplo sistólico eyectivo, más audible en focos de la base, con irradiación a carótidas, y con desaparición del segundo ruido aórtico cuando la estenosis es severa.

También es característica la presencia de un latido carotideo lento, de pico tardío y baja amplitud.

## **2.4 Herramientas diagnósticas**

a) Pruebas complementarias básicas: electrocardiograma y radiografía de tórax

No son pruebas que se requieran para el diagnóstico de la estenosis aórtica, pero se realizan habitualmente en la evaluación de pacientes que presentan síntomas cardiacos y hallazgos a la exploración que sugieran cardiopatía.

En el electrocardiograma es frecuente ver signos de hipertrofia ventricular izquierda, presentes en el 85% de los pacientes con estenosis aórtica severa. La fibrilación auricular se produce solo en el 10-15% de los pacientes con estenosis aórtica. La extensión de los infiltrados calcificados desde la válvula aórtica al sistema de conducción puede causar varias formas y grados de bloqueo auriculoventricular e intraventricular en el 5% de los pacientes con estenosis aórtica degenerativa.

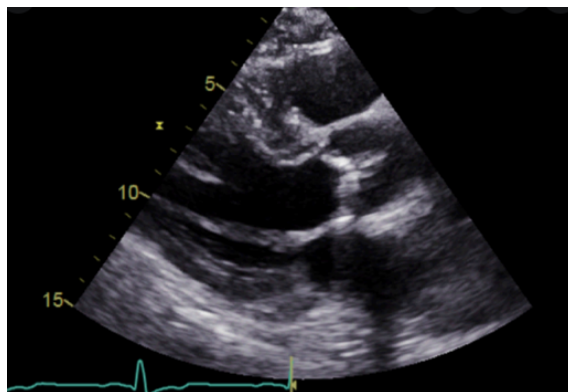
En la radiografía de tórax habitualmente el corazón tiene un tamaño normal o algo aumentado, a no ser que haya fracaso del ventrículo izquierdo y cause una cardiomegalia importante. Un hallazgo frecuente puede ser la dilatación de la aorta ascendente, especialmente en los pacientes con válvula aórtica bicúspide. En la proyección lateral en ocasiones se puede observar la calcificación valvular. Podemos evaluar la presencia de congestión pulmonar en pacientes con insuficiencia cardiaca.

b) Ecocardiografía

La ecocardiografía es la herramienta diagnóstica de elección, útil en la detección de la valvulopatía y en el seguimiento de la enfermedad.

Nos permite definir con precisión las características anatómicas de la válvula, incluidas la causa de la estenosis aórtica y la gravedad de la calcificación valvular. Asimismo, nos

permite evaluar la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la función ventricular (diastólica y sistólica), estimar las presiones pulmonares e identificar otras anomalías a nivel de otras válvulas o a nivel aórtico.



*Figura 7. Ecocardiograma en plano paraesternal eje largo de un paciente con estenosis aórtica severa.*

La ecocardiografía Doppler es la técnica preferida para evaluar la gravedad de la estenosis aórtica mediante la determinación de la velocidad del jet transaórtico, el gradiente medio de presión y el área valvular aórtica por la ecuación de continuidad.

**Tabla 1. Parámetros ecocardiográficos para determinar la gravedad de la estenosis aórtica.**

	Esclerosis	Leve	Moderada	Severa
Velocidad (m/seg)	< 2,5	2,6-2,9	3-4	>4
Gradiente medio (mmHg)		<20	20-40	>40
Área valvular aórtica (cm <sup>2</sup> )		>1,5	1-1,5	<1
Área valvular indexada (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )		>0,85	0,60-0,85	<0,60

La velocidad del flujo transaórtico es la medida más útil para valorar la gravedad de la enfermedad y representa la velocidad máxima del flujo de sangre a través de la válvula aórtica. Este parámetro ha demostrado predecir el comienzo de los síntomas y la evolución clínica de pacientes asintomáticos.

A partir de esta medida podemos calcular el gradiente de presión transaórtico máximo y medio mediante la ecuación de Bernouilli modificada. El gradiente máximo se corresponde con la diferencia máxima entre la presión de la aorta y la presión instantánea en el ventrículo izquierdo (gradiente de presión máximo (mmHg) = 4 x velocidad pico (m/seg)). El gradiente medio se calcula integrando el gradiente máximo en toda la

ecuación de la sístole. Representan la diferencia de presión entre la aorta y el ventrículo izquierdo en el periodo de eyección.

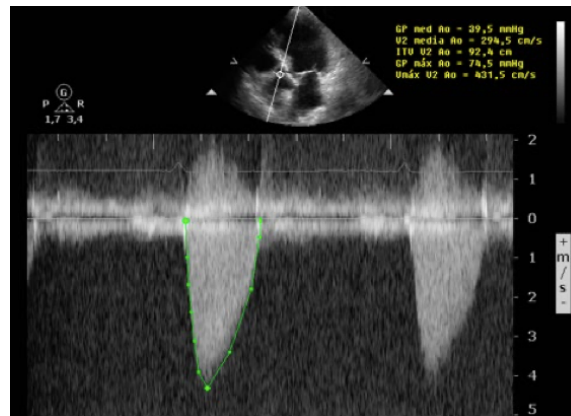


Figura 8. Doppler continuo de una estenosis aórtica severa.

El área valvular se calcula mediante la ecuación de continuidad. El cálculo se basa en el principio de continuidad de flujo:

$$AVA = (ITV_{TSVI} \times AST_{TSVI}) / ITV_{AO}$$

AVA, área valvular aórtica; ITV, integral velocidad-tiempo; TSVI, tracto de salida de ventrículo izquierdo; AO, aórtica; AST, área de la sección transversal.

El ecocardiograma, junto con una valoración clínica, serán necesarios en el seguimiento de los pacientes con estenosis aórtica asintomática: cada 6 meses en los pacientes con estenosis aórtica severa, anual en la estenosis aórtica leve-moderada con calcificación significativa o cada 2-3 años en pacientes con estenosis leve sin calcificación importante.

### c) Prueba de esfuerzo

La prueba de esfuerzo está contraindicada en los pacientes con estenosis aórtica severa sintomática.

En pacientes asintomáticos con estenosis aórtica severa se puede considerar la realización de prueba de esfuerzo para confirmar la ausencia de síntomas, por ejemplo, en pacientes con vida sedentaria o actividad física escasa permite desenmascarar síntomas. Si los pacientes desarrollan síntomas típicos durante la prueba deberían considerarse como sintomáticos.

d) Determinación de BNP en analítica de sangre

En pacientes con estenosis aórtica severa y síntomas dudosos (que pueden estar causados o no por la estenosis valvular) los niveles de BNP pueden ser útiles. Niveles elevados sugieren que los síntomas están en relación con la estenosis aórtica u otras causas de presiones de llenado cardiacas elevadas.

e) Cateterismo cardiaco

En casi todos los pacientes, el estudio ecocardiográfico proporciona la información hemodinámica importante necesaria para el tratamiento del paciente, y ahora se recomienda el cateterismo cardiaco sólo cuando ninguna prueba no invasiva es concluyente, cuando las observaciones clínicas y ecocardiográficas son discrepantes y para realizar la angiografía coronaria previa a la intervención quirúrgica.

f) Técnicas de imagen avanzadas: TAC y RMN cardiaca

El TAC cardiaco (tomografía axial computarizada) nos permite evaluar la calcificación de la válvula aórtica y el área valvular. Es útil para evaluar la dilatación aórtica en los pacientes con signos de afectación de la raíz aórtica en la ecocardiografía o la radiografía de tórax. Es necesario determinar las medidas aórticas a varias alturas, incluidos los senos de Valsalva, la unión sinotubular y la aorta ascendente, para tomar decisiones clínicas y planificar la intervención quirúrgica.

La RMN cardiaca (resonancia magnética nuclear) es útil para evaluar el volumen, la función y la masa del ventrículo izquierdo, especialmente en las situaciones en que esta información no puede obtenerse fácilmente con la ecocardiografía. Es capaz de evaluar la anatomía de la válvula aórtica y la gravedad de la estenosis aórtica. El uso de esta técnica no se ha generalizado para la evaluación de estos pacientes.

## **2.5 Historia natural**

La evolución clínica de los pacientes con estenosis aórtica está caracterizada por un periodo asintomático generalmente prolongado en el que el pronóstico es bueno y una fase sintomática corta en la que el pronóstico empeora drásticamente.

Inicialmente los pacientes presentan un engrosamiento valvular leve, sin obstrucción al flujo de salida (esclerosis aórtica). De estos pacientes el 16% presentará obstrucción

valvular al cabo de 1 año de seguimiento, pero solo el 2,5% sufrirá una obstrucción valvular severa una media de 8 años después del diagnóstico de esclerosis aórtica.

Cuando ya hay una estenosis aórtica moderada o severa, el pronóstico sigue siendo excelente mientras el paciente se mantenga **asintomático**, con un riesgo de muerte súbita <1% al año y una supervivencia libre de eventos del 20-50% a los 2 años<sup>6</sup>. No obstante, la naturaleza progresiva de la enfermedad obliga a un seguimiento periódico de estos pacientes. Existen ciertos factores que están asociados a mayor velocidad de progresión de la enfermedad y/o menor supervivencia sin episodios en pacientes asintomáticos, como son: BNP elevado, prueba de esfuerzo anómala, calcificación valvular moderada o severa, velocidad aórtica muy alta (>5-5,5 m/seg), aumento rápido de la velocidad aórtica, excesiva hipertrofia del ventrículo izquierdo, presencia de fibrosis miocárdica<sup>7</sup>...

Una vez que aparecen los **síntomas** el pronóstico es malo, con una escasa supervivencia (15-25% a los 5 años), a no ser que se alivie la obstrucción al flujo de salida<sup>8</sup>. En general, en pacientes con estenosis aórtica y función sistólica normal, los síntomas no se presentan hasta que la estenosis es severa.

Las curvas clásicas de supervivencia derivadas de estudios retrospectivos antiguos muestran que el intervalo desde el comienzo de los síntomas hasta el momento de la muerte es de aproximadamente 2 años en los pacientes con insuficiencia cardiaca, de 3 años en aquellos con síncope y de 5 años en aquellos con angina.

Series más recientes han confirmado el mal pronóstico, con una supervivencia media de solo 1-3 años después del comienzo de los síntomas<sup>9</sup>.

Entre los pacientes sintomáticos con estenosis aórtica, el pronóstico es peor cuando el ventrículo izquierdo ha fracasado y el gasto cardiaco y el gradiente transvalvular son bajos.

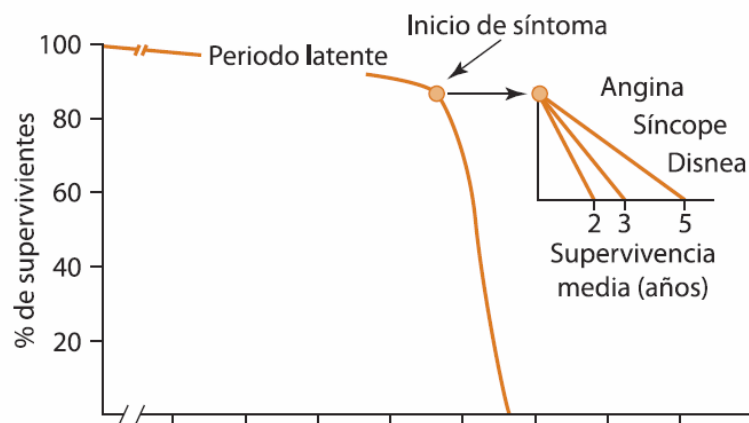


Figura 9. Historia natural de la estenosis aórtica.

## 2.6 Tratamiento

A pesar de muchos esfuerzos en investigación, actualmente no existe un tratamiento médico disponible que frene la progresión de la estenosis aórtica.

Cuando aparecen los **síntomas**, la sustitución valvular aórtica es el tratamiento de elección, por ser el único tratamiento que ha demostrado una mejoría importante de los síntomas y una clara mejoría de la supervivencia a largo plazo<sup>10</sup>. Ésta puede ser quirúrgica mediante la implantación de una prótesis biológica o mecánica, o percutánea mediante cateterismo con la implantación de una prótesis biológica transcáteter (TAVI: “transcatheter aortic valve implantation”), éste último indicado en los pacientes inoperables o con mayor riesgo quirúrgico. En ausencia de otras enfermedades que puedan limitar la esperanza de vida o la calidad de vida, la sustitución valvular aórtica está indicada en la mayoría de los pacientes con estenosis aórtica severa que estén sintomáticos. Dado el mal pronóstico de estos pacientes, esta intervención se debe realizar lo antes posible tras la aparición de síntomas.

El manejo de la estenosis aórtica severa **asintomática** continúa siendo hoy en día un tema de debate<sup>11</sup>. Los resultados de estudios recientes no proporcionan datos convincentes para respaldar la recomendación general de la sustitución valvular aórtica precoz, incluso en pacientes con estenosis asintomática muy severa. En la decisión de operar a los pacientes asintomáticos es preciso sopesar cuidadosamente los beneficios y los riesgos.

La cirugía electiva precoz está indicada en los casos excepcionales de pacientes con función del ventrículo izquierdo deprimida (fracción de eyección menor del 50%) no debida a otra causa, o en los pacientes con prueba de esfuerzo anormal, sobre todo si aparecen síntomas.

Cuando el riesgo quirúrgico es bajo y la prueba de esfuerzo es normal, se podría considerar la cirugía en presencia de factores predictores de progresión de enfermedad como velocidad pico  $>5,5$  m/s o la combinación de calcificación valvular importante y rápido incremento del pico de velocidad transvalvular ( $>0,3$  m/s por año).

En el resto, existe controversia. Hay autores que defienden una estrategia de seguimiento estrecho hasta la aparición de síntomas, dado que el riesgo de mortalidad inherente a la cirugía de recambio valvular aórtico (3-4%) es mayor que el riesgo de muerte súbita del paciente asintomático ( $<1\%$ ). Sin embargo, otros autores defienden una cirugía electiva



precoz, dado que se trata de un grupo muy heterogéneo de pacientes, algunos con una evolución no tan benigna, con riesgo de desarrollar cambios irreversibles en el miocardio que afecten a la evolución perioperatoria y postoperatoria a largo plazo. Los estudios que comparan ambas estrategias no son concluyentes.

En este ámbito, es importante continuar con la investigación de los mecanismos subyacentes al desarrollo de la estenosis aórtica que nos permitan desarrollar nuevas estrategias de intervención farmacológica, y es importante completar el conocimiento de los factores de riesgo que nos puedan hacer plantear la necesidad de una cirugía electiva precoz antes de que aparezcan los síntomas o cambios irreversibles en el ventrículo izquierdo.

### 3. La fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica

#### 3.1 Fisiopatología de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica

En los últimos años, la fibrosis miocárdica está adquiriendo un creciente interés como nuevo predictor independiente de evolución adversa en la estenosis aórtica.

La fibrosis miocárdica forma parte de la respuesta hipertrófica adaptativa a la sobrecarga de presión. En las fases iniciales, junto a la hipertrofia de los cardiomiocitos, aparece una **fibrosis reactiva intersticial difusa**. Se trata de un proceso difuso y microscópico que va a afectar a todo el intersticio. Esta fibrosis reactiva difusa puede ser reversible una vez corregida la estenosis.

En fases más avanzadas, el aumento de tamaño de los cardiomiocitos lleva a su degeneración, produciéndose una atrofia celular y finalmente la muerte del cardiomiocito, y en consecuencia la aparición de una **fibrosis focal de reemplazo**. Una vez establecida, ésta ya es irreversible. Este fenómeno de pérdida celular y fibrosis de reemplazo contribuye significativamente a las alteraciones morfológicas del proceso de remodelado y a la progresión de la disfunción sistólica del ventrículo izquierdo. Así pues, esta secuencia parece ser la responsable de la progresión de una hipertrofia adaptativa compensadora hacia la insuficiencia cardíaca<sup>12</sup>.

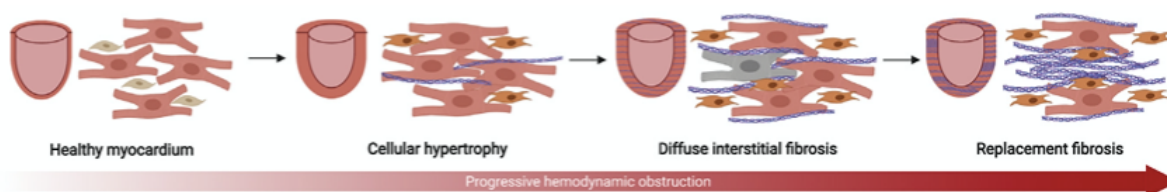


Figura 10. Remodelado miocárdico en la estenosis aórtica<sup>13</sup>.

Se trata de un proceso complejo, en el que intervienen múltiples factores y cuyos mecanismos y sistemas de regulación no son completamente conocidos.

a) Papel de los fibroblastos cardiacos

Los fibroblastos cardiacos tienen un papel clave en el proceso de fibrosis miocárdica. En respuesta a diversos estímulos (mecánicos, neurohormonales, inflamatorios...), los fibroblastos proliferan, se activan y se diferencian en miofibroblastos, aumentando así la producción de colágeno y otros componentes de matriz extracelular<sup>14</sup>. En este proceso la citoquina TGF- $\beta_1$  (factor de crecimiento transformante- $\beta_1$ ) y el sistema renina-angiotensina-aldosterona tienen un papel relevante. La angiotensina II, liberada localmente por la acción de la ECA (enzima convertidora de angiotensina), induce la expresión de TGF- $\beta_1$ , contribuyendo así a la proliferación celular y a la expresión de colágeno y proteínas de matriz extracelular<sup>15</sup>.

b) La muerte del cardiomiocito

La muerte del cardiomiocito se produce fundamentalmente por autofagia y oncosis, más que por apoptosis. Está provocada por fuerzas mecánicas directas, isquemia miocárdica (desajuste entre la demanda miocárdica de oxígeno aumentada y la reducción de la densidad de red de capilares coronarios) y favorecida por la acción de la angiotensina. La muerte del cardiomiocito estimula la activación del fibroblasto a nivel del miocardio afectado, también bajo la influencia del TGF- $\beta_1$  y la angiotensina<sup>12</sup>. Dada la escasa capacidad regenerativa de los cardiomiocitos, la fibrosis miocárdica en esta fase es una fibrosis reparativa para preservar la integridad estructural del corazón.

c) Participación de la inflamación y el estrés oxidativo

La inflamación también está implicada en este proceso. En condiciones de sobrecarga de presión, aumenta la presencia de macrófagos, mastocitos y linfocitos en el miocardio, contribuyendo a la activación de fibroblastos mediante la secreción de citoquinas como TGF- $\beta_1$ , TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ) o interleuquinas<sup>12, 14</sup>.

El estrés oxidativo está ligado al proceso de inflamación y fibrosis. El estrés miocárdico, la estimulación neurohormonal y el estado proinflamatorio, son condiciones que alteran el balance redox intracelular, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y reduciendo las defensas antioxidantes. La disfunción mitocondrial es clave en

este proceso, alterando la función y estructura celular. De esta manera, el estrés oxidativo contribuye a la estimulación de la hipertrofia del cardiomiocito, la inducción de apoptosis, la promoción de la fibrosis o la persistencia de la respuesta inflamatoria<sup>16</sup>.

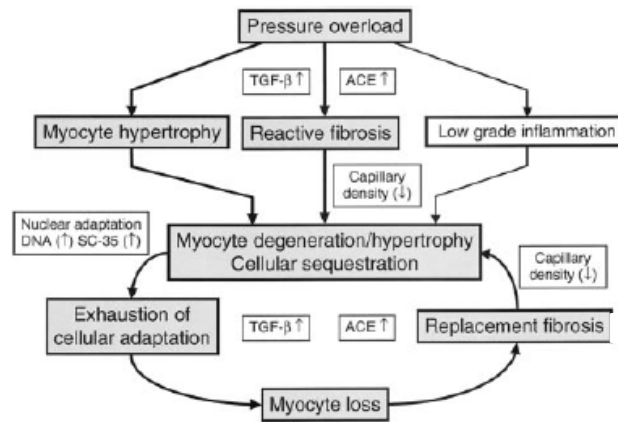


Figura 11. Esquema del remodelado en la hipertrofia por sobrecarga de presión<sup>12</sup>.

### 3.2 Importancia pronóstica

La fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica está asociada a mal pronóstico. Se asocia con un incremento en la rigidez del ventrículo izquierdo, lo cual genera un incremento de las presiones de llenado del ventrículo izquierdo y contribuye al desarrollo de disfunción diastólica<sup>17</sup> y a la aparición de síntomas. Posteriormente, en fases más avanzadas como hemos visto previamente, la función sistólica se ve también alterada debido a la muerte celular y aparición de fibrosis focal de reemplazo, llevando al desarrollo de insuficiencia cardíaca<sup>12</sup>.

Asimismo, la fibrosis miocárdica se ha asociado con la aparición de arritmias ventriculares y muerte súbita<sup>18</sup>.

Hay estudios que han demostrado una asociación entre la presencia de fibrosis miocárdica evaluada histológicamente en el momento de la cirugía y una peor evolución clínica postquirúrgica, con una peor recuperación de la función sistólica y un mayor riesgo de mortalidad<sup>19,20</sup>.

### 3.3 Cómo podemos evaluar la fibrosis miocárdica

La fibrosis miocárdica se puede detectar de forma invasiva mediante el estudio histopatológico de muestras de tejido de biopsia endomiocárdica. Previamente era el único método disponible. Es una técnica que tiene poca utilidad en la práctica clínica por

ser una técnica invasiva, con riesgo de complicaciones asociadas y que puede dar lugar a error de muestra ya que sólo evalúa una pequeña área miocárdica.

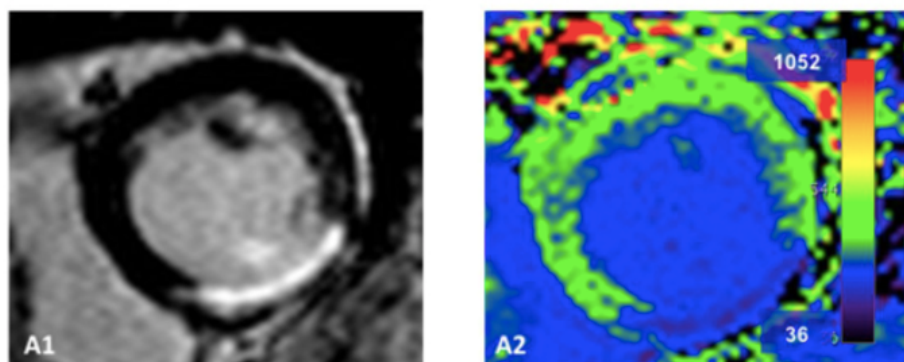
Hoy en día, la fibrosis miocárdica puede ser evaluada de forma segura y no invasiva mediante **RMN cardiaca**. La RMN cardiaca se ha convertido en la técnica de elección para el estudio de la fibrosis miocárdica<sup>21</sup>.

Es una técnica de imagen que se utiliza en la práctica clínica diaria para el estudio no invasivo de la estructura y función cardiaca. Es inocua, ya que no utiliza radiación ionizante. Ofrece una imagen muy detallada del corazón que nos va a permitir calcular de forma exacta y reproducible los volúmenes y función cardiaca.

En cuanto a sus limitaciones, es una técnica cara, de acceso limitado y contraindicada en ciertos pacientes como los portadores de dispositivos no compatibles o con insuficiencia renal severa (FG <30) para su uso con gadolinio.

Las **secuencias de T1 mapping** nos permiten identificar la fibrosis reactiva difusa. Es una técnica todavía no bien validada en los pacientes con estenosis aórtica y actualmente no es una técnica de uso rutinario en la práctica clínica diaria.

Las **secuencias de realce tardío** tras la administración de gadolinio nos van a permitir identificar y cuantificar la fibrosis focal de reemplazo de todo el miocardio y relacionarlo con sus consecuencias funcionales. El gadolinio identifica áreas de expansión extracelular como el edema miocárdico, necrosis, infiltración o fibrosis, como áreas hiperintensas, en contraste con el miocardio normal que se verá negro. Es una técnica bien conocida y validada, con utilidad diagnóstica e importante valor pronóstico en múltiples cardiopatías (cardiopatía isquémica, miocarditis, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatías infiltrativas...). Su papel en la estenosis aórtica lo veremos a continuación.



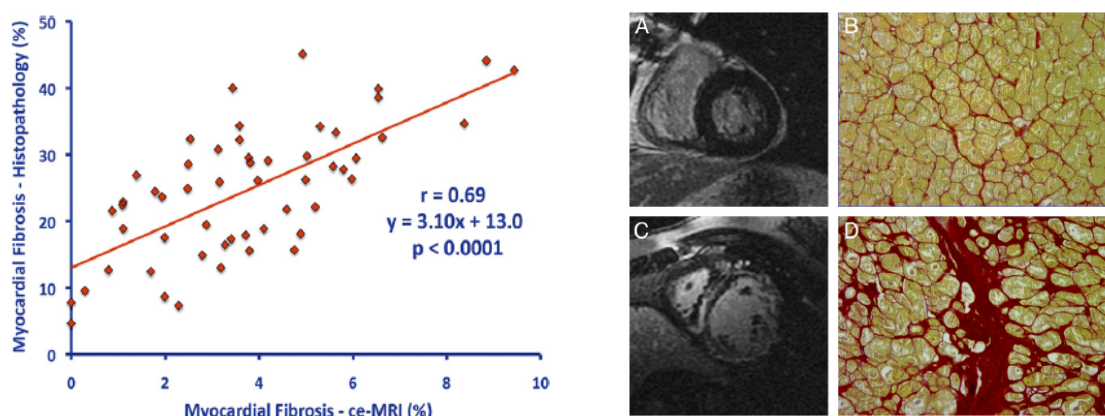
*Figura 12. Izquierda. Imagen de RMN cardiaca, secuencia de realce tardío. Derecha. Imagen de RMN cardiaca, secuencia T1 mapping<sup>21</sup>.*

#### 4. Evaluación de la fibrosis focal de reemplazo mediante RMN cardiaca en pacientes con estenosis aórtica

La fibrosis focal miocárdica de reemplazo en la estenosis aórtica ha sido ampliamente estudiada y validada mediante RMN cardiaca con las secuencias de realce tardío (RT) tras la administración de gadolinio.

El primer estudio en demostrar la presencia de fibrosis focal evaluada mediante resonancia en pacientes con estenosis aórtica fue publicado en Heart en 2006<sup>22</sup>. Estudiaron a 22 pacientes con estenosis aórtica y vieron que el 27% presentaba realce tardío focal, mostrando correlación con la severidad de la hipertrofia. Ya en este primer artículo propusieron que la RMN podía ser una herramienta útil en la evaluación de pacientes con estenosis aórtica severa, ya que la presencia de realce tardío focal podría indicar una fase más avanzada de la enfermedad y un remodelado adverso.

La extensión del realce tardío ha mostrado correlación con la extensión de la fibrosis intersticial en biopsia endomiocárdica<sup>19</sup>. Histológicamente se ha visto que las áreas de realce tardío co-localizan con áreas de fibrosis de reemplazo y microescaras.



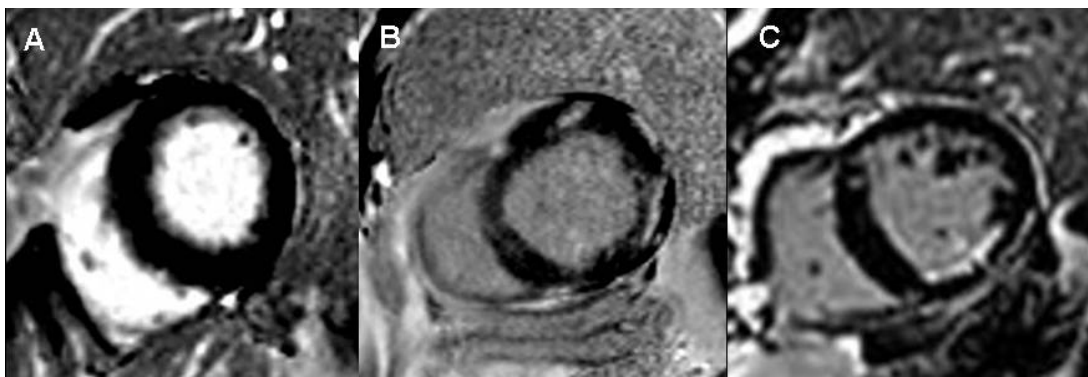
*Figura 13. Izquierda. Gráfica de regresión lineal que muestra buena correlación lineal entre la fibrosis miocárdica medida por histopatología y por RMN cardiaca. Derecha. Ilustración que muestra ejemplo de correlación entre fibrosis miocárdica por histopatología y RMN cardiaca<sup>19</sup>.*

La fibrosis focal tiene una prevalencia del 27-62% en este grupo de pacientes, según las series. Entre los pacientes con realce tardío, se han descrito dos tipos de patrones: intramiocárdico y subendocárdico<sup>23</sup>.

El **patrón intramiocárdico** es el más frecuente. Tiene distribución parcheada, pudiendo aparecer en varios focos, sin relación con un territorio coronario. Está asociado con una mayor masa ventricular izquierda, independientemente de la severidad de la estenosis

aórtica y de la presencia de hipertensión arterial, por lo que otros factores deben de estar involucrados (edad, sexo masculino, diferentes genotipos...)

El **patrón subendocárdico** es más frecuente en pacientes con enfermedad coronaria coexistente, si bien también puede aparecer en ausencia de enfermedad coronaria. En ausencia de enfermedad coronaria, este patrón puede responder a la reducción relativa del flujo coronario en relación con la hipertrofia ventricular izquierda concéntrica y que las fuerzas de compresión son mayores a nivel subendocárdico, estando el flujo más comprometido a este nivel. Este patrón está asociado a ventrículos más dilatados y con menor fracción de eyección.

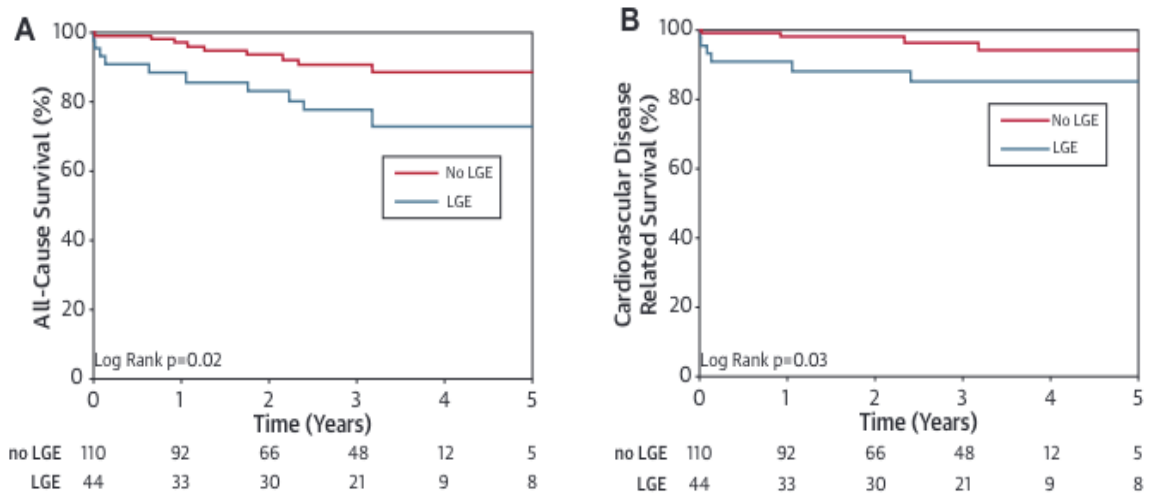


*Figura 14. Patrones de realce tardío. A. No realce tardío. B. Realce tardío intramiocárdico. C. Realce tardío subendocárdico.*

Se ha demostrado que la presencia y la cuantificación del realce tardío en los pacientes con estenosis aórtica severa tienen correlación con el remodelado ventricular izquierdo (más masa ventricular izquierda, más dilatación del ventrículo izquierdo y menor fracción de eyección del ventrículo izquierdo)<sup>24</sup>, así como un importante impacto en la evolución clínica de estos pacientes.

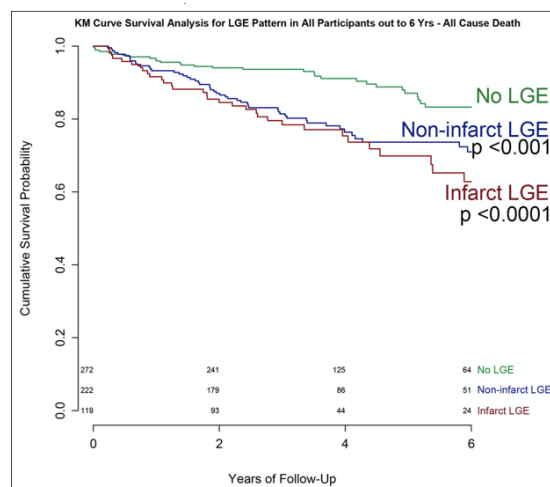
Sabemos que existe correlación entre el grado de fibrosis y la situación clínica del paciente antes de la cirugía: los pacientes con fibrosis focal miocárdica estaban más sintomáticos, con peor grado funcional y cifras más elevadas de BNP<sup>25</sup>. Después de la cirugía, al ser irreversible, la evolución clínica a largo plazo también es peor, con menor mejoría sintomática y peor recuperación de la función ventricular izquierda<sup>19</sup>.

Cinco estudios han confirmado que la presencia de realce tardío es un predictor independiente de mortalidad, que aporta valor incremental a otras variables clínicas como la fracción de eyección del ventrículo izquierdo o la comorbilidad<sup>19, 23, 26, 27, 29</sup>.



**Figura 15.** Curvas de supervivencia Kaplan Meier en pacientes sometidos a cirugía cardiaca según la presencia o ausencia de RT detectado en estudio preoperatorio con RMN cardiaca. **A.** Mortalidad por todas las causas. **B.** Mortalidad cardiovascular. Los pacientes sin RT presentaron una mayor supervivencia que los pacientes con RT<sup>27</sup>.

Una vez que la fibrosis miocárdica de reemplazo se establece, ésta va progresando rápidamente. Es importante tener en cuenta que este proceso sólo se frena con la sustitución valvular aórtica, por lo que la carga de fibrosis que el paciente acumule antes de la cirugía valvular, dado que ésta es irreversible, persistirá con él hasta su muerte<sup>28</sup>. Esto hace que el mal pronóstico asociado con la presencia de realce tardío persista a largo plazo después de la sustitución valvular. En un estudio con una mediana de seguimiento de 3,6 años, la presencia de fibrosis focal fue un predictor independiente de mortalidad por todas las causas y mortalidad cardiovascular después de la cirugía. Además, esta asociación es dosis dependiente, pues a mayor carga de fibrosis focal, mayor riesgo de mortalidad<sup>29</sup>.



**Figura 16.** Mortalidad por todas las causas en pacientes con estenosis aórtica severa en función del patrón de RT (no RT, RT intramiocárdico o RT subendocárdico)<sup>29</sup>.

Actualmente, está en marcha el estudio EVOLVED que pretende investigar si los pacientes con estenosis aórtica con realce tardío en RMN cardiaca se pueden beneficiar de una sustitución valvular precoz antes de que progrese la fibrosis y la disfunción ventricular<sup>30</sup>.

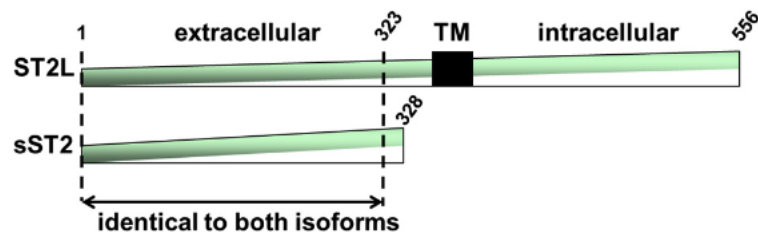
## 5. sST2 como biomarcador de fibrosis miocárdica

### 5.1 Biología del ST2

El sST2 es un nuevo biomarcador asociado al proceso de fibrosis y remodelado miocárdico. Es un miembro de la familia de receptores de la interleuquina (IL)-1, con dos isoformas: una transmembrana o celular (ST2L) y otra soluble o circulante (sST2).

Inicialmente, se relacionó con procesos inflamatorios e inmunológicos como el asma, la fibrosis pulmonar, la artritis reumatoide, las enfermedades vasculares del colágeno o la sepsis<sup>31</sup>. No es hasta 2002 cuando se publicó que ST2 se expresaba en células cardiacas en respuesta al estrés miocárdico, otorgándole un papel en la fisiopatología del sistema cardiovascular<sup>32</sup>.

El gen ST2 tiene dos promotores los cuales son capaces de influir en el mecanismo de la regulación transcripcional del gen para expresar mRNA de sST2 o de ST2L. No se conocen bien los mecanismos por los que se regula la traducción del gen por estos dos promotores en su forma S o L. Es importante destacar, que factores genéticos parecen contribuir en más del 40% de la variabilidad interindividual en los niveles de sST2<sup>33</sup>.



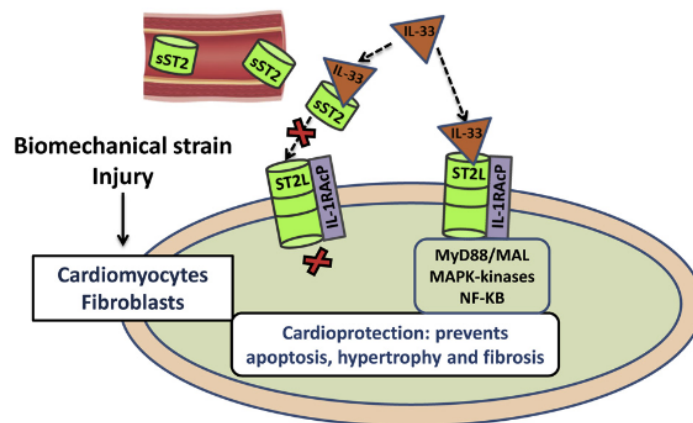
*Figura 17. El gen sST2 codifica dos isoformas principales: una transmembrana o celular (ST2L) y otra soluble o circulante (sST2)<sup>31</sup>.*

ST2L se expresa en cardiomiocitos y fibroblastos, y funciona como receptor transmembrana de la interleuquina-33 (IL-33). La IL-33 es una citoquina miembro de la familia de la IL-1 $\beta$  y puede ser secretada por la mayoría de las células en respuesta a un daño (por ejemplo, fibroblastos cardiacos en respuesta a una sobrecarga mecánica). La



IL-33 ejerce su función celular uniéndose a su receptor ST2L. La unión IL-33/ST2L activa la proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK) y varias vías de señalización intracelular. La suma de estos eventos lleva a la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), un regulador clave de los procesos inflamatorios<sup>34</sup>. El sistema IL-33/ST2L está sobrerregulado en respuesta a un estrés miocárdico. La interacción entre IL-33 y ST2L es cardioprotectora: reduce la fibrosis miocárdica, previene la hipertrofia de cardiomiocitos, reduce la apoptosis y mejora la función miocárdica. Si se bloquea el receptor ST2L se eliminan los efectos cardioprotectores de la IL-33. Los beneficios de la IL-33 son ST2L dependientes<sup>35</sup>.

En cambio, la forma soluble de ST2 (sST2) funciona como “señuelo” secuestrando a la IL-33, de forma que tiene un efecto contrario al inhibir la respuesta de ST2L/IL-33, favoreciendo la inflamación, fibrosis e hipertrofia del tejido afectado. sST2 es producido por fibroblastos cardiacos y cardiomiocitos en respuesta a un daño o estrés, pero también existe producción fuera del miocardio a nivel de células endoteliales (aorta, arterias coronarias y a nivel microvascular en el corazón)<sup>31</sup>.

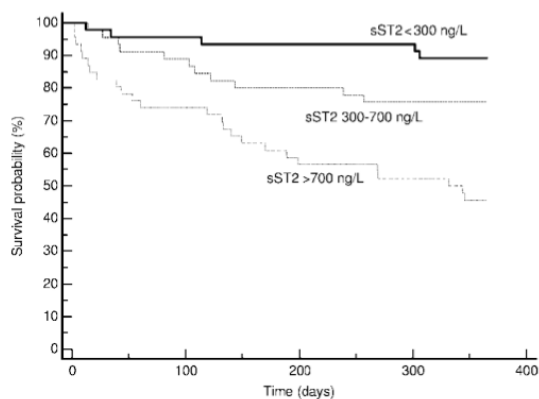


*Figura 18. Representación esquemática de la señalización de IL-33 y su interacción con el receptor de membrana ST2L y el receptor soluble “señuelo” sST2<sup>31</sup>.*

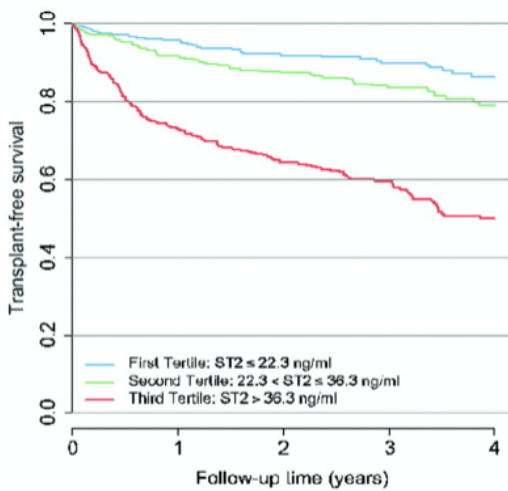
Todavía existen muchas cuestiones sin resolver acerca de este sistema y del papel que juega en la patología cardíaca. No está claro cómo se regula la producción de sST2, ni cuáles son los factores que hacen aumentar el sST2 y producir una pérdida del efecto cardioprotector. No está claro el papel de la fuente extracardiaca del sST2. Tampoco se conoce si el sST2 por si mismo (sin unirse a la IL 33) puede tener efectos adversos sobre

las células miocárdicas. Sería interesante investigar si intervenciones terapéuticas que pudieran reducir la producción de sST2 pudiera tener beneficio cardiovascular.

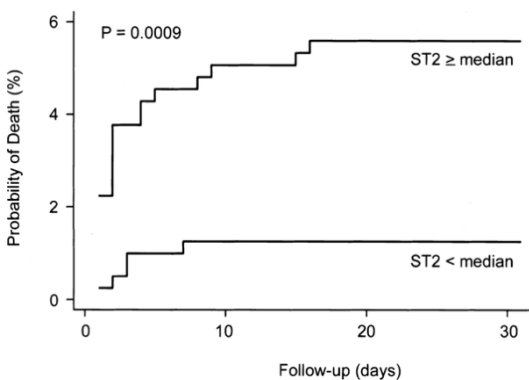
En los últimos años, el conocimiento sobre el papel del sST2 en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares se ha expandido ampliamente, asociándose a la disfunción miocárdica, fibrosis y remodelado. La concentración de sST2 en sangre está aumentada en ciertas enfermedades cardíacas y se ha demostrado su valor pronóstico en diversas entidades clínicas como la insuficiencia cardíaca (IC) aguda<sup>36</sup> y crónica<sup>37</sup> o la cardiopatía isquémica<sup>38</sup>.



**Figura 19.** Supervivencia de pacientes con IC aguda estratificados según concentración de sST2 en suero. Los pacientes con IC aguda con niveles elevados de sST2 presentaron un mayor riesgo de mortalidad. Los niveles de sST2 elevados se asociaron fuertemente y de forma independiente a la mortalidad por todas las causas a 1 año<sup>36</sup>.



**Figura 20.** Incidencia de mortalidad por todas las causas o trasplante cardíaco en pacientes con IC crónica de acuerdo a los niveles de sST2. sST2 es un potente marcador de riesgo en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. Los pacientes con mayores niveles de sST2 tenían mayor riesgo de mortalidad o trasplante cardíaco<sup>37</sup>.

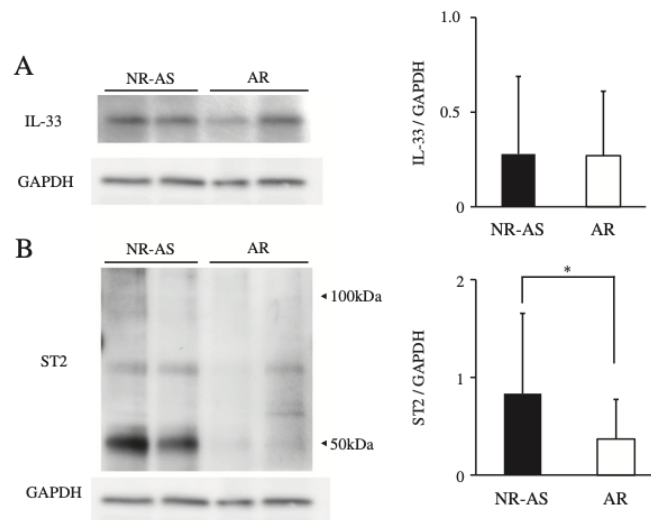


**Figura 21.** Probabilidad de muerte a los 30 días tras IAMSEST (infarto agudo de miocardio sin elevación de segmento ST) en función de los niveles de sST2. Los niveles de sST2 predicen mortalidad e insuficiencia cardíaca en pacientes con infarto agudo de miocardio<sup>38</sup>.

En la estenosis aórtica todavía es poca la evidencia acerca del papel que puede tener el sST2 en la fisiopatología de la enfermedad y como biomarcador pronóstico.

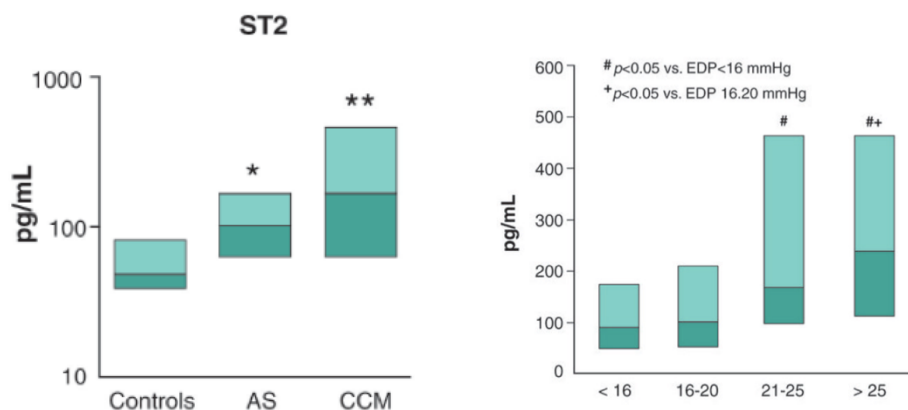
## 5.2. Papel fisiopatológico del ST2 en la estenosis aórtica

En 2013 se observó que IL-33 y ST2 se expresan en válvula aórtica. Mientras que la expresión de IL-33 era similar, la expresión de ST2 estaba sobreexpresada en válvulas aórticas con estenosis, en comparación con válvulas aórticas con insuficiencia, indicando que el sistema IL-33/ST2 podría estar involucrado en la fisiopatología de la estenosis aórtica<sup>39</sup>.



**Figura 22.** Expresión de IL-33 y ST2 en válvulas aórticas con estenosis no reumática (NR-AS) y con insuficiencia (AR)<sup>39</sup>.

En 2008 se describió que los niveles de sST2 en suero están elevados en pacientes con estenosis aórtica severa en respuesta a la sobrecarga crónica de presión. Los niveles de sST2 se relacionan con la carga diastólica. Se observó que la producción de sST2 no sólo era a nivel miocárdico, sino que también se produce en células endoteliales<sup>40</sup>.



**Figura 23.** Izquierda. Niveles de sST2 en pacientes con estenosis aórtica en comparación con controles. Derecha. Relación entre los niveles de sST2 y la extensión de la carga diastólica evaluada como presión telediastólica de ventrículo izquierdo<sup>40</sup>.

### 5.3 Papel pronóstico del sST2 en la estenosis aórtica

En 2015 se publicó un estudio que demostró que los niveles de sST2 se asocian con la severidad de los síntomas y con la evolución en los pacientes con estenosis aórtica<sup>41</sup>. Se observó una buena asociación entre el estado sintomático y los niveles de sST2, aumentando gradualmente de acuerdo a la clase NYHA. Así se postula que el sST2 puede ser útil en discriminar entre los pacientes sintomáticos y asintomáticos, y diferenciar entre los síntomas precoces de IC y la normal tolerancia al ejercicio. Los niveles de sST2 se relacionan con la severidad de la estenosis aórtica y con la carga diastólica. En los pacientes asintomático, niveles elevados de sST2 (>23 ng/mL) se relacionan con mayor riesgo de desarrollar síntomas o evento cardiaco en el seguimiento.

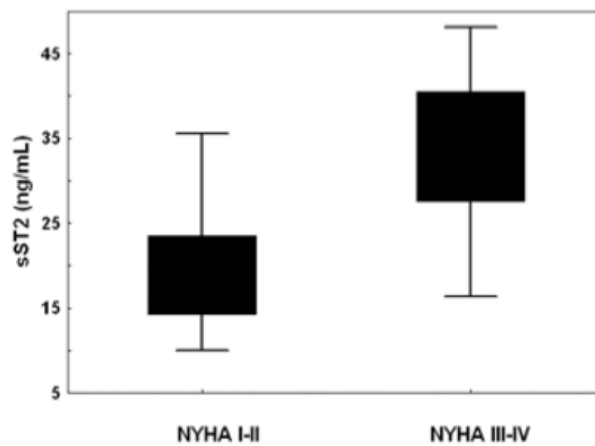
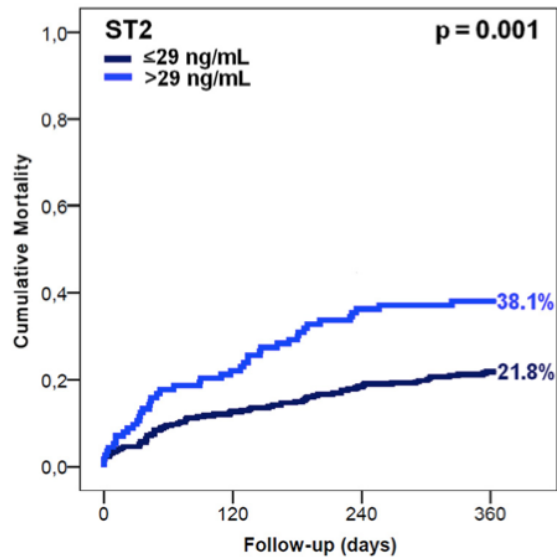


Figura 24. Niveles de sST2 en asociación con clase funcional NYHA<sup>41</sup>.

En 2017 se publicaron dos estudios que evaluaban el papel de sST2 como predictor de mortalidad en pacientes con estenosis aórtica severa sometidos a implantación de una válvula aórtica transcatóter. En ambos se observó que el sST2 tiene valor pronóstico en este grupo de pacientes, asociándose a un aumento de mortalidad. Niveles basales de sST2 >29 ng/ml se asociaron con una evolución adversa tras TAVI, con un aumento significativo de mortalidad a los 30 días y al año de la intervención<sup>42</sup>.

Los niveles elevados de sST2 fueron predictores de mortalidad y de eventos cardiovasculares mayores (MACE). Además, aporta un valor pronóstico añadido a las escalas de riesgo establecidas como el STS risk score<sup>43</sup>. Así pues, parece que el sST2 puede resultar útil en la estratificación del riesgo de mortalidad en este grupo de pacientes.



*Figura 25. Curva Kaplan-Meier mostrando mortalidad al año en pacientes con estenosis aórtica severa a los que se implantó TAVI, de acuerdo a sus niveles basal de sST2. La mortalidad fue significativamente más alta en pacientes con sST2 >29 ng/ml (38,1% vs 21,8%, p=0,001)<sup>42</sup>.*

Queda todavía mucho por conocer acerca del papel que ejerce el sST2 en la fisiopatología del desarrollo de fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica, así como en el ámbito clínico, como biomarcador pronóstico y como posible herramienta clínica que pueda ayudar en el manejo de estos pacientes.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1. Hipótesis

El presente estudio se plantea desde un punto de vista traslacional con una doble hipótesis:

1. El sST2 tiene un papel fisiopatológico en la estenosis aórtica severa, favoreciendo el estrés oxidativo afectando a la función mitocondrial, aumentando la inflamación y promoviendo la activación de fibroblastos, induciendo la secreción de colágeno y la producción de marcadores profibróticos en fibroblastos cardiacos humanos.
2. Desde el punto de vista clínico, los niveles circulantes de sST2 en pacientes con estenosis aórtica severa se correlacionan con la presencia y cantidad de fibrosis focal miocárdica de reemplazo evaluada mediante RMN cardiaca.

## 2. Objetivos

- Realizar un estudio proteómico para estudiar los mecanismos por los que el sST2 induce la activación de los fibroblastos cardiacos, promueve la fibrosis cardiaca y favorece el estrés oxidativo y la inflamación.
- Analizar los efectos *in vitro* de la acción del sST2 en fibroblastos cardiacos humanos sobre marcadores de inflamación, estrés oxidativo y fibrosis.
- Validar los resultados *in vitro* sobre fibrosis en un modelo de rata con sobrecarga de presión.
- Estudiar la asociación de parámetros de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica.
- Estudiar en una cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa e indicación de sustitución valvular aórtica la relación existente entre los niveles de sST2 en sangre y la presencia y extensión de la fibrosis focal miocárdica evaluada mediante RMN cardiaca.
- Evaluar si el sST2 en suero nos permite identificar con una sensibilidad y especificidad adecuadas a los pacientes con fibrosis focal miocárdica evaluada mediante RMN cardiaca.

# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. Experimentos con fibroblastos cardiacos humanos

### 1.1 Cultivo de fibroblastos cardiacos humanos

Para los estudios *in vitro*, se utilizaron fibroblastos cardiacos humanos (Promocell). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo 3 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1 ng/mL FGF2 y 5 µg/mL rh-insulina. Las células se usaron entre los pases 4-6. Todos los ensayos se realizaron a 37°C, aire estéril al 95% y 5% CO<sub>2</sub> en un incubador de saturación humidificada.

### 1.2 Tratamientos

Las células fueron tratadas con sST2 (2 µg/ml, R&D Systems) durante 24 horas para evaluar el efecto de sST2 sobre marcadores de inflamación, fibrosis y estrés oxidativo. En otros experimentos, los fibroblastos fueron tratados con NRP-1 recombinante humana (10<sup>-10</sup>-10<sup>-8</sup> M, R&D Systems) durante 5, 10, 15, 30 y 60 minutos o 24 horas. El inhibidor de NF-κB BAY-11-7082 (Santa Cruz Biotechnology) se añadió a 10<sup>-6</sup> M 30 minutos antes de los tratamientos con sST2 o NRP-1.

### 1.3 Análisis proteómico por espectrometría de masas

Se realizó un análisis proteómico en fibroblastos tratados y no tratados con sST2 mediante iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation). Los experimentos se realizaron utilizando triplicados técnicos. Después del análisis MS/MS, la identificación de proteínas se realizó con el software ProteinPilot™ (versión 4.5; Sciex) usando el algoritmo Paragon™. Aunque la cuantificación relativa y el análisis estadístico se realizó con el software ProteinPilot™, se aplicó un punto de corte adicional para las ratios del iTRAQ (ratio <0.77 or >1.3) y se consideró un valor de p <0.05 para clasificar las proteínas sobreexpresadas o reprimidas al menos en 2 replicados biológicos.

### 1.4 Silenciamiento de NRP-1 por edición genómica mediante CRISP/Cas9

El silenciamiento (“knockdown”) de NRP-1 se realizó por medio de edición genómica guiada por CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindrome repeats). Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a una confluencia del 70% y transfectadas con un conjunto de tres plásmidos, cada uno codificando la nucleasa Cas9 y un ARN guía específica de 20 nucleótidos diseñada para una eficiencia máxima de

silenciamiento de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Santa Cruz Biotechnology). Una mezcla de plásmidos de ARN guía CRISPR/Cas9 se utilizó como control. Una vez que se generó el silenciamiento de NRP-1, las células se cultivaron en un medio completo. Se trataron con sST2 durante 24 horas. Los extractos celulares y sobrenadantes fueron recogidos para analizar los marcadores de inflamación, fibrosis y estrés oxidativo mediante ELISA y Western Blot.

## **2. Modelo animal**

En modelo animal se utilizaron ratas macho Wistar de 250 g de peso aproximadamente (Harlan Iberica, Barcelona, España). Las ratas fueron distribuidas en dos grupos diferentes: grupo control (Control, n=7) y grupo sometido a sobrecarga de presión del ventrículo izquierdo mediante el pinzamiento parcial de la aorta ascendente (PA, n=7). El pinzamiento parcial de la aorta ascendente se realizó mediante la colocación de un clip hemostático por los Laboratorios Harlan como ya se ha descrito previamente, y de acuerdo con un método utilizado por varios autores. Transcurridas 6 semanas de tratamiento, las ratas fueron finalmente sacrificadas previa anestesia con una mezcla de ketamina (Imalgene 1000) 70 mg/kg y xilacina (Rompun 2%) 6 mg/kg, por decapitación mediante el empleo de guillotina. El efecto de la anestesia se evaluó mediante métodos veterinarios estandarizados que incluyen la ausencia de reflejos musculares, pérdida del tono de la mandíbula y de los reflejos oculares y el cambio en el tamaño de la pupila. Una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción de todas las muestras, centrándose nuestro estudio en el miocardio.

El Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid aprobó todos los experimentos de acuerdo con las guías éticas para el cuidado de animales experimentales de la Unión Europea.

El peso corporal se midió una vez por semana. Asimismo, la ingesta tanto de agua como de comida fue controlada a través de todo el periodo experimental.

La presión arterial sistólica se midió semanalmente de manera indirecta en la arteria caudal de la cola de las ratas mediante un método pletismográfico (Narco Bio-Systems, Houston, Tx USA). Días antes de comenzar el experimento se acostumbró diariamente a las ratas al proceso de medida de la presión que consistía en mantener las ratas en una

habitación con una temperatura mantenida a 28° C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se les medía la presión arterial sistólica. Una vez que los animales se acostumbraron al proceso de medida, se determinó la presión arterial sistólica, siendo ésta la media aritmética de ocho medidas sucesivas en dos días consecutivos y la misma hora.

### **3. Análisis de biopsias miocárdicas**

Se obtuvieron biopsias miocárdicas humanas de pacientes con estenosis aórtica severa durante el procedimiento quirúrgico de sustitución valvular (n 26) y fueron enviadas al laboratorio en un contenedor estéril y en suero salino a temperatura ambiente.

Como controles se utilizaron biopsias miocárdicas de personas sin antecedentes de enfermedad cardiovascular previa obtenidas de autopsias (n 10).

Las muestras fueron rápidamente seccionadas en dos piezas. Una pieza fue fijada en formol y embebida en parafina para realizar análisis histológicos y la otra fue congelada en nitrógeno líquido para realizar técnicas de biología molecular (RT-PCR, Western Blot y ELISA). Tanto las técnicas histológicas como las de biología molecular se detallan más adelante, ya que son comunes a los diversos modelos celulares y animales utilizados en este estudio.

### **4. Técnicas de laboratorio empleadas**

#### **4.1 Análisis histológico**

Las tinciones tisulares se llevaron a cabo en secciones transversales de miocardio humano y de rata. Las muestras se deshidrataron en baños crecientes de alcohol etílico y finalmente en xilol. Una vez deshidratado el tejido se incluyó en parafina líquida a 56° hasta su posterior análisis. Los bloques incluidos en parafina se cortaron en secciones de 5 µm con un microtomo de rotación (Leica).

Las secciones fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos para bloquear la actividad peroxidasa. Todas las secciones fueron bloqueadas con suero de cabra al 5% normal en PBS durante una hora e incubadas durante la noche con sST2 (Sigma, 1:100) o MFN-1 (Santa Cruz, 1:100), lavadas tres veces, y después incubadas durante 30 minutos con el

polímero marcado por peroxidasa de rábano picante conjugado a anticuerpos secundarios (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). La señal se relevó utilizando el sustrato diaminobencidina (Leica).

## **4.2 ELISA**

En los sobrenadantes de células tratadas se midieron las siguientes moléculas mediante ELISAS comerciales (R&D Systems) siguiendo las indicaciones de sus protocolos: peróxido de hidrógeno, IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL-2, NRP-1, fibronectina, colágeno I, Gal-3, TGF- $\beta$ , MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2. Los resultados se normalizaron usando el control como calibrador.

## **4.3 PCR en tiempo real por transcripción reversa**

El ARN total de las biopsias miocárdicas humanas, de los fibroblastos cardiacos y de los corazones de rata se extrajo con Reactivo Trizol (Euromedex, Souffelweyersheim, France) y fue purificado utilizando el equipo RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se sintetizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche). El ARN se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) empleando la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. La retrotranscripción del ARNm se realizó en un volumen de 20  $\mu$ l. De cada muestra se incubaron 5  $\mu$ g de ARN, con un cebador de Oligo (dT) (500 mg) el cual hibrida con la cola Poli-A del ARNm, a una temperatura de 70°C (temperatura de hibridación del cebador) durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron los reactivos para la retrotranscriptasa cuyas concentraciones fueron: 1x de tampón de reacción RT, dNTPs (1mM), DTT (10mM), PowerScript<sup>TM</sup> -RT (0.125U/ $\mu$ l). La reacción se realizó en un termociclador durante 90 minutos a 42°C, tras este periodo la enzima se desactivó calentando la mezcla de reacción a 70°C durante 15 minutos. Una vez finalizada la reacción, las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

El análisis de PCR cuantitativo se llevó a cabo utilizando tecnología SYBR Green PCR (Biorad). El SYBR Green es un colorante que se une al ADN de doble cadena por el surco menor del ADNds incrementando su fluorescencia unas cien veces.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla de reacción se preparó añadiendo: 5  $\mu$ l de cada muestra estando todas las muestras a la misma concentración de ADNc, 6  $\mu$ l de agua ultrapura, 0.75  $\mu$ l de cebador sentido, 0.75  $\mu$ l de cebador antisentido, y 12.5  $\mu$ l de mezcla Fast Start DNA Master SYBR Green, la cual

contiene dNTP, la polimerasa Fast Start y el fluorocromo SYBR Green. Los cebadores usados son específicos para las secuencias de humano, y se muestran en la **Tabla 1**. Se midieron las siguientes moléculas: sST2, ST2L, IL-33, NRP-1, DRP-1, MFN-1, MFN-2, PHB-1, PHB-2, PGC-1 $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL-2, OPA-1. Se utilizaron HPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa), GADPH y  $\beta$ -actina como gen de control endógeno. La cuantificación relativa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del software MyiQ (Bio-Rad). Los datos fueron normalizados por HPRT y niveles de  $\beta$ -actina y expresados como porcentaje relativo a los controles. Todas las PCR se realizaron al menos por triplicado para todas las condiciones experimentales.

**Tabla 1. Cebadores utilizados en humanos en PCR en tiempo real por transcripción reversa.**

Gen	Cebador	Secuencia (5' a 3')
DRP-1	Forward	GGC GCC GAC ATC A
	Reverse	GCT CTG CGT TCC CAC TAC GA
MFN-1	Forward	GGC ATC TGT GGC CGA GTT
	Reverse	ATT ATG CTA AGT CTC CGC TCC AA
MFN-2	Forward	TGA TGG GCT ACA ATG ACC AG
	Reverse	AGC TTC TCG CTG GCA TGC
PHB	Forward	GCA GGA CAT TGT GGT AGG GG
	Reverse	GCT GGT GAA GAT GCG AGG AA
HPRT	Forward	TTG CTT TCC TTG GTC AGG CA
	Reverse	ATC CAA CAC TTC GTG GGG TC
$\beta$ -actin	Forward	GCC GCC AGC TCA CCA T
	Reverse	TCG ATG GGG TAC TTC AGG GT
GADPH	Forward	ACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAG
	Reverse	TTCAAGGGGTCTACATGGCAACTGF
PGC-1 $\alpha$	Forward	TCCCGATCACCATATTCC
	Reverse	TTCAAGAGCAGCAAAAAGC
IL-6	Forward	AGTTCCTGCAGAAAAAGGCAAAG
	Reverse	CATTTGCCGAAGAGCCCTCA
IL-1 $\beta$	Forward	AGCTGATGGCCCTAAACAGA
	Reverse	GCATCTTCTCAGCTTGTC
CCL-2	Forward	TCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA
	Reverse	TTTGCTTGCCAGGTGGTCC
OPA-1	Forward	GGCCAGCAAGATTAGCTACG
	Reverse	ACAATGTCAGGCACAATCCA
NRP-1	Forward	CTCCTGTTGTGTCTTCAGG
	Reverse	CCCGATGAGGATCGGATTC
sST2	Forward	CGTTACCTTCTGTGCCATT
	Reverse	CTCCATTTGCCAATCATGTG
ST2L	Forward	AGTTGTGCATTTACGGGAGAG
	Reverse	GGATACTGCTTTCCACCACAG
IL-33	Forward	TGGCCTCACCATAAGAAAGG
	Reverse	GCAAACGCTTGATACTGC

#### **4.4 Western blot**

Alicuotas de 10 µg de proteínas de corazón de rata o de fibroblastos fueron desnaturalizadas calentándolas a 95°C durante 5 minutos en presencia de β-Mercaptoetanol y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Para llevar a cabo la electroforesis, se prepararon geles inferiores de acrilamida a diferentes concentraciones para separar las proteínas a estudiar. Posteriormente, se preparó un gel superior con una concentración de acrilamida al 4%. Una vez completada la carga en los geles superiores, se sumergió todo el sistema en la solución de electroforesis y se aplicó una corriente a un amperaje constante de 50 mA durante una hora y media aproximadamente, creando un campo eléctrico que separó las proteínas de las muestras. Una de las calles del gel se empleó para el marcador de peso molecular conocido. Finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia utilizando el sistema rápido de Biorad durante 7 minutos. Para la inmunodetección se bloquearon las membranas en PBS-Tween al 0.1% con un 5% de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente. Las condiciones de cada inmunodetección, incluyendo las condiciones de incubación con el anticuerpo primario, son específicas para cada proteína a estudiar. Se detectaron las siguientes proteínas: MFN-1, MFN-2, nitrotirosina, DRP-1, PGC-1α, PHB-1, PHB-2, CML, MDA, OPA-1, IL-33, NRP-1, α-SMA, vimentina, colágeno 3, CTGF, NF-κB. El revelado empleado para visualizar las proteínas fue la quimioluminiscencia usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

### **5. Estudio de una cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa con indicación quirúrgica**

Se realizó un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron de forma consecutiva 79 pacientes con estenosis aórtica severa con indicación quirúrgica referidos al Hospital Universitario de Navarra para cirugía de sustitución valvular aórtica entre Junio 2013 y Febrero 2015.

La estenosis aórtica severa se definió como un área valvular aórtica  $\leq 1 \text{ cm}^2$  o un gradiente de presión medio transaórtico  $>40 \text{ mmHg}$  medido por ecocardiografía transtorácica (ECO

TT). La indicación quirúrgica se realizó de acuerdo con las Guías de Práctica Clínica en Valvulopatías de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC).

Los criterios de exclusión fueron enfermedad valvular cardiaca concomitante de grado moderado o severo, y contraindicaciones para la realización de RMN cardiaca (claustrofobia, insuficiencia renal con FG <30 ml/min o portadores de dispositivos cardiacos no compatibles con resonancia).

A todos los pacientes, a su inclusión previo a la cirugía, se les realizó una valoración clínica; una analítica de sangre; estudio de imagen mediante ecocardiografía y resonancia magnética cardiaca; y coronariografía para estudio de anatomía coronaria.

El consentimiento informado se obtuvo de cada uno de los pacientes. El estudio se llevó a cabo según las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Universitario de Navarra.

### **5.1 Análisis del suero de los pacientes**

A todos los pacientes se extrajo sangre venosa para la medición de parámetros de laboratorio de rutina (hemograma y bioquímica), BNP y sST2.

Las medidas de sST2 se realizaron usando un ELISA comercial (Presage, Critical Diagnostics) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

### **5.2 Ecocardiografía**

Se realizó una ecocardiografía transtorácica convencional a todos los pacientes utilizando los equipos VIVID-7 3,5 MHz ultrasound scanner (General Electric Ultrasound, Norway) y IE-33 (Phillips Healthcare, Andover, USA). Los estudios fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones actuales e incluyeron las siguientes determinaciones:

- Parámetros morfológicos del ventrículo izquierdo (VI): diámetro telediastólico (DTDVI), diámetro telesistólico (DTSVI), espesor de septo interventricular (SIV), espesor de pared posterior (PPVI), volumen telediastólico (VTDVI) y volumen telesistólico (VTSVI)
- Parámetros funcionales del ventrículo izquierdo: valoración de la función sistólica mediante la fracción de eyección (FEVI) calculada por método Simpson bidimensional, y valoración de la función diastólica mediante Doppler pulsado del flujo de llenado mitral

- Valoración anatómica y funcional de la válvula aórtica: morfología valvular, gradiente transvalvular máximo y medio por Doppler continuo y cuantificación del área valvular aórtica mediante la ecuación de continuidad.

### **5.3 Resonancia magnética cardiaca**

Los estudios con resonancia magnética cardiaca de llevaron a cabo con un equipo de 1,5 T (Avanto, Siemens, Erlangen, Germany) según los protocolos estándar. Todos los estudios fueron analizados por un radiólogo experimentado y un cardiólogo especializado en imagen cardiaca, en consenso.

Las secuencias “steady-state free precession” se utilizaron para la valoración de las dimensiones (DTDVI, DTSVI, SIV, PPVI, VTDVI y VTSVI), masa y función del ventrículo izquierdo (FEVI). Los bordes endocárdicos y epicárdicos del ventrículo izquierdo fueron contorneados en telediástole y en telesístole mediante el software ARGUS (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany). Así mismo se valoró la morfología y el área valvular aórtica mediante planimetría.

Las secuencias de realce tardío (RT) se adquirieron 10-15 minutos después de la inyección del agente de contraste gadolinio intravenoso (Dotarem, 0,1 mmol/kg peso corporal). Se obtuvieron secuencias de “inversion recovery-prepared spoiled gradient echo images” en eje corto y eje largo estándar para detectar las áreas de realce tardío. Se optimizaron los tiempos de “inversion delay” para conseguir una correcta anulación del miocardio normal. La presencia y el patrón de RT se evaluó por dos observadores independientes. Los pacientes se agruparon en función de la presencia o ausencia de RT. Los pacientes con RT se dividieron a su vez según el patrón de RT en intramiocárdico o subendocárdico. Los pacientes con patrón mixto de realce se clasificaron según el patrón predominante de fibrosis. La masa de RT se calculó de forma semiautomática mediante el software QMass MR7. Los bordes endocárdicos y epicárdicos se trazaron para cada corte en eje corto y se seleccionó una zona de interés con fibrosis dentro del miocardio normal. La extensión de la fibrosis se cuantificó en gramos y como porcentaje de la masa total del ventrículo izquierdo.



## **6. Análisis estadístico**

### **6.1 In vitro y animales**

Los resultados in vitro se expresaron como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. La normalidad de distribución se verificó por medio de la prueba de Kolmogorov–Smirnov. Los resultados fueron analizados utilizando un test de t de student o un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un test de Newman-Keuls para evaluar las diferencias específicas.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 28.0.1.0 (IBM SPSS Statistics). En todos los casos se consideró que existían diferencias significativas para valores de  $p < 0.05$ .

### **6.2 Cohorte clínica**

Las variables continuas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o mediana (rango intercuartílico) y se compararon usando test de T de student para parejas independientes o análisis de la varianza (ANOVA) según fuera apropiado, o test de U Mann-Whitney o test de Kruskal-Wallis si no cumplía normalidad. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson.

Las variables categóricas se expresaron como porcentaje y se compararon con el test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher según fuera apropiado.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS versión 28.0.1.0 (IBM SPSS Statistics). Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativo para valores de  $p < 0,05$  en pruebas a dos colas.

# RESULTADOS

## **1. Análisis proteómico cuantitativo de los efectos de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos adultos**

Para profundizar en el conocimiento de las proteínas moduladas por sST2 en los fibroblastos cardiacos, se realizó un análisis proteómico de extractos celulares totales por marcaje con isótopos isobáricos estables (iTRAQ) mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas. Más de 2000 proteínas fueron identificadas y casi 1800 proteínas fueron cuantificadas en el análisis proteómico. Las alteraciones del proteoma inducidas por sST2 revelaron que la expresión de 18 proteínas se encontraba alterada en fibroblastos cardiacos humanos. De todas ellas, centramos nuestra atención en dos: la mitofusina-1 (MFN-1) y la neurofilina-1 (NRP-1). La MFN-1 es una proteína que participa en la regulación del proceso de fusión mitocondrial, proceso fundamental para mantener el normal funcionamiento de la mitocondria y el equilibrio oxidativo, y observamos que su expresión estaba reprimida tras 24 horas de estimulación con sST2. La NRP-1 es una proteína reguladora de TGF- $\beta$ 1 y encontramos que su expresión aparecía aumentada por el tratamiento con sST-2.

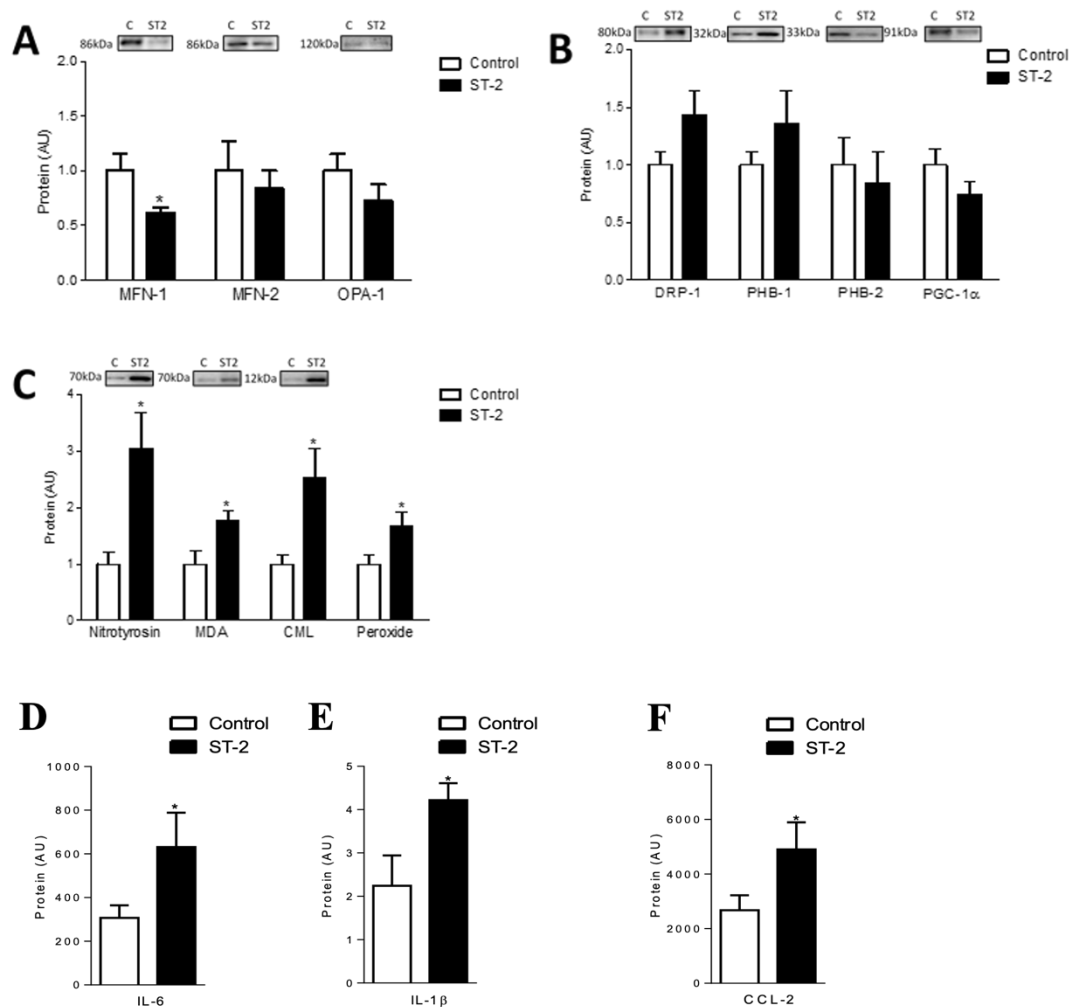
## **2. Tratamiento con sST2 en fibroblastos cardiacos**

### **2.1 sST2 modifica la expresión de MFN-1 mitocondrial y de moléculas relacionadas con estrés oxidativo en fibroblastos cardiacos humanos**

Al tratar fibroblastos cardiacos humanos con sST2, se observó que el sST2 disminuyó de forma significativa la expresión de MFN-1, validando así los resultados proteómicos. Sin embargo, la expresión de otras dos proteínas claves en el proceso de fusión mitocondrial, MFN-2 y OPA-1, no fueron significativamente modificadas por el tratamiento con sST2 (**Figura 1A**). Para analizar si el tratamiento con sST2 podría afectar a la estructura y función mitocondrial, otras proteínas involucradas en la fisión mitocondrial, biogénesis e integridad funcional fueron cuantificadas. sST2 no modificó la expresión de las proteínas DRP-1, PHB-1, PHB-2 o PGC-1 $\alpha$  (**Figura 1B**).

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, el tratamiento con sST2 aumentó significativamente la expresión de nitrotirosina, malondialdehido (MDA), carboxi-metil-lisina (CML) y la producción de peróxido de hidrógeno (**Figura 1C**).

En paralelo, las células tratadas con sST2 presentaron mayores niveles en la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y CCL-2 (**Figura 1 D-F**)



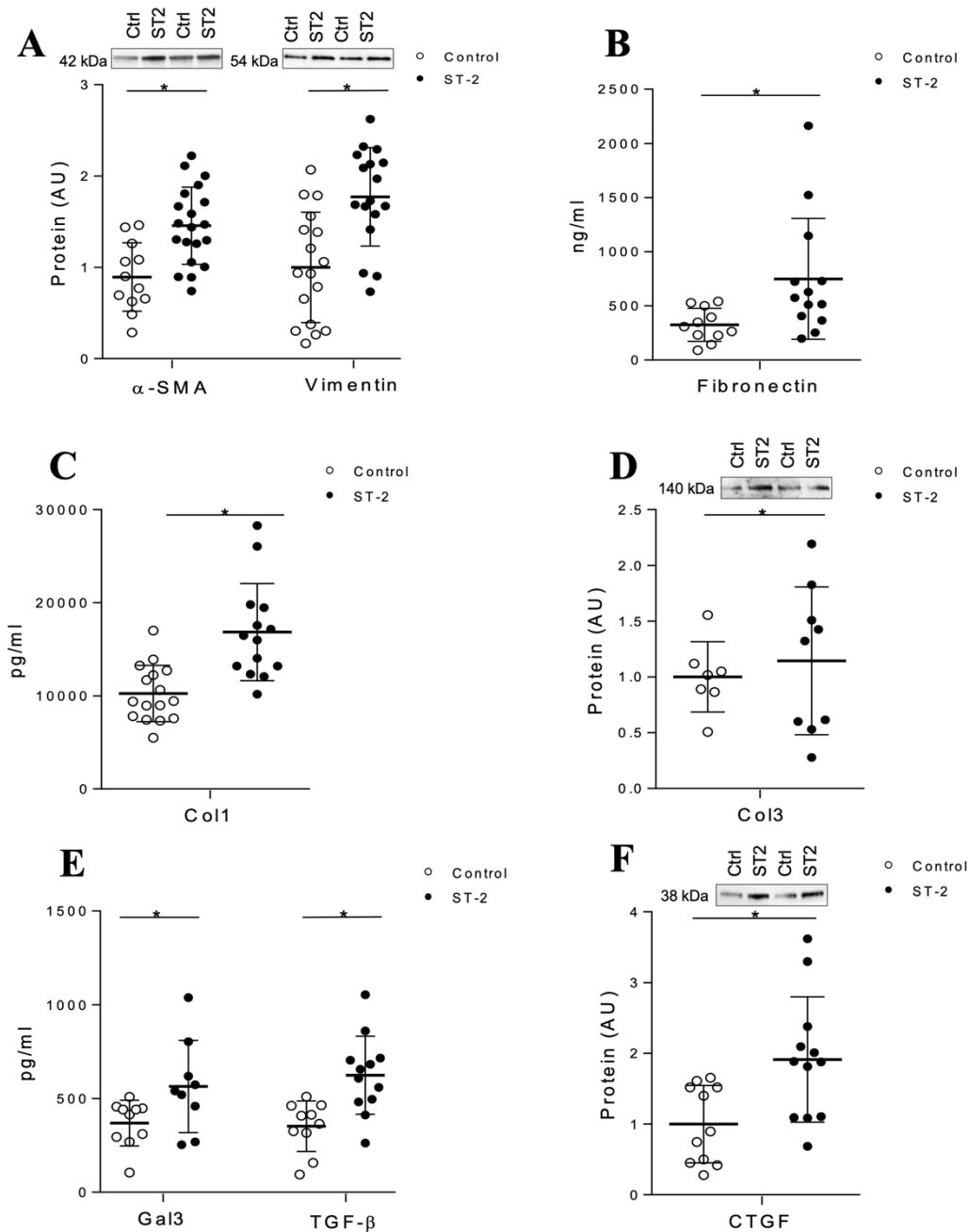
**Figura 1.** Efectos del sST2 sobre las proteínas mitocondriales, moléculas relacionadas con estrés oxidativo e inflamación en fibroblastos cardiacos humanos adultos. **A.** Efectos del sST2 sobre la expresión de MFN-1, MFN-2 y OPA-1 en fibroblastos cardiacos humanos. **B.** Efectos del sST2 sobre proteínas mitocondriales. **C.** Marcadores de estrés oxidativo en células tratadas con sST2. **D-F.** Efectos del tratamiento con sST2 en marcadores de inflamación.

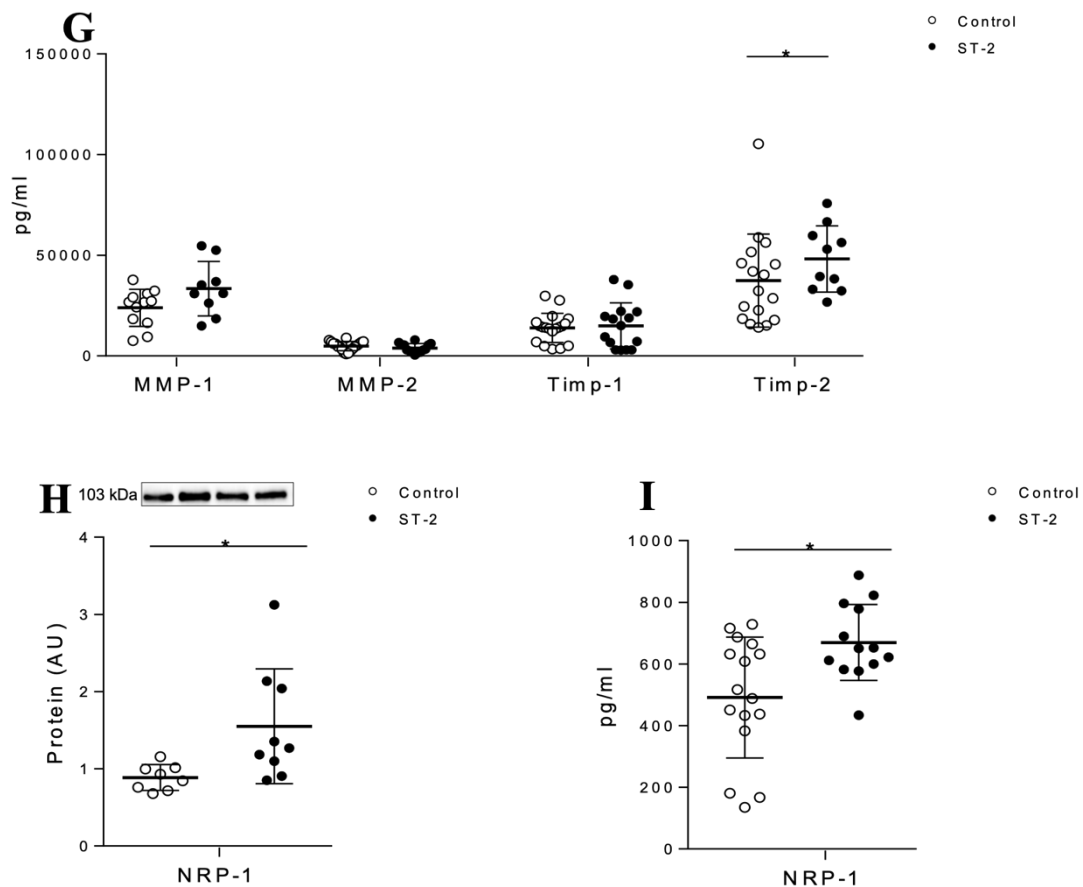
## 2.2 sST2 promueve la activación de fibroblastos y aumenta la expresión de NRP-1 en fibroblastos cardiacos humanos

El tratamiento con sST2 (2  $\mu$ g/mL) aumentó la expresión de marcadores de activación de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina (**Figura 2A**), así como la secreción de fibronectina (**Figura 2B**), a las 24 horas. Además, el tratamiento con sST2 aumentó la secreción de colágeno tipo I (**Figura 2C**) sin modificar los niveles de colágeno tipo III (**Figura 2D**). Otros marcadores profibróticos que fueron estudiados, incluyendo Gal-3, CTGF y TGF- $\beta$ , fueron significativamente sobreexpresados tras estimulación con sST2 (**Figura 2E, F**).

Los niveles secretados de MMP-1, MMP-2 o TIMP-1 no mostraron diferencias entre las condiciones experimentales, mientras que TIMP-2 se secretó en mayor medida en las células tratadas con sST2 respecto a los controles (**Figura 2G**).

Análisis complementarios validaron los resultados del análisis proteómico, observándose un aumento de los niveles de proteína de NRP-1 inducido por sST2 (**Figura 2H**). Además, la estimulación con sST2 aumento la secreción de sNRP-1 (isoforma NRP-1 soluble) (**Figura 2I**).





*Figura 2. Efectos del sST2 sobre marcadores de activación de fibroblastos, colágenos y moléculas profibróticas en fibroblastos cardiacos humanos. A. Marcadores de activación de fibroblastos ( $\alpha$ -SMA, vimentina). B. Fibronectina. C. Colágeno I. D. Colágeno III. E. Marcadores profibróticos Gal-3 y TGF- $\beta$ . F. CTGF. G. MMP-1, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2. H. Efecto del sST2 en la expresión de NRP-1 intracelular. I. Efecto del sST2 en la expresión de sNRP-1 (isoforma NRP-1 soluble)*

### 3. Estudio de la vía intracelular de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos

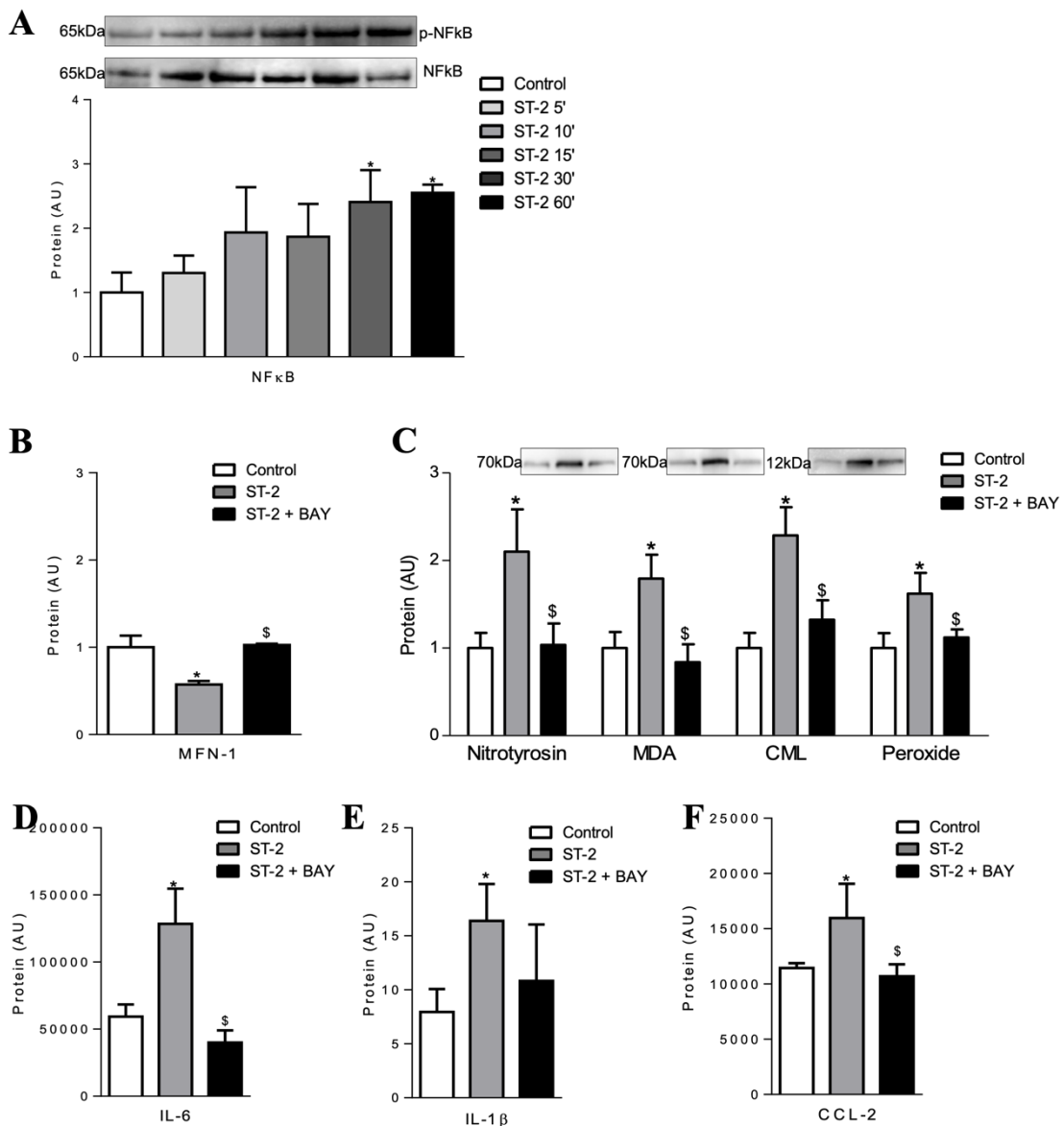
#### 3.1 NF- $\kappa$ B media los efectos proinflamatorios, prooxidantes y profibróticos del sST2 en fibroblastos cardiacos humanos

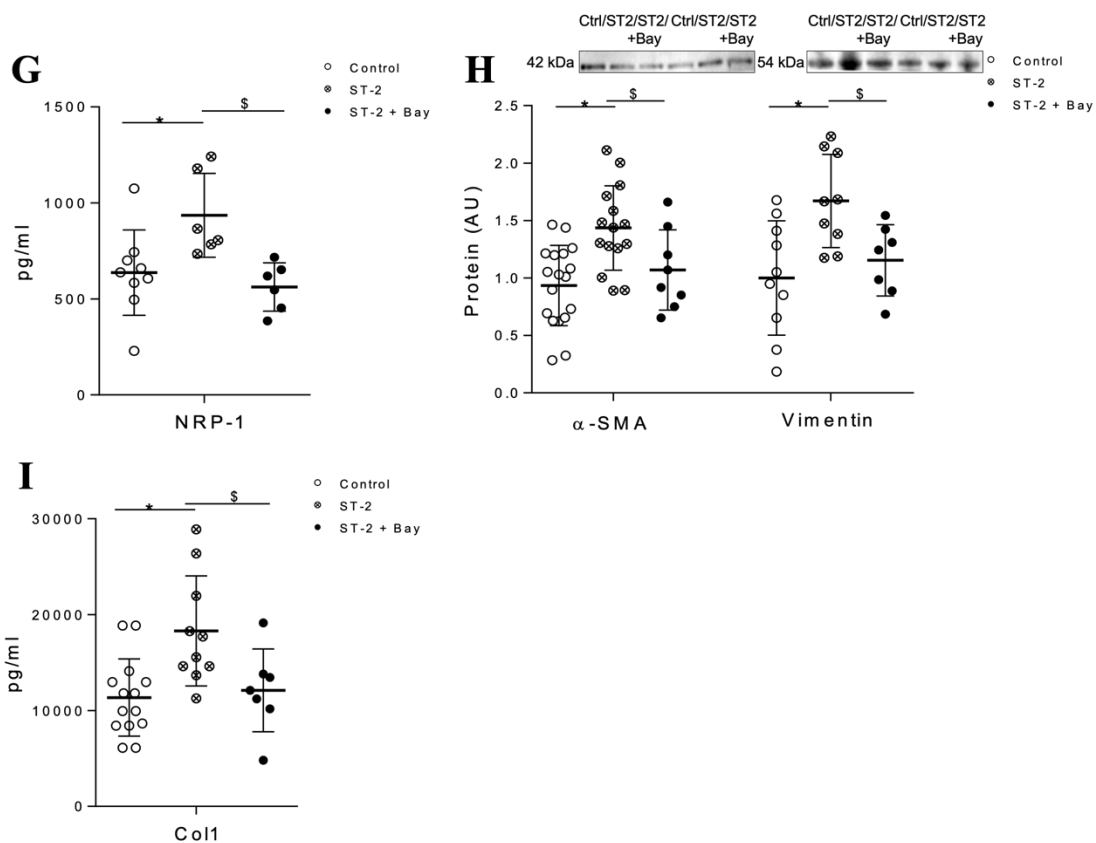
Para investigar la vía intracelular activada tempranamente por sST2 en fibroblastos cardiacos humanos, las células se trataron con sST2 durante 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. La estimulación con sST2 indujo la fosforilación de NF- $\kappa$ B a los 30 y 60 minutos de estimulación (**Figura 3A**).

El inhibidor específico de NF- $\kappa$ B, BAY 11-7082, fue capaz de prevenir la reducción de los niveles de MFN-1 (**Figura 3B**), así como bloquear los efectos del sST2 sobre la

nitrotirosina, MDA, CML y peróxido de hidrógeno (**Figura 3C**). El bloqueo de la vía NF- $\kappa$ B también abolió la secreción inducida por sST2 de marcadores proinflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$  y CCL2 (**Figura 3D-F**).

Además, el pretratamiento con el inhibidor específico de NF- $\kappa$ B fue capaz de prevenir el incremento de los niveles de proteína de sNRP-1 (**Figura 3G**). El inhibidor específico de NF- $\kappa$ B bloqueó los efectos del sST2 en la expresión de los marcadores de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina (**Figura 3H**), mientras que no se vieron efectos sobre la expresión de fibronectina. El bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B también abolió la secreción de colágeno tipo I inducido por sST2 (**Figura 3I**).





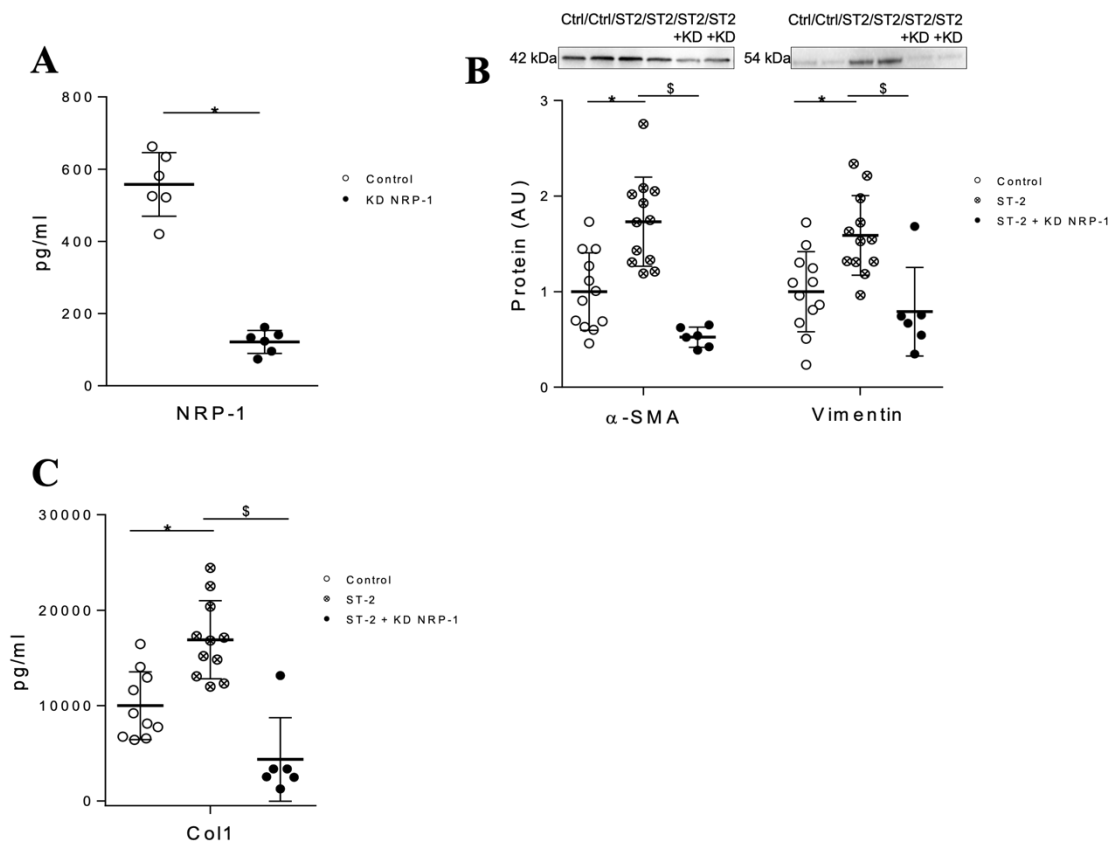
**Figura 3.** Vías intracelulares involucradas en los efectos prooxidantes, proinflamatorios y profibróticos en fibroblastos cardiacos humanos. **A.** Efectos del sST2 en la fosforilación del NF-κB. **B.** Expresión de MFN-1 en células tratadas con sST2 y el inhibidor farmacológico de NF-κB BAY 11-7082. **C.** Efectos de la inhibición farmacológica de NF-κB sobre marcadores de estrés oxidativo. **D-F.** Efectos de la inhibición farmacológica de NF-κB sobre marcadores de inflamación. **G.** Efectos de la inhibición farmacológica de NF-κB sobre NRP-1. **H.** Efectos de la inhibición farmacológica de NF-κB sobre marcadores de activación de miofibroblastos α-SMA y vimentina. **I.** Efectos de la inhibición farmacológica de NF-κB sobre Coll.

### 3.2 La NRP-1 media los efectos profibróticos de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos

#### a) Expresión de sST2 en fibroblastos cardiacos “NRP-1 knockdown”

Se reprimió la expresión del gen de la NRP-1 en fibroblastos cardiacos humanos usando tecnología CRISPR/Cas9. Los niveles de expresión de NRP-1 se redujeron con éxito en más de un 80% en los fibroblastos cardiacos humanos (**Figura 4A**). En fibroblastos que no expresan NRP-1, sST2 no indujo la expresión de los marcadores de activación α-SMA y vimentina (**Figura 4B**). Además, sST2 no pudo aumentar la síntesis de colágeno en las células silenciadas para NRP-1 (**Figura 4C**).

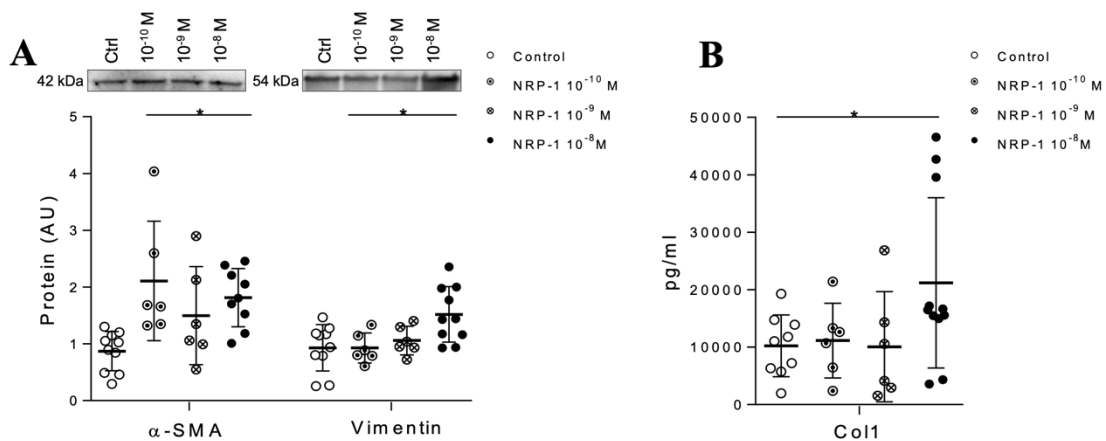




**Figura 4.** A. Expresión de NRP-1 en fibroblastos cardiacos humanos NRP-1 knockdown. Efectos de sST2 en fibroblastos cardiacos con expresión de NRP-1 reprimida sobre: B. marcadores de activación de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina; C. secreción de colágeno I.

#### b) Tratamiento con NRP-1 exógena en fibroblastos cardiacos humanos

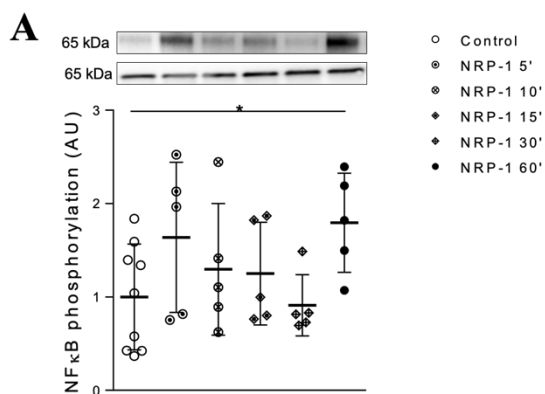
Para comprender la contribución de NRP-1 inducida por sST2 en la activación del fenotipo de los fibroblastos, las células fueron tratadas con NRP-1 soluble humana recombinante. sNRP-1 exógena fue suplementada a diferentes concentraciones ( $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M y  $10^{-10}$  M) durante 24 horas para poner en evidencia la mínima concentración que induce activación de miofibroblastos. La NRP-1 exógena recombinante aumentó la expresión de los marcadores de activación de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina de una manera dosis dependiente, alcanzando la significación estadística sólo para la dosis  $10^{-8}$  M (**Figura 5A**). De este modo, la dosis de NRP-1  $10^{-8}$  M fue usada para explorar la señalización intracelular inducida por sNRP-1 en la diferenciación de miofibroblastos. Además, el tratamiento con sNRP-1 aumentó la secreción de colágeno tipo I también de forma dosis dependiente (**Figura 5B**).

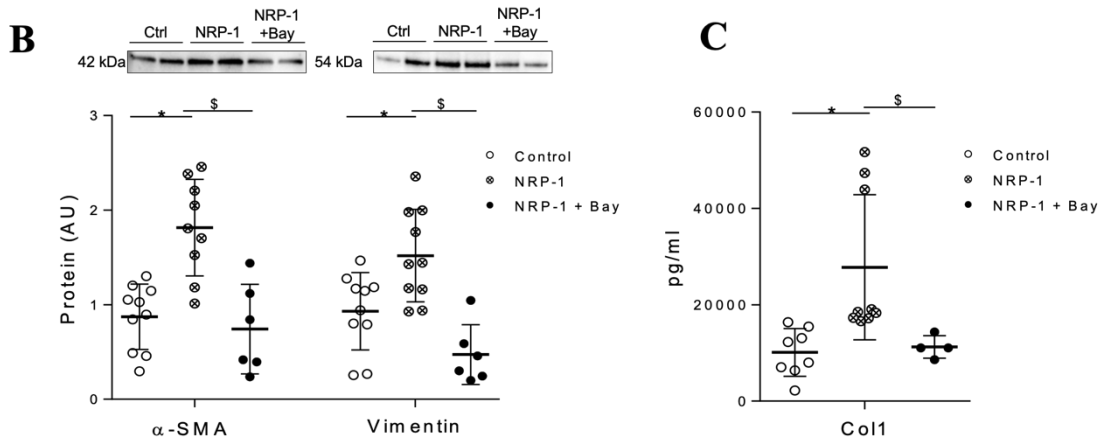


**Figura 5.** Efectos de NRP-1 exógena sobre la activación de fibroblastos y expresión de marcadores profibróticos en fibroblastos cardiacos humanos. Los efectos dosis dependiente de la NRP-1 exógena fueron estudiados a las 24 horas en: **A.** marcadores de activación de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina. **B.** secreción de colágeno tipo I.

Para investigar la vía intracelular temprana activada por NRP-1 exógena en fibroblastos cardiacos humanos, las células se trataron con sNRP-1 10<sup>-8</sup> M durante 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. La estimulación con sNRP-1 indujo la fosforilación de NF- $\kappa$ B a los 60 minutos de estimulación (**Figura 6A**)-

El inhibidor específico de NF- $\kappa$ B, BAY 11-7082, fue capaz de bloquear los efectos de la NRP-1 exógena añadida en la expresión de los marcadores de fibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina (**Figura 6B**). El bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B también abolió la secreción de colágeno tipo I inducida por sNRP-1 (**Figura 6C**).

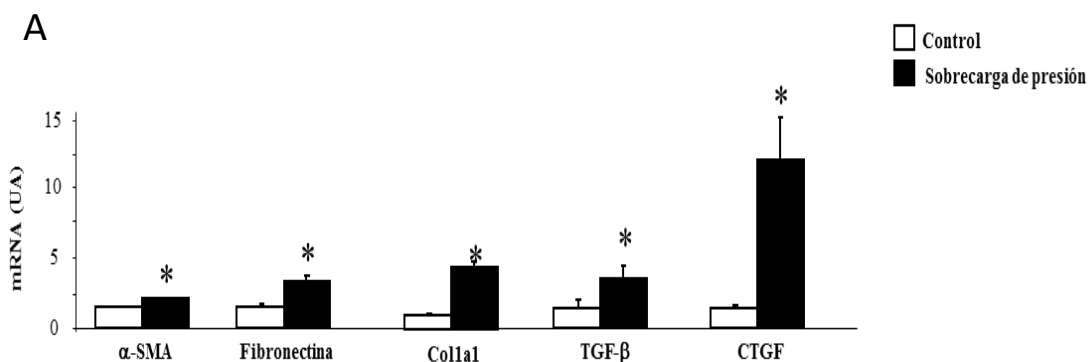


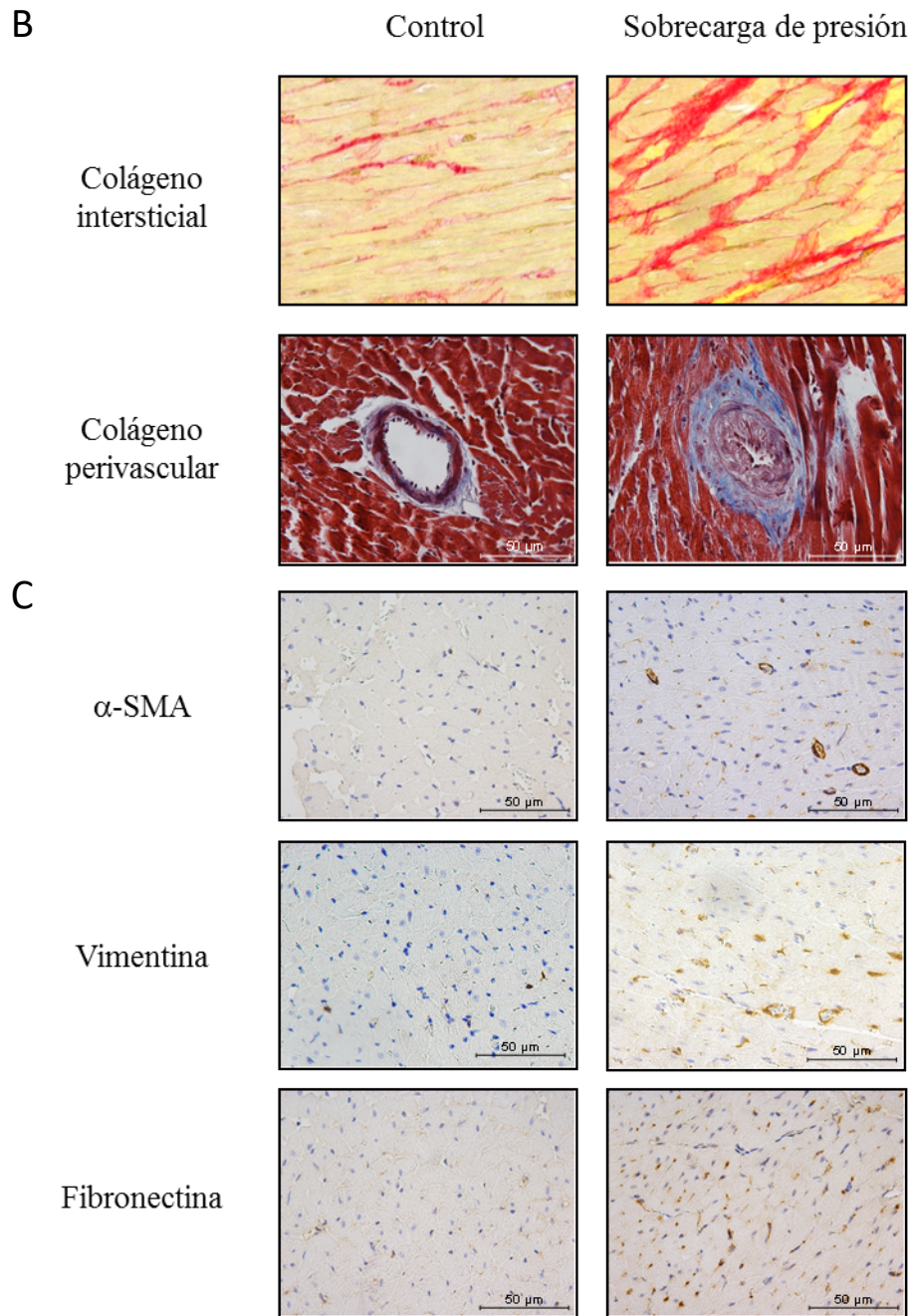


**Figura 6.** Vía de señalización involucrada en los efectos profibróticos de NRP-1 en fibroblastos cardiacos humanos. A. Efecto de NRP-1  $10^{-8}$  M en NF- $\kappa$ B. Efecto de la inhibición de NRP-1 en: B. marcadores de activación de fibroblastos  $\alpha$ -SMA y vimentina; C. colágeno tipo I.

c) Expresión cardiaca de sST2 y NRP-1 en un modelo animal de sobrecarga de presión

La expresión de sST2 y NRP-1 fue medida en tejido miocárdico de un modelo animal de sobrecarga de presión. Brevemente, las ratas con sobrecarga de presión presentaron un aumento de fibrosis cardiaca caracterizada por niveles elevados de la expresión de proteínas  $\alpha$ -SMA (1,6 veces), fibronectina (2 veces), colágeno tipo I (2,3 veces), TGF- $\beta$  (1,9 veces) y CTGF (1,7 veces) (**Figura 7A**). El colágeno miocárdico intersticial y perivascular también estaba elevado en ratas con sobrecarga de presión (**Figura 7B**). Además, las inmunohistoquímicas de  $\alpha$ -SMA, vimentina y fibronectina mostraron un aumento de estas proteínas en los corazones de ratas con sobrecarga de presión, comparando con los controles (**Figura 7C**).





**Figura 7.** A. Expresión de moléculas profibróticas en corazón de ratas sometidas a sobrecarga de presión. B. Fibrosis intersticial y perivascular en ratas control y sometidas a sobrecarga de presión. C. Inmunohistoquímicas de  $\alpha$ -SMA, vimentina y fibronectina en ratas control y con sobrecarga de presión.

Las ratas expuestas a sobrecarga de presión expresaron mayores niveles de sST2 y NRP-1 (**Figura 8A y B**). ST2 se correlacionó de forma positiva con la expresión cardíaca de NRP-1 ( $r$  0,633, **Figura 8C**). Merece la pena resaltar que la expresión de IL-33 no se vio afectada experimentalmente ni en nivel transcripcional, ni de proteína.

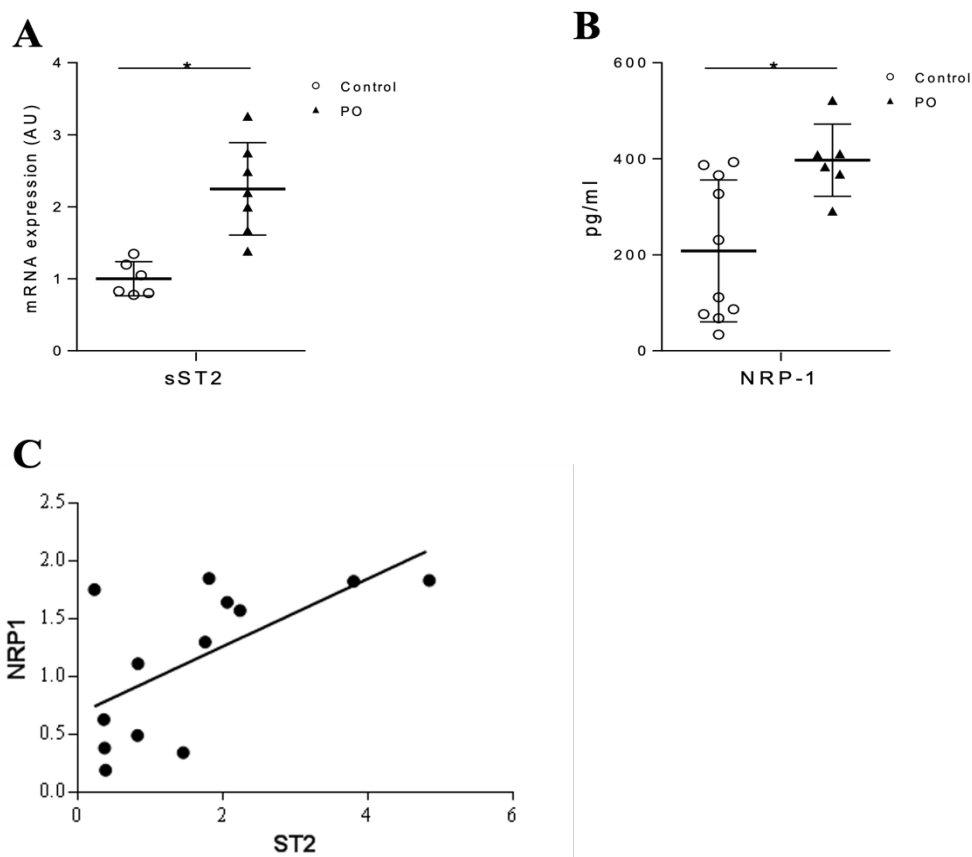


Figura 8. Expresión cardiaca de ST2 y NRP-1 en un modelo roedor de sobrecarga presión. Expresión cardiaca en muestras miocárdicas de ratas con sobrecarga de presión y controles de: A. sST2 mRNA. B. NRP-1. C. Correlación entre la expresión de ST2 y NRP-1.

#### 4. sST2, estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa

Se estudiaron mediante tinciones histológicas, inmunohistoquímicas y RT-PCR muestras de biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa obtenidas en el acto quirúrgico y se compararon con biopsias miocárdicas de pacientes sin enfermedad cardiovascular obtenidas en autopsias. Las características generales de los pacientes y controles se muestran en la **Tabla 1**.

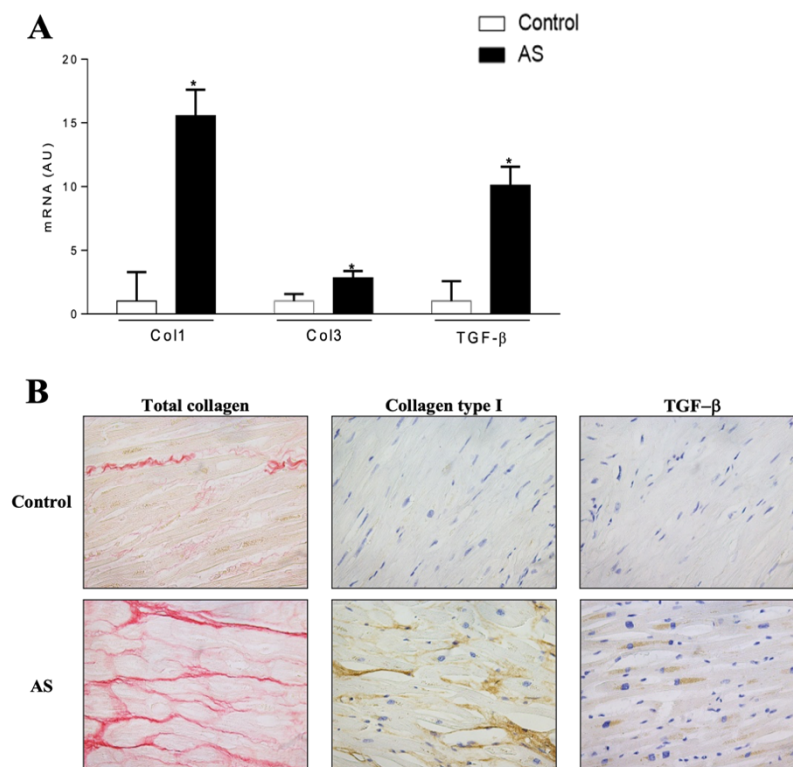
**Tabla 1. Características basales de pacientes y controles.**

	Controles	Pacientes con estenosis aórtica
Biopsias miocárdicas, n	13	26
Edad (años), media $\pm$ DE	75 $\pm$ 11	74 $\pm$ 8
Varones, n (%)	7 (54%)	12 (46)
HTA, n (%)	1 (8%)	18 (69)
HLP, n (%)	3 (23%)	16 (62)
DM, n (%)	1 (8%)	2 (8)
Enf coronaria, n (%)	1 (8%)	7 (27)

Causa de la muerte, n (%):		
- Neumonía	4 (30%)	
- Sepsis	1 (8%)	
- Cáncer	6 (46%)	
- Traumatismo	1 (8%)	
- Edad avanzada	1 (8%)	
FEVI (%), media $\pm$ DE		65 $\pm$ 13
CF NYHA, n (%)		
- I		3 (11%)
- II		15 (58%)
- III		6 (23%)
- IV		2 (8%)
Tratamiento, n (%)		
- IECA/ARA II		14 (53%)
- Bbloq		4 (15%)
- ARM		1 (4%)

HTA, hipertensión arterial; HLP, hiperlipemia; DM, diabetes mellitus; FEVI, fracción de eyección; CF NYHA, clase funcional New York Heart Association; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II, antagonistas receptores de la angiotensina II; ARM, antagonistas receptores aldosterona; bbloq, betabloqueantes

De acuerdo con lo descrito en la literatura, las biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica mostraron mayores niveles de colágeno tipo I, colágeno tipo III y TGF- $\beta$ 1 a nivel de mRNA (**Figura 9A**). Estos resultados fueron confirmados por técnicas histológicas. Como se puede ver en la **Figura 9B**, los pacientes con estenosis aórtica presentaron más fibrosis total en las secciones teñidas con rojo Sirio, así como mayor inmunomarcaje para colágeno tipo I y TGF- $\beta$ .



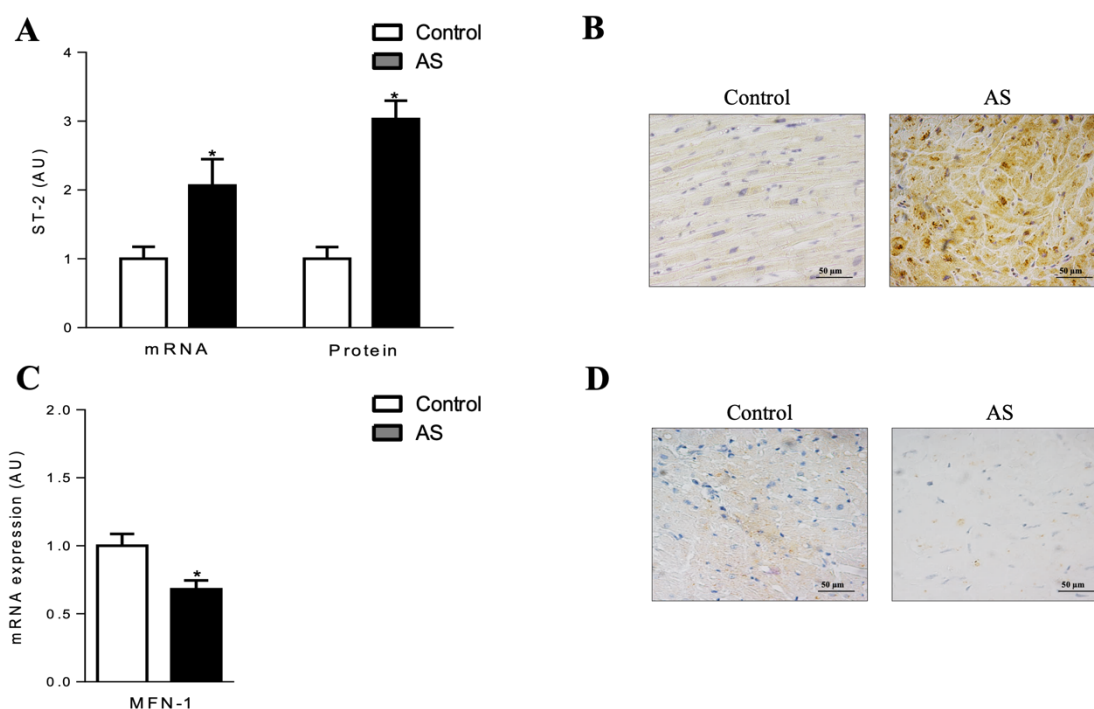
**Figura 9.** A. Expresión de Col1, Col 3 y TGF- $\beta$ 1 en biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa (AS) y en controles. B. Imágenes representativas de tinción de rojo sirio e inmunohistoquímicas de marcadores de fibrosis.

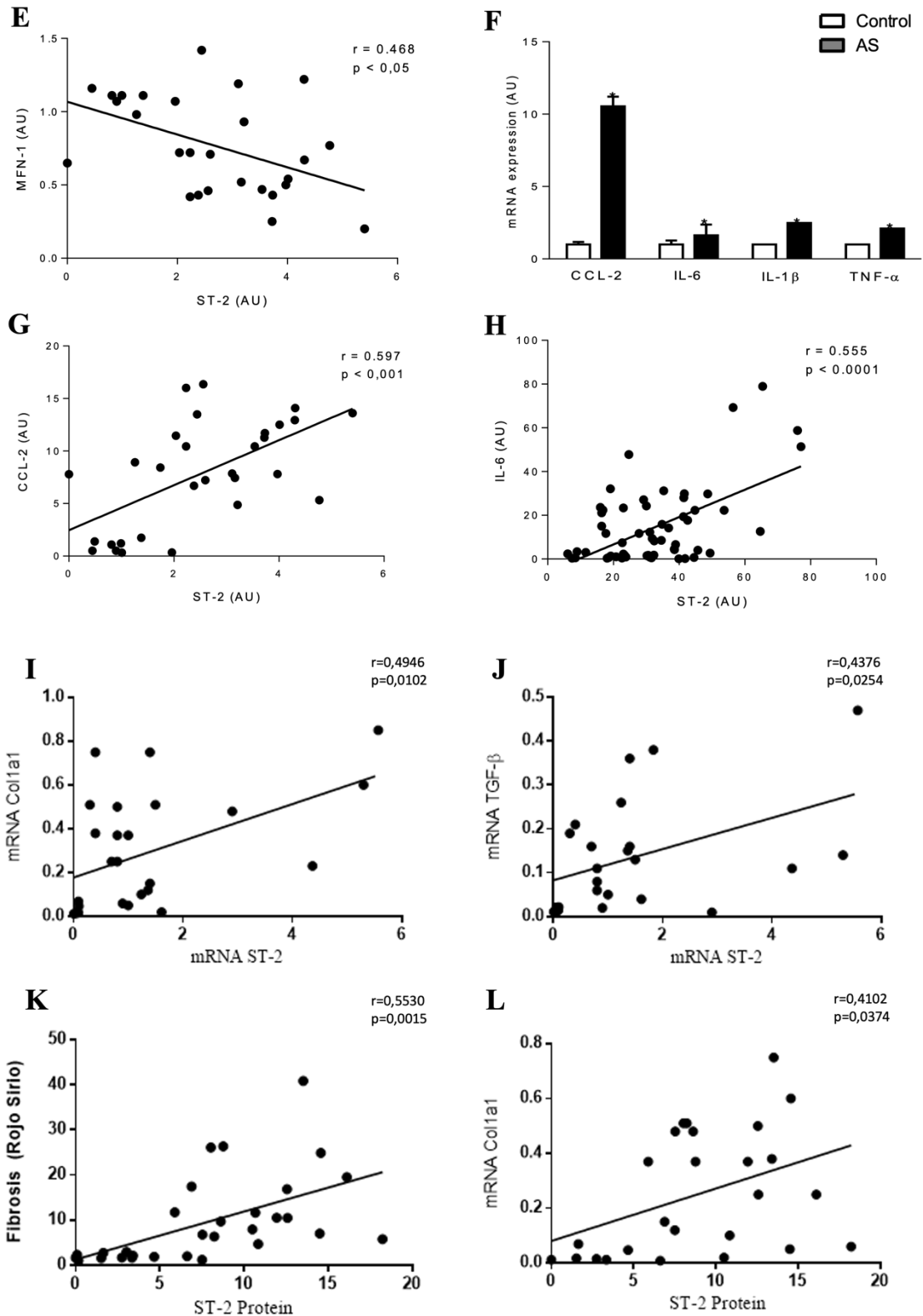
La expresión de sST2 cuantificada mediante RT-PCR e inmunohistoquímica fue mayor en el miocardio de pacientes con estenosis aórtica comparados con controles (**Figura 10A**). Imágenes representativas de inmunohistoquímica para ST2 en biopsias miocárdicas de controles y pacientes con estenosis aórtica se muestran en la **Figura 10B**.

La expresión de MFN-1 estaba disminuida en el miocardio de pacientes con estenosis aórtica en comparación con controles en nivel de mRNA (**Figura 10C**). Imágenes representativas de inmunohistoquímica para MFN-1 en biopsia miocárdica de controles y de pacientes con estenosis aórtica se muestran en la **Figura 10D**. En las biopsias miocárdicas, los niveles de proteína de sST2 se correlacionaron inversamente con la expresión de MFN-1 ( $r -0,468$ ) (**Figura 10E**).

Con respecto a la expresión de marcadores de inflamación, las biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica mostraron mayores niveles de CCL-2, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  a nivel de mRNA (**Figura 10F**). Los niveles de proteína de sST2 se correlacionaron positivamente con los niveles mRNA de CCL2 ( $r 0,597$ ) (**Figura 10G**) y con niveles mRNA de IL-6 ( $r 0,555$ ) (**Figura 10H**) en todos los pacientes.

Finalmente, se observó en las biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa que los niveles de sST2 a nivel de mRNA se correlacionaron positivamente con los niveles de mRNA de colágeno tipo I ( $r 0,495$ ) (**Figura 10I**) y de TGF- $\beta$  ( $r 0,438$ ) (**Figura 10J**). Además, los niveles de proteína de sST2 se correlacionaron positivamente con los niveles de colágeno total cuantificado en las coloraciones teñidas con rojo sirio ( $r 0,553$ ) (**Figura 10K**) y con los niveles de mRNA Colágeno 1 ( $r 0,412$ ) (**Figura 10L**).





**Figura 10. sST2, estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica.** *A.* Expresión de ST2 en biopsia miocárdica en controles y pacientes con estenosis aórtica. *B.* Imágenes representativas de cortes inmunoteñidos para ST2 en controles y pacientes con estenosis aórtica. *C.* Expresión de MFN-1 en biopsia miocárdica en controles y pacientes con estenosis aórtica. *D.* Imágenes representativas de cortes inmunoteñidos para MFN-1 en controles y pacientes con estenosis aórtica. *E.* La expresión de sST2 miocárdica se correlaciona negativamente con la expresión de MFN-1. *F.* Expresión de CCL-2, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en biopsia miocárdica en controles y pacientes con estenosis aórtica. *G.* La expresión miocárdica de sST2 se correlaciona positivamente con la expresión de CCL-2. *H.* La expresión miocárdica de sST2 se correlaciona positivamente con la expresión de IL-6. *I.* Correlación entre mRNA de ST2 y mRNA de colágeno tipo I. *J.* Correlación entre mRNA de ST2 y de TGF- $\beta$ . *K.* Correlación entre niveles de proteína ST2 y fibrosis total cuantificada en el rojo sirio. *L.* Correlación entre niveles de proteína de ST2 y mRNA col1a1.



## **5. Evaluación del sST2 circulante y la fibrosis focal miocárdica de reemplazo mediante RMN cardíaca con secuencias de realce tardío en una cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa**

### **5.1 Características clínicas y de laboratorio de la cohorte de pacientes con estenosis aórtica severa**

Un total de 79 pacientes (60,8% hombres,  $72,2 \pm 8$  años) diagnosticados de estenosis aórtica severa con indicación de cirugía de sustitución valvular aórtica fueron reclutados entre Junio 2013 y Febrero 2015. Las características basales y demográficas de nuestra cohorte de pacientes se muestran en la **Tabla 2**.

En nuestra cohorte hubo una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular: hipertensión (72,2%), hiperlipemia (65,8%) y diabetes mellitus (30,4%). La coexistencia de enfermedad arterial coronaria también fue frecuente (39,2%) con un 6,3% de pacientes con infarto agudo de miocardio previo.

Casi la mitad de los pacientes reclutados tenían una válvula aórtica bicúspide (50,6%). Este porcentaje, algo mayor que en la población general, puede explicarse porque fueron excluidos los pacientes con otra enfermedad valvular concomitante mayor que leve, asociación más prevalente en pacientes con etiología degenerativa.

### **5.2 La presencia de realce tardío en pacientes con estenosis aórtica severa está asociada con mayor remodelado ventricular izquierdo y disfunción ventricular**

Posteriormente evaluamos la presencia de fibrosis focal miocárdica de reemplazo mediante RMN cardíaca con las secuencias de realce tardío tras la administración de gadolinio. Así, los pacientes fueron clasificados en función de la presencia (RT +) o ausencia (RT -) de realce tardío, como se muestra adicionalmente en la **Tabla 2**. Se detectó fibrosis focal miocárdica en el 53,2% de los pacientes.

Entre los pacientes con RT + había una mayor proporción de hombres que de mujeres (71,4% vs. 48,6%,  $p 0,039$ ). La presencia de enfermedad coronaria fue más prevalente entre los pacientes con RT + (50% vs. 27%,  $p 0,037$ ). Como era esperable, solamente pacientes con RT + tenían historia de infarto agudo de miocardio previa, aunque no alcanzó significación estadística probablemente en relación con el pequeño tamaño de la muestra ( $p 0,057$ ).

La valoración de la clase funcional NYHA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p 0,034), presentando peor clase funcional aquellos con RT +. Asimismo, los valores en sangre de BNP fueron mayores en aquellos pacientes con RT + comparando con aquellos sin RT (196 [86-352,4] vs. 78,6 [46-219,7], p 0,006). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la clínica de angina, si bien hubo mayor presencia de síncope en los pacientes con RT +.

Los niveles de LDL colesterol fueron significativamente más bajos en los pacientes con RT + (95,2 ± 24,8 vs 119,3 ± 33,8 mg/dL, p 0,001), aunque no se vieron diferencias en la prevalencia de hiperlipidemia o en el tratamiento con estatinas. Si bien no tenemos una explicación para este hecho, es posible que los pacientes con RT + entre los que había mayor presencia de enfermedad coronaria e historia de infarto de miocardio previo, pudieran tomar estatinas de mayor potencia para alcanzar niveles óptimos de LDL en función de su riesgo cardiovascular, y por ello presentar menores niveles.

Los pacientes con RT + mostraron un mayor remodelado estructural del ventrículo izquierdo y una peor función sistólica ventricular izquierda, independientemente del grado de severidad de la estenosis aórtica. De este modo, los pacientes con RT + presentaron en el estudio con RMN cardiaca una mayor dilatación VI (VTDVI 147±52,7 vs. 116±26,1 ml, p 0,002; VTSVI 65,3±44,2 vs. 35,1±16,2 ml, p 0,000), una mayor hipertrofia VI (Masa VI 191,9±65,4 vs. 146,8±35 g, p 0,001) y una peor fracción de eyección (FEVI 58,8±16,2 vs. 70,4±9,7%, p 0,000). Es interesante destacar, que todos los pacientes con FEVI <50% presentaron RT + (23,8%, p 0,001).

**Tabla 2. Características basales de la población total y en función de la presencia (RT +) o ausencia (RT-) de realce tardío en el estudio con RMN cardiaca.**

	Total	RT +	RT -	p
N (%)	79 (100%)	42 (53,2%)	37 (46,8%)	
Edad (años), media ± DE	72,2±8	72±8,4	72,5±7,7	0,791
Hombres, n (%)	48 (60,8%)	<b>30 (71,4%)</b>	<b>18 (48,6%)</b>	<b>0,039</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), media ± DE	29±5,8	28,5±4,3	29,6±7	0,404
HTA, n (%)	57 (72,2%)	33 (78,6%)	24 (64,9%)	0,175
HLP, n (%)	52 (65,8%)	25 (59,5%)	27 (73%)	0,209
DM, n (%)	24 (30,4%)	13 (31%)	11 (29,7%)	0,906
Hábito tabáquico, n (%)				
Actual	7 (8,9%)	5 (11,9%)	2 (5,4%)	0,569
Exfumador	26 (32,9%)	4 (33,3%)	12 (32,4%)	
<b>Historia cardiovascular</b>				
FA, n (%)	11 (13,9%)	7 (16,7%)	4 (10,8%)	0,453
ACV previo, n (%)	5 (6,3%)	2 (4,8%)	3 (8,1%)	0,661
IAM previo, n (%)	5 (6,3%)	5 (11,9%)	0	0,057
Enf. coronaria, n (%)	31 (39,2%)	<b>21 (50%)</b>	<b>10 (27%)</b>	<b>0,037</b>

Clase NYHA, n (%)				
I	8 (10,1%)	7 (16,7%)	1 (2,7%)	<b>0,034</b>
II	44 (55,7%)	<b>18 (42,9%)</b>	<b>26 (70,3%)</b>	
III	24 (30,4%)	<b>16 (38,1%)</b>	<b>8 (21,6%)</b>	
IV	3 (3,8%)	1 (2,4%)	2 (5,4%)	
Angina, n (%)	29 (36,7%)	16 (38,1%)	13 (35,1%)	0,785
Síncope, n (%)	11 (13,9%)	<b>9 (21,4%)</b>	<b>2 (5,4%)</b>	<b>0,040</b>
<b>Tratamiento médico</b>				
IECA/ARAII, n (%)	41 (51,9%)	21 (50%)	20 (54,1%)	0,719
ARM, n (%)	1 (1,3%)	0	1 (2,7%)	0,468
Bbloq, n (%)	22 (27,8%)	15 (35,7%)	7 (18,9%)	0,097
Estatinas, n (%)	53 (67,1%)	32 (76,2%)	21 (56,8%)	0,067
Diureticos, n (%)	48 (60,8%)	27 (64,3%)	21 (56,8%)	0,494
<b>Análisis bioquímico</b>				
Hb (g/dL), media ± DE	13,7±1,6	14±1,6	13,3±1,6	0,058
FG (mg/mL/m <sup>2</sup> ), media ± DE	79,8±27	78,1±27,1	81,8±27,2	0,554
LDL (mg/dL), media ± DE	106,7±31,7	<b>95,2±24,8</b>	<b>119,3±33,8</b>	<b>0,001</b>
BNP (pg/mL), mediana (RIQ)	139,5 (61,5-271)	<b>196 (86-352,4)</b>	<b>78,6 (46-219,7)</b>	<b>0,006</b>
sST2 (ng/mL), media ± DE	26,58±10,77	<b>34,7±7,7</b>	<b>18±5,7</b>	<b>0,000</b>
<b>Válvula aórtica</b>				
VA bicúspide, n (%)	39 (50,6%)	23 (57,5%)	16 (43,2%)	0,334
Grad máx (mmHg), media ± DE	79±21,7	77,4±22,1	80,8±21,5	0,504
Grad medio (mmHg), media±DE	51,3±14,6	50±15,5	52,8±13,7	0,398
AVA (cm <sup>2</sup> ), media ± DE	0,75±0,17	0,75±0,19	0,74±0,15	0,823
<b>VI RMN cardiaca</b>				
DTDVI (mm), media ± DE	48,9±5,9	<b>50,9±6,5</b>	<b>46,8±4,3</b>	<b>0,001</b>
SIV (mm), media ± DE	13,2±2,5	<b>13,8±2,7</b>	<b>12,5±2</b>	<b>0,017</b>
VTDVI (ml), media ± DE	132,3±44,8	<b>147±52,7</b>	<b>116±26,1</b>	<b>0,002</b>
VTSVI (ml), media ± DE	51±37	<b>65,3±44,2</b>	<b>35,1±16,2</b>	<b>0,000</b>
Masa VI (g), media ± DE	170,7±57,6	<b>191,9±65,4</b>	<b>146,8±35</b>	<b>0,001</b>
FEVI (%), media ± DE	64,3±14,6	<b>58,8±16,2</b>	<b>70,4±9,7</b>	<b>0,000</b>
FEVI <50%, n (%)	10 (12,7%)	<b>10 (23,8%)</b>	<b>0</b>	<b>0,001</b>
Masa RT (g), mediana (RIQ)	0,33 (0-5,09)	<b>5,1 (2,35-12,37)</b>	<b>0</b>	
%VI masa RT (%), mediana (RIQ)	0,5 (0-3)	<b>3 (1-6)</b>	<b>0</b>	

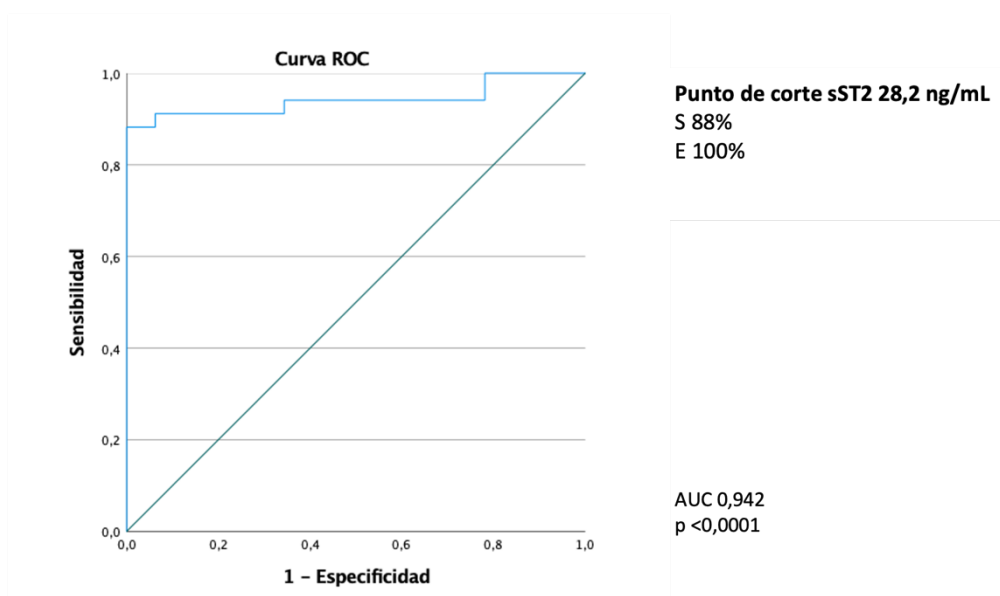
RT, realce tardío; HTA, hipertensión arterial; HLP, hiperlipidemia; DM, diabetes mellitus; IMC, índice de masa corporal; FA, fibrilación auricular; ACV, accidente cerebrovascular/ictus; IAM, infarto agudo de miocardio; CF NYHA, clase funcional según la New York Heart Association; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II, antagonistas de los receptores de la angiotensina II; ARM, antagonistas de los receptores de la aldosterona; bbloq, betabloqueantes; Hb, hemoglobina; FG, filtrado glomerular; LDL, lipoproteína de baja densidad; BNP, péptido natriurético cerebral; sST2, ST2 soluble; VA, válvula aórtica; ETT, ecocardiograma transtorácico; RMN, resonancia magnética nuclear; Grad, gradiente; AVA, área valvular aórtica; DTDVI, diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; SIV, espesor del septo interventricular; VTDVI, volumen telediastólico ventrículo izquierdo; VTSVI, volumen telesistólico ventrículo izquierdo; VI, ventrículo izquierdo; FEVI, fracción de eyección ventrículo izquierdo

### 5.3 Los niveles circulantes de sST2 predicen la presencia de realce tardío en pacientes con estenosis aórtica severa

De forma relevante, los niveles de sST2 fueron significativamente mayores en los pacientes con RT + comparando con RT - (34,7±7,7 vs. 18±5,7 ng/mL, p 0,000).

Para completar el estudio de la utilidad del sST2 como biomarcador predictivo de fibrosis focal de reemplazo, se calculó una curva ROC (**Figura 11**). Para identificar pacientes con

RT + se estableció un punto de corte de 28,2 ng/mL, con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 100% (AUC 0,942 AUC,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 11. Curva ROC.** Para identificar pacientes con RT + se estableció un punto de corte de 28,2 ng/mL de sST2 (S 88% y E 100%)

Así, todos los pacientes con sST2 >28,2 ng/mL presentaron RT + en nuestra muestra y de los pacientes con sST2 <28,2 ng/mL el 88,9% no lo tenían.

Los pacientes con sST2 >28,2 ng/mL, a igualdad de severidad de estenosis aórtica, ya presentaban mayor hipertrofia VI comparando con aquellos con sST2 <28,2 (masa VI  $186 \pm 67,2$  vs  $149,2 \pm 43,1$  g,  $p 0,016$ ) (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Características morfológicas y funcionales de VI según los niveles de sST2 mayores o menores de 28,2 ng/mL.**

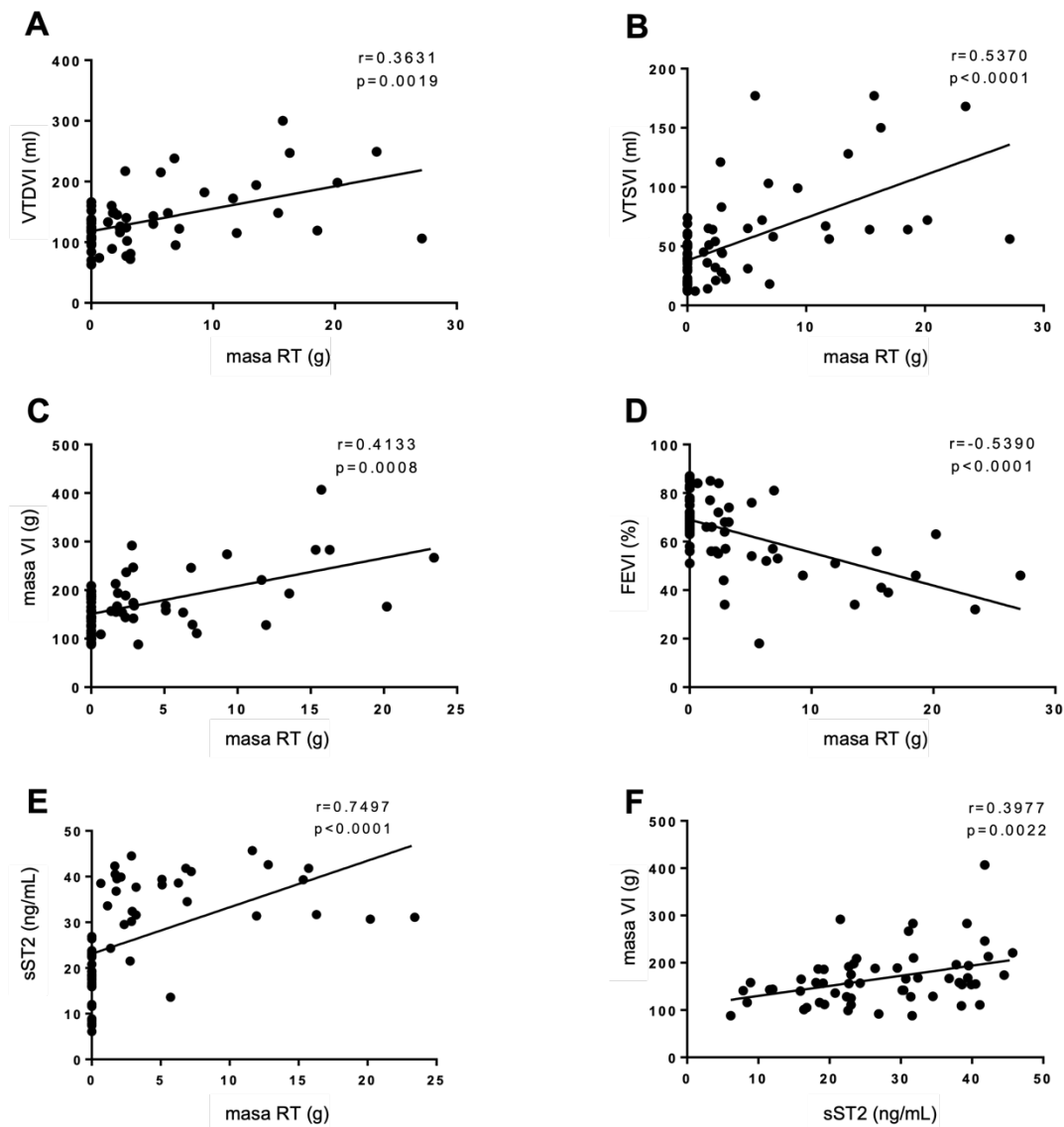
	sST2 >28,2	sST2 <28,2	p
Grad máx (mmHg), media $\pm$ DE	76,2 $\pm$ 18,5	77,2 $\pm$ 21,3	0,841
Grad medio (mmHg), media $\pm$ DE	49,5 $\pm$ 14	50,8 $\pm$ 14,1	0,715
AVAo cont (cm <sup>2</sup> ), media $\pm$ DE	0,79 $\pm$ 0,18	0,73 $\pm$ 0,16	0,263
DTDVI (mm), media $\pm$ DE	50,6 $\pm$ 6,8	47,7 $\pm$ 5,1	0,061
SIV (mm), media $\pm$ DE	<b>13,9<math>\pm</math>2,7</b>	<b>12,5<math>\pm</math>2,1</b>	<b>0,022</b>
VTDVI (ml), media $\pm$ DE	143,7 $\pm$ 57,8	120,8 $\pm$ 34,3	0,070
VTSVI (ml), media $\pm$ DE	59 $\pm$ 43,7	41,6 $\pm$ 31,1	0,080
Masa VI (g), media $\pm$ DE	<b>186<math>\pm</math>67,2</b>	<b>149,2<math>\pm</math>43,1</b>	<b>0,016</b>
FEVI (%), media $\pm$ DE	62,7 $\pm$ 14,2	67,8 $\pm$ 13,5	0,151

Grad, gradiente; AVAo, área valvular aórtica; DTDVI, diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; SIV, espesor del septo interventricular; VTDVI, volumen telediastólico ventrículo izquierdo; VTSVI, volumen telesistólico ventrículo izquierdo; VI, ventrículo izquierdo; FEVI, fracción de eyección ventrículo izquierdo

#### 5.4 La masa de realce tardío está asociada con el remodelado ventricular izquierdo y con los niveles circulantes de sST2

La masa de RT se correlacionó positivamente con los parámetros morfológicos y funcionales de VI, de modo que, a mayor cantidad de fibrosis focal miocárdica, mayor dilatación VI (VTDVI  $r$  0,3631,  $p$  0,0019; VTSVI  $r$  0,5370,  $p$  < 0,0001) (**Figura 12A y B**), mayor hipertrofia VI (Masa VI  $r$  0,4133,  $p$  0,0008) (**Figura 12C**), y menor FEVI (FEVI  $r$  -0,5390,  $p$  < 0,0001) (**Figura 12D**). Ni el grado de severidad de la estenosis, ni los niveles de BNP se asociaron con la masa RT.

Es importante destacar que el nivel de sST2 se correlacionó con la masa de RT ( $r$  0,7497,  $p$  < 0,0001) (**Figura 12E**) y con la masa VI ( $r$  0,3977,  $p$  0,0022) (**Figura 12F**).



**Figura 12.** Se observó correlación significativa entre: **A.** Masa de RT y VTDVI. **B.** Masa de RT y VTSVI. **C.** Masa de RT y masa VI. **D.** Masa de RT y FEVI. **E.** Masa de RT y niveles circulantes de sST2. **F.** Niveles circulantes de sST2 y masa VI.

## **5.5 La fibrosis intramiocárdica está asociada con mayores niveles de sST2 circulante en la estenosis aórtica severa**

Los pacientes con RT + fueron subclasificados en función del patrón de fibrosis miocárdica y se compararon las características clínicas de los tres grupos de pacientes: RT -, RT intramiocárdico y RT subendocárdico (**Tabla 4**).

Entre los pacientes con RT+ el 54,8% (23 pacientes) presentaron fibrosis intramiocárdica y el 42,4% (19 pacientes) fibrosis subendocárdica.

La presencia de enfermedad arterial coronaria y los antecedentes de infarto de miocardio previo fueron más frecuentes entre los pacientes con RT subendocárdico (78,9% vs 26,1%, p 0,001; 21,1% vs 4,3%, p 0,008, respectivamente). Entre los pacientes con RT subendocárdico se confirmó concordancia entre la localización de la enfermedad coronaria y la topografía de la fibrosis subendocárdica en 14 de 15 pacientes (73,7%). Sin embargo, comprobamos que este patrón no es exclusivo de los pacientes con enfermedad coronaria y que puede estar en relación con la disminución de la perfusión miocárdica en el contexto de la hipertrofia miocárdica, puesto que en 1 paciente con enfermedad coronaria no hubo concordancia entre la fibrosis y la localización de las lesiones (5,3%) y 4 pacientes presentaron RT subendocárdico sin tener enfermedad coronaria asociada (21%). Sólo en 5 de los 19 pacientes se había diagnosticado un IAM clínico previo.

La valoración de la CF NYHA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes (p 0,041), con una mayor proporción de pacientes en CF avanzada en pacientes con RT subendocárdico (52,6% en CF III). No hubo diferencias significativas en cuanto a la clínica de angina. Los pacientes con RT intramiocárdico fueron los que más síncope presentaron de forma estadísticamente significativa (RT intramiocárdico 34,8% vs. RT subendocárdico 5,3%, p 0,003). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de BNP entre los dos tipos de patrones de RT.

En cuanto a los parámetros morfológicos y funcionales del ventrículo izquierdo, si bien no se alcanzó la significación estadística entre los dos tipos de patrones de RT, sí se observó de acuerdo con lo previamente publicado cierta tendencia a que los pacientes con RT intramiocárdico tuvieran VI más hipertróficos y aquellos con RT subendocárdico unos VI más dilatados y con peor FEVI.

Los niveles circulantes de sST2 fueron significativamente más elevados en pacientes con fibrosis intramiocárdica en comparación con aquellos con fibrosis subendocárdica (38,09±4,13 vs 30,84±8,95 ng/mL, p 0,007).

**Tabla 4. Comparación en función de los patrones de realce tardío.**

	RT intramio	RT subendo	RT -	p
N (%)	23 (29,1%)	19 (24,1%)	37 (46,8%)	
Edad (años), media ± DE	72,6±5,7	71,2±10,86	72,5±7,7	0,827
Hombres, n (%)	16 (69,6%)	14 (73,7%)	18 (48,6%)	0,113
IAM previo, n (%)	<b>1 (4,3%)</b>	<b>4 (21,1%)</b>	<b>0</b>	<b>0,008</b>
Enf. coronaria, n (%)	<b>6 (26,1%)</b>	<b>15 (78,9%)</b>	<b>10 (27%)</b>	<b>0,001</b>
CF NYHA, n (%)				
I	<b>5 (21,7%)</b>	<b>2 (10,5%)</b>	<b>1 (2,7%)</b>	<b>0,041</b>
II	<b>11 (47,8%)</b>	<b>7 (36,8%)</b>	<b>26 (70,3%)</b>	
III	<b>6 (26,1%)</b>	<b>10 (52,6%)</b>	<b>8 (21,6%)</b>	
IV	<b>1 (4,3%)</b>	<b>0</b>	<b>2 (5,4%)</b>	
Angina, n (%)	8 (34,8%)	8 (42,1%)	13 (35,1%)	0,855
Síncope, n (%)	<b>8 (34,8%)</b>	<b>1 (5,3%)</b>	<b>2 (5,4%)</b>	<b>0,003</b>
Grad máx (mmHg), media ± DE	85,2±25,1	68,1±13,2	80,8±21,5	0,030
Grad medio (mmHg), media±DE	54,5±17,7	44,5±10,4	52,8±13,7	0,06
AVA (cm <sup>2</sup> ), media ± DE	0,74±0,21	0,77±0,17	0,74±0,15	0,847
DTDVI (mm), media ± DE	50,4±6,5	<b>51,4±6,7</b>	<b>46,8±4,3</b>	<b>0,007</b>
SIV (mm), media ± DE	14±3	13,6±2,4	12,5±2	0,049
VTDVI (ml), media ± DE	144,3±45	<b>149,9±61,2</b>	<b>116±26,1</b>	<b>0,008</b>
VTSVI (ml), media ± DE	<b>58,8±36,1</b>	<b>72,5±51,8</b>	<b>35,1±16,2</b>	<b>0,001</b>
Masa VI (g), media ± DE	<b>194,7±50,8</b>	188,6±81,1	<b>146,8±35</b>	<b>0,005</b>
FEVI (%), media ± DE	61,8±15,4	<b>55,6±16,9</b>	<b>70,4±9,7</b>	<b>0,001</b>
FEVI<50%, n (%)	<b>13% (3)</b>	<b>36,8% (7)</b>	<b>0</b>	<b>0,001</b>
BNP (pg/mL), mediana (RIQ)	<b>193 (78,7-671,7)</b>	<b>208,5 (112,2-254)</b>	<b>78,6 (46-219)</b>	<b>0,022</b>
sST2 (ng/mL), media ± DE	<b>38,09±4,13</b>	<b>30,84±8,95</b>	<b>17,97±5,7</b>	<b>0,000</b>

RT, realce tardío; intramio, intramiocárdico; subendo, subendocárdico; IAM, infarto agudo de miocardio; CF NYHA, clase funcional según la New York Heart Association; BNP, péptido natriurético cerebral; sST2, ST2 soluble; Grad, gradiente; AVA, área valvular aórtica; DTDVI, diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; SIV, espesor del septo interventricular; VTDVI, volumen telediastólico ventrículo izquierdo; VTSVI, volumen telesistólico ventrículo izquierdo; VI, ventrículo izquierdo; FEVI, fracción de eyección ventrículo izquierdo

## 5.6 La presencia de realce tardío y la elevación de los niveles de sST2 como marcadores de enfermedad más avanzada

Tras la observación de que todos los pacientes con FEVI <50% presentaban RT +, agrupamos a los pacientes en tres grupos según la FEVI y la presencia de RT: 1) FEVI >50% y RT -; 2) FEVI >50% y RT +; 3) FEVI <50% y RT +. Estos tres grupos podrían corresponder con tres estadios evolutivos en la historia natural de la enfermedad (**Tabla 5**).

A igualdad de severidad en la estenosis aórtica, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes en todos los parámetros morfológicos y funcionales evaluados mediante RMN cardiaca. Si bien las diferencias significativas fueron entre los grupos con FEVI >50% al comparar con aquellos con FEVI <50%, se muestra un progresivo remodelado a lo largo de los tres grupos (VI más

hipertróficos, más dilatados y con peor FEVI). Así identificamos un grupo de pacientes, aquellos con FEVI >50% y RT +, con enfermedad probablemente más avanzada. Los niveles de BNP también fueron significativamente en aumento entre los tres grupos. Es de destacar que entre los pacientes con FEVI >50%, los pacientes con RT + presentaron niveles de sST2 significativamente más elevados en comparación con aquellos con RT - ( $36,6 \pm 5,3$  vs.  $17,97 \pm 5,7$  ng/mL,  $p 0,001$ ).

**Tabla 5. Comparación en función de los patrones de realce tardío.**

	FE>50% y RT -	FE>50% y RT +	FE<50% y RT +	p
N (%)	37 (46,8%)	32 (40,5%)	10 (12,7%)	
Edad (años), media $\pm$ DE	72,5 $\pm$ 7,7	72,5 $\pm$ 7,5	70,3 $\pm$ 8	0,728
Hombres, n (%)	16 (48,6%)	23 (71,9%)	7 (70%)	0,117
IAM previo, n (%)	0	<b>3 (9,4%)</b>	<b>2 (20%)</b>	<b>0,046</b>
Enf. coronaria, n (%)	<b>10 (27%)</b>	<b>14 (43,8%)</b>	<b>7 (70%)</b>	<b>0,038</b>
CF NYHA, n (%)				
I	<b>1 (2,7%)</b>	<b>7 (21,9%)</b>	<b>0</b>	<b>0,024</b>
II	<b>26 (70,3%)</b>	<b>14 (43,8%)</b>	<b>4 (40%)</b>	
III	<b>8 (21,6%)</b>	<b>10 (31,3%)</b>	<b>6 (60%)</b>	
IV	<b>2 (5,4%)</b>	<b>1 (3,1%)</b>	<b>0</b>	
Grad máx (mmHg), media $\pm$ DE	80,8 $\pm$ 21,5	76,7 $\pm$ 18	79,8 $\pm$ 33,3	0,743
Grad medio (mmHg), media $\pm$ DE	52,8 $\pm$ 13,7	49,2 $\pm$ 13,1	52,5 $\pm$ 22,2	0,581
AVAo cont (cm <sup>2</sup> ), media $\pm$ DE	0,74 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,17	0,69 $\pm$ 0,22	0,456
DTDVI (mm), media $\pm$ DE	<b>46,8<math>\pm</math>4,3</b>	<b>49,7<math>\pm</math>5,9</b>	<b>54,7<math>\pm</math>7,1</b>	<b>0,001</b>
SIV (mm), media $\pm$ DE	<b>12,5<math>\pm</math>2</b>	<b>13,6<math>\pm</math>2,8</b>	<b>14,5<math>\pm</math>2,6</b>	<b>0,034</b>
VTDVI (ml), media $\pm$ DE	<b>116<math>\pm</math>26,1</b>	<b>130,9<math>\pm</math>37,4</b>	<b>195,3<math>\pm</math>63,6</b>	<b>0,001</b>
VTSVI (ml), media $\pm$ DE	<b>35,1<math>\pm</math>16,2</b>	<b>46,3<math>\pm</math>22,2</b>	<b>122,3<math>\pm</math>45,6</b>	<b>0,001</b>
Masa VI (g), media $\pm$ DE	<b>146,8<math>\pm</math>35</b>	<b>169,8<math>\pm</math>43,8</b>	<b>280,4<math>\pm</math>64,7</b>	<b>0,001</b>
FEVI (%), media $\pm$ DE	<b>70,4<math>\pm</math>9,7</b>	<b>66<math>\pm</math>11,2</b>	<b>38<math>\pm</math>8,9</b>	<b>0,001</b>
BNP (pg/mL), mediana (RIQ)	<b>78,6 (46-219)</b>	<b>188 (79,5-283,5)</b>	<b>365,8 (102-1515)</b>	<b>0,012</b>
sST2 (ng/mL), media $\pm$ DE	<b>17,97<math>\pm</math>5,7</b>	<b>36,6<math>\pm</math>5,3</b>	<b>25,73<math>\pm</math>11</b>	<b>0,001</b>

RT, realce tardío; FE, fracción de eyección; IAM, infarto agudo de miocardio; CF NYHA, clase funcional según la New York Heart Association; BNP, péptido natriurético cerebral; sST2, ST2 soluble; Grad, gradiente; AVA, área valvular aórtica; DTDVI, diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; SIV, espesor del septo interventricular; VTDVI, volumen telediastólico ventrículo izquierdo; VTSVI, volumen telesistólico ventrículo izquierdo; VI, ventrículo izquierdo; FEVI, fracción de eyección ventrículo izquierdo



# DISCUSIÓN

## **1. Papel fisiopatológico del sST2 en la estenosis aórtica severa**

En nuestro estudio hemos investigado los efectos del sST2 en fibroblastos cardiacos humanos para poder profundizar en el conocimiento del papel fisiopatológico que tiene el sST2 en la estenosis aórtica severa. Hemos observado que el sST2 aumenta el estrés oxidativo afectando a la función mitocondrial, favorece la inflamación y promueve la fibrosis en fibroblastos cardiacos humanos.

### **1.1 Consideraciones generales sobre los hallazgos del papel del sST2 en el estrés oxidativo y la inflamación en fibroblastos cardiacos humanos**

Usando una aproximación proteómica, la MFN-1 se ha identificado como una proteína cuya expresión es reprimida por el tratamiento con sST2. Tratando fibroblastos cardiacos humanos con sST2 observamos una reducción de MFN-1, un aumento de marcadores de estrés oxidativo como la nitrotirosina, MDA, CML y en consecuencia un incremento de la producción de peróxido de hidrógeno. Además, sST2 también provoca la expresión y secreción de marcadores proinflamatorios en fibroblastos cardiacos humanos. Estudiando biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa observamos que muestran niveles de sST2 cardiaco aumentados en comparación con biopsias de pacientes sin enfermedad cardiovascular, mostrando además asociación con una reducción de MFN-1 y con un aumento de marcadores inflamatorios. Así pues, nuestro estudio revela una nueva vía patogénica por la cual el sST2 promueve el estrés oxidativo y la inflamación contribuyendo al daño cardiaco.

Los estudios que analizan los efectos del sST2 en células cardiacas son escasos. En cardiomiocitos, el sST2 recombinante parece ser perjudicial al bloquear los efectos antihipertróficos de la IL-33<sup>35</sup>. Asimismo, se ha descrito que la IL-33 ejerce efectos antioxidantes en cardiomiocitos adultos<sup>44</sup>. Nuestro estudio muestra por primera vez que el sST2 ejerce efectos deletéreos en fibroblastos cardiacos, aumentando el estrés oxidativo y la inflamación.

La MFN-1 es una proteína involucrada en la regulación de la fusión mitocondrial, junto con las proteínas MFN-2 y OPA-1. En tejidos altamente oxidativos como el miocardio, las mitocondrias juegan un papel central en el mantenimiento de la función cardíaca. El equilibrio entre la fusión y fisión mitocondrial regula la morfología mitocondrial. El desequilibrio entre estos dos procesos opuestos contribuye al aumento de la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), lo cual tiene consecuencias perjudiciales para la función cardíaca<sup>45</sup>. La inhibición de la fusión mitocondrial provoca una fragmentación de la mitocondria y una disminución del consumo de oxígeno<sup>46</sup>. Alteraciones en la dinámica mitocondrial han sido descritas en otras patologías cardiovasculares como la diabetes, la aterosclerosis, isquemia-reperfusión, la hipertrofia miocárdica o la insuficiencia cardíaca descompensada. En nuestro estudio se muestra por primera vez que el sST2 ejerce efectos deletéreos en fibroblastos cardíacos humanos disminuyendo la expresión de MFN-1 sin modificar los niveles de las otras dos proteínas claves en la fusión mitocondrial, MFN-2 y OPA-1, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno y llevando a la producción de moléculas proinflamatorias. Cabe resaltar que en condiciones normales las funciones de MFN-1 puede ser reemplazadas por MFN-2 y viceversa. Así, en situaciones donde la expresión de MFN-1 se reduce, la fusión mitocondrial puede ser recuperada por la sobreexpresión de MFN-2 y viceversa<sup>45,47,48</sup>. En nuestro estudio, sin embargo, los niveles de MFN-2 no aumentaron en las células tratadas con sST2, sugiriendo que la fusión mitocondrial puede ser dañada por sST2. Interrumpir la fusión mitocondrial mediante la supresión de la expresión de MFN-1 puede alterar la distribución y morfología de la mitocondria y precipitar la disfunción mitocondrial<sup>49</sup>. Se ha descrito que en general, existe una correlación directa entre la fusión mitocondrial y la capacidad de fosforilación oxidativa<sup>50</sup>. Generando controversia en este aspecto, se ha descrito que miocitos que no expresan MFN-1 están protegidos contra la muerte celular inducida por radicales libres de oxígeno<sup>51</sup>. Sin embargo, existe evidencia que muestra que la expresión de MFN-1 está reprimida en modelos experimentales de daño cardíaco como en la hipertensión pulmonar arterial<sup>52</sup> y en la isquemia-reperfusión<sup>53</sup>. De acuerdo con estas evidencias, nuestro estudio muestra que el incremento de sST2 va paralelo a la reducción de MFN-1 en miocardio de pacientes con estenosis aórtica, sugiriendo que la alteración de la fusión mitocondrial podría ser un mecanismo deletéreo que facilitara la oxidación de proteínas miocárdicas y la inflamación.

El NF- $\kappa$ B es un complejo proteico que controla la transcripción del DNA, presente en distintos tipos celulares e implicado en la respuesta celular frente a distintos estímulos (estrés, humoral...). El aumento en la producción de ROS y la activación del NF- $\kappa$ B son conocidas señales intracelulares involucradas en la inflamación cardíaca<sup>45,54</sup>. Se ha descrito que IL-33 puede suprimir la producción de ROS<sup>35</sup>, pudiendo estar implicada en la activación de NF- $\kappa$ B<sup>55</sup>. En nuestro estudio, observamos que sST2 es capaz de activar la vía NF- $\kappa$ B en fibroblastos cardíacos humanos, reduciendo la MFN-1, aumentando los marcadores de estrés oxidativo y los marcadores de inflamación.

La respuesta inflamatoria en condiciones de estrés oxidativo puede provocar daño precoz de un órgano y llevar a su disfunción. En nuestro estudio, mostramos por primera vez que el sST2 ejerce efectos proinflamatorios en los fibroblastos cardíacos humanos. Este resultado es reforzado en biopsia miocárdica humana, donde los niveles de sST2 se correlacionan positivamente con la expresión de marcadores de inflamación. De acuerdo con este resultado, se ha descrito asociación entre los niveles séricos de sST2 y los niveles de proteína C reactiva en pacientes con estenosis aórtica<sup>40</sup> y en pacientes tras un accidente cerebrovascular isquémico agudo<sup>56</sup>. Por lo tanto, comprender las vías que llevan a la activación inicial de las vías inflamatorias en el estrés oxidativo es esencial para idear estrategias que pueden limitar las consecuencias perjudiciales de la respuesta inflamatoria al daño.

En resumen, el presente estudio muestra que sST2 podría ejercer un efecto deletéreo afectando la fusión mitocondrial, llevando a un aumento del estrés oxidativo y a la inflamación en fibroblastos cardíacos humanos. Dada la importancia de la dinámica de la mitocondria en la insuficiencia cardíaca, así como el papel esencial de los fibroblastos cardíacos en el desarrollo de la inflamación cardíaca, sería de interés continuar con el desarrollo de estudios centrados en la interacción entre las nuevas moléculas de señalización como el sST2 y el estrés oxidativo en fibroblastos cardíacos.

## 1.2 Consideraciones generales sobre los hallazgos del papel del sST2 en la fibrosis en fibroblastos cardiacos humanos

En nuestro estudio observamos que el sST2 aumenta la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos activados, demostrado mediante el aumento en la expresión de marcadores de activación fibroblástica, así como del incremento en la secreción de mediadores de fibrosis y de colágeno tipo I. Mediante un análisis proteómico, la NRP-1 se ha identificado como una proteína sobreexpresada por sST2. Nuestro estudio muestra que los efectos profibróticos del sST2 están parcialmente mediados por la NRP-1, la cual emerge como un nuevo inductor de activación y diferenciación de fibroblastos hacia un fenotipo profibrótico. Además, hemos identificado a NF- $\kappa$ B como la vía de señalización central que media los efectos profibróticos de sST2 vía NRP-1, y eso ha sido posteriormente validado *in vivo*.

Hasta ahora, la mayoría de los efectos descritos de sST2 estaban en relación con su función como receptor “señuelo”, inhibiendo los efectos beneficiosos de la unión IL-33/ST2L<sup>34,35</sup>. Sin embargo, otros autores han descrito que sST2 podría ejercer otros efectos independientemente del secuestro de IL-33<sup>57</sup>. En línea con esta evidencia, ya previamente hemos descrito los efectos deletéreos desencadenados por la estimulación con sST2 en fibroblastos cardiacos, aumentando la producción de ROS y moléculas inflamatorias. Además, en nuestro estudio mostramos cómo el sST2 también aumenta los marcadores de activación de fibroblastos, la producción de colágeno y otros marcadores profibróticos como la galectina-3, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTCF) o el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Nuestros resultados están de este modo en la línea de las investigaciones que demuestran que sST2 es capaz de ejercer efectos deletéreos independientemente de la IL-33. De hecho, tanto en nuestro modelo *in vitro* como en nuestro modelo animal de sobrecarga de presión, los niveles de IL-33 no se vieron modificados<sup>58</sup>. De hecho, las vías intracelulares y los factores de transcripción activados por IL-33 tales como MyD88, TRAF6 o AP1 se encontraron ligeramente disminuidos en los corazones de ratas sometidas a sobrecarga de presión sugiriendo que la vía de la IL-33 se encontraba reprimida en esta condición experimental<sup>58</sup>.

La NRP-1 es una proteína transmembrana que se ha identificado como un correceptor de múltiples factores de crecimiento, entre ellos la TGF- $\beta$ 1, aumentando su respuesta, tanto en su forma latente como activa<sup>59</sup>. El splicing alternativo del mRNA que codifica la NRP-1 da lugar a varias isoformas de NRP-1 soluble (sNRP-1)<sup>60</sup>. En nuestro estudio observamos que el tratamiento con sST2 aumenta tanto la NRP-1 transmembrana como la soluble en fibroblastos cardiacos humanos. Estos resultados fueron reforzados en el miocardio de modelos de rata con sobrecarga de presión, donde los niveles elevados de ST2 se correlacionaron de forma positiva con la expresión de NRP-1. Nuestros datos sugieren que la NRP-1 media parcialmente los efectos profibróticos del sST2 en fibroblastos cardiacos humanos. Esto está en concordancia con otras observaciones que muestran que la NRP-1 podría jugar un papel regulador en la fibrosis inducida por TGF- $\beta$ 1<sup>61</sup>. En nuestro estudio, vemos cómo la sNRP-1 exógena induce la activación de fibroblastos cardiacos, así como la síntesis de colágeno. Aunque en nuestro conocimiento, es la primera vez que la NRP-1 ha sido estudiada en fibroblastos cardiacos humanos, ya se había relacionado con fibrosis en otras situaciones patológicas. Se ha descrito que la NRP-1 favorece la progresión y agravamiento de la cirrosis hepática<sup>62</sup>. La sobreexpresión de NRP-1 promueve la transición endotelio-mesenquimal y la fibrosis asociada, habiéndose descrito en tejido de adenocarcinoma ductal pancreático, una correlación positiva entre los niveles de NRP-1, los marcadores de transición endotelio-mesenquimal y la expresión de genes profibróticos<sup>63</sup>. Además, la pérdida específica en endotelio de NRP-1 reprime e inactiva la señal de TGF- $\beta$ 1, llevando a una reducción de colágeno tipo I y CTGF<sup>63</sup>. Otros resultados indican que anticuerpos NRP-1 reducen marcadores de fibrogénesis e inhiben fibrosis en células hepáticas estrelladas<sup>59,62</sup>. Así pues, la NRP-1 emerge como una atractiva diana en el contexto de las enfermedades fibróticas.

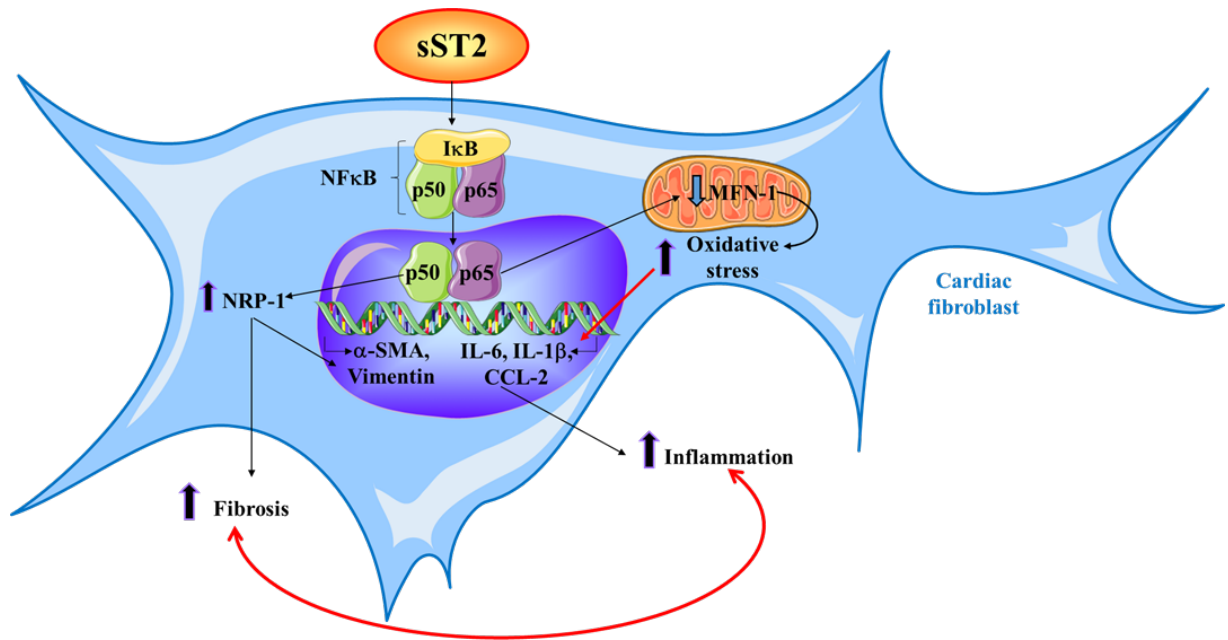
NF- $\kappa$ B regula directamente la expresión de genes relacionados con la fibrosis, incluyendo la fibronectina y las MMPs<sup>64</sup>. Además, la fosforilación de NF- $\kappa$ B promueve la transformación de fibroblastos cardiacos en miofibroblastos<sup>65</sup>. La fosforilación de NF- $\kappa$ B también media el proceso profibrótico estimulado por angiotensina II<sup>66</sup> y regula los niveles de varias citoquinas profibróticas, moléculas de adhesión leucocitaria y moléculas inflamatorias<sup>67</sup>. Nuestros resultados muestran que NF- $\kappa$ B media los efectos profibróticos inducidos por sST2. Estos resultados están en desacuerdo con un estudio previo que muestra que sST2 bloquea la producción de IL-6 mediante la supresión de la activación

de NF- $\kappa$ B en células monocíticas<sup>68</sup>. Sin embargo, en el presente estudio, tanto sST2 como NRP-1, un mediador potencial de los efectos de sST2, sí promueven la activación de la fosforilación de NF- $\kappa$ B en fibroblastos cardiacos humanos. Así pues, NF- $\kappa$ B parece ser la llave reguladora en el control de la activación de los miofibroblastos y la secreción de colágeno provocada por sST2 y NRP-1.

La fibrosis es un componente fundamental en el remodelado estructural adverso miocárdico en la insuficiencia cardiaca<sup>69</sup>. En pacientes con insuficiencia cardiaca, la medida de sST2 aporta una visión general serológica importante del proceso fibrótico miocárdico acumulativo<sup>70</sup>. Nuestros datos refuerzan el papel de sST2 como biomarcador y también surge como una diana terapéutica del proceso fibrótico, describiendo los mecanismos mediante los cuales niveles elevados de sST2 pueden contribuir a la activación de fibroblastos y a la acumulación de colágeno.

### **1.3 Integración de los efectos del sST2 como inductor de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en fibroblastos cardiacos humanos**

En resumen, nuestros resultados *in vitro* demuestran que sST2 ejerce un papel deletéreo en fibroblastos cardiacos humanos. sST2 induce la fosforilación de NF- $\kappa$ B, lo cual provoca dos fenómenos paralelos y complementarios. Por un lado, la reducción en la proteína MFN-1, implicada en la fusión mitocondrial, induciendo un aumento del estrés oxidativo en la célula e iniciando la síntesis de moléculas proinflamatorias. Por otro lado, el aumento de la NRP-1 provoca un incremento en las moléculas profibróticas. Hay una asociación directa entre los fenómenos de inflamación y fibrosis en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, y más concretamente en la estenosis aórtica. Nuestros hallazgos posicionan a sST2 como un nuevo inductor de ambos procesos. Así, la inhibición farmacológica de sST2 sería beneficiosa y debería ser tenida en cuenta como estrategia para reducir la inflamación y la fibrosis asociada a esta patología.



## 2. Utilidad clínica del sST2 en pacientes con estenosis aórtica severa

En nuestro estudio observamos que existe relación entre los niveles de sST2 en sangre y la presencia y cantidad de realce tardío en la RMN de pacientes con estenosis aórtica severa. En resumen, los niveles de sST2 elevados en sangre nos permiten identificar a pacientes con estenosis aórtica severa con realce tardío. El sST2 se presenta como una potencial herramienta en la práctica clínica habitual, que nos puede ayudar en la toma de decisiones en el seguimiento y aportar información pronóstica en los pacientes con estenosis aórtica severa.

La RMN cardiaca nos posibilita valorar la presencia y el patrón de realce tardío (intramiocárdico o subendocárdico), así como cuantificar la cantidad de fibrosis focal miocárdica en los pacientes con estenosis aórtica<sup>21</sup>. La fibrosis focal miocárdica es característica de fases avanzadas del proceso de hipertrofia miocárdica en respuesta a la sobrecarga de presión. La hipertrofia progresiva de los cardiomiocitos lleva a la degeneración y finalmente muerte celular, apareciendo en consecuencia una fibrosis focal de reemplazo, que desembocará en la aparición de insuficiencia cardiaca<sup>12</sup>. Son varios los estudios que han demostrado el importante impacto de la fibrosis focal miocárdica en el



remodelado ventricular<sup>24</sup>, en la evolución clínica<sup>25</sup> y el pronóstico de estos pacientes, siendo predictor independiente de mortalidad<sup>23,27,29</sup>.

En los últimos años se ha postulado que el sST2 tiene un papel fisiopatológico y pronóstico en la estenosis aórtica. Conocemos que la expresión del sST2 está elevada en cardiomiocitos en respuesta a un estrés mecánico<sup>35</sup>, así como en válvulas explantadas de pacientes con estenosis aórtica comparadas con válvulas con insuficiencia<sup>39</sup>. El sST2 en sangre está elevado en pacientes con estenosis aórtica en respuesta a la sobrecarga de presión<sup>40</sup> y sus niveles se asocian con la presencia de síntomas y con la evolución clínica de estos pacientes<sup>41</sup>. Igualmente se ha demostrado que en pacientes con estenosis aórtica severa que van a TAVI el sST2 tiene valor pronóstico, siendo predictor independiente de mortalidad<sup>42,43</sup>.

En nuestro estudio, por primera vez, establecemos una relación entre los niveles de sST2 en sangre y la presencia de fibrosis focal miocárdica de reemplazo evaluada mediante resonancia cardiaca con secuencias de realce tardío en los pacientes con estenosis aórtica severa. Son pocos los estudios que han investigado si existe relación entre los niveles de sST2 y el realce tardío evaluado mediante RMN cardiaca, y los resultados son discordantes en función de la cardiopatía evaluada. No se encontró relación entre los niveles de sST2 y RT en pacientes con cicatriz en relación con infarto o miocarditis<sup>71</sup>. En un estudio realizado con pacientes con miocardiopatía hipertrófica se observó correlación entre los niveles de sST2 y la masa VI, si bien no se encontró asociación con la masa de RT<sup>72</sup>. Sin embargo, en un estudio reciente en pacientes con miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho, se observó que los pacientes con afectación del ventrículo izquierdo presentaban niveles más elevados de sST2 y que existía correlación entre sST2 y la masa de RT, así como asociación con una evolución desfavorable de insuficiencia cardiaca<sup>73</sup>. Nuestros datos son concordantes con este último estudio. Será interesante ampliar la investigación en este campo y estudiar en qué escenarios fisiopatológicos el sST2 puede ser útil como marcador de realce tardío.

En la estenosis aórtica severa, la presencia de realce tardío se da entre un 27-62% de los pacientes según las series<sup>19,22</sup> y se asocia con el remodelado ventricular<sup>24</sup>. De acuerdo con lo descrito, en nuestro estudio un 53,2% de los pacientes estudiados presentaron fibrosis focal miocárdica y aquellos con RT + tenían unos VI significativamente más dilatados, más hipertróficos y con menor FEVI. Todos los pacientes con disfunción ventricular (FEVI <50%) tenían RT +. Además, observamos que la cantidad de fibrosis focal

miocárdica tenía clara relación con la magnitud del remodelado, de modo que a mayor masa de RT, encontramos VI más dilatado, más hipertrófico y con menor FEVI. Ni el grado de estenosis aórtica, ni los niveles de BNP se relacionaron con la masa de RT.

En nuestro estudio describimos por primera vez que los pacientes con estenosis aórtica severa con RT + tiene niveles significativamente más elevados de sST2 que aquellos sin RT. Y además existe correlación entre los niveles de sST2 y la masa de RT. Igualmente, los niveles de sST2 se relacionan con el remodelado ventricular, especialmente con la hipertrofia VI. Los niveles de sST2 se correlacionan positivamente con la masa VI. En esta línea, los pacientes con RT intramiocárdico, que muestran VI más hipertróficos en comparación con aquellos con RT subendocárdico<sup>23</sup>, son los que presentan niveles más elevados de sST2. Nuestros resultados refuerzan la idea de que sST2 podría ser utilizado como un útil marcador de fibrosis focal miocárdica y de la masa de RT en pacientes con estenosis aórtica severa. Estos hallazgos, abren la puerta a futuros estudios en otras cardiopatías en los que la identificación de fibrosis tenga relevancia clínica y pronóstica.

La RMN cardíaca a día de hoy es la técnica de elección para valorar de forma no invasiva la fibrosis miocárdica. Sin embargo, la RMN cardíaca es una técnica cara, con disponibilidad limitada en centros especializados y contraindicada en ciertos pacientes como aquellos con FG <30 o portadores de ciertos dispositivos. Por este motivo, a pesar de la evidencia, la RMN no es una técnica empleada de forma rutinaria en la práctica clínica habitual en este grupo de pacientes, perdiendo una valiosa información pronóstica. En nuestro estudio establecemos un punto de corte de sST2 28,2 ng/mL por el cual podemos identificar con una alta sensibilidad y especificidad a los pacientes con estenosis aórtica severa con RT +. Así pues, nuestros resultados sugieren que la cuantificación de sST2 circulante (>28,2 ng/mL) puede ser una alternativa a la RMN cardíaca para la identificación de los pacientes con estenosis aórtica severa con realce tardío. Desde el punto de vista clínico consideramos que es un hallazgo importante, ya que nos permitiría identificar a los pacientes con estenosis aórtica severa con fibrosis focal miocárdica con una determinación analítica, de una forma sencilla, más barata (aproximadamente 300 vs 12 euros) y aplicable en la práctica clínica diaria, aportando información relevante sobre el perfil y pronóstico del paciente. Además, es una prueba que podría hacerse de forma seriada en el seguimiento clínico de estos pacientes, facilitando la toma de decisiones. En los últimos años, se ha desarrollado un nuevo método de medida para sST2 que ha abaratado aún más los costes y ha permitido su implantación en varios centros

hospitalarios, sobre todo en el contexto de la IC aguda. De hecho, la obtención de muestras para la determinación seriada del sST2 proporciona una estratificación del riesgo adicional en los pacientes ambulatorios con insuficiencia cardiaca descompensada<sup>74</sup>.

En los pacientes con estenosis aórtica, cuando la fibrosis focal miocárdica de reemplazo aparece, ésta progresa rápidamente y además sabemos que es irreversible<sup>28</sup>. El poder identificar la presencia de fibrosis de reemplazo con una analítica de sangre, sería interesante para poder priorizar la cirugía, antes de que progresara el desarrollo de la fibrosis y la disfunción ventricular.

Niveles basales de sST2 >29 ng/mL se han asociado con una evolución desfavorable tras TAVI y se postula como un predictor de mortalidad<sup>42</sup>. Este valor es similar al que establecemos en nuestro estudio, por lo que probablemente están seleccionando los pacientes con RT + en RMN cardiaca, factor con valor pronóstico ya claramente establecido.

En nuestro estudio destacamos un grupo interesante de pacientes que son aquellos con FEVI conservada y RT +. Probablemente este grupo de pacientes constituya un estadio intermedio en la evolución de la enfermedad, entre los pacientes con FEVI conservada con RT – y los pacientes con FEVI reducida (FEVI <50%) todos ellos con RT +. Consideramos que este grupo de pacientes con FEVI conservada y RT + es un grupo de mayor riesgo frente a los que no tienen RT, con cardiopatía más avanzada, que precede a la disfunción ventricular. En nuestro estudio mostramos que los pacientes con FEVI conservada y RT + presentan unos niveles de sST2 significativamente más elevados que aquellos sin RT. El determinar los niveles de sST2 en sangre en los pacientes con FEVI conservada, nos permitiría identificar a este grupo de pacientes con enfermedad más avanzada, con mayor riesgo de desarrollar un remodelado adverso VI y con peor pronóstico clínico.

Esto podría adquirir un especial interés clínico en el seguimiento de los pacientes con estenosis aórtica severa asintomática. La indicación de cirugía en los pacientes con estenosis aórtica severa está basada fundamentalmente en la presencia de síntomas o disfunción ventricular<sup>10</sup>. Así pues, los pacientes con estenosis aórtica severa asintomática y FEVI conservada son seguidos semestralmente en la consulta de cardiología para vigilar la aparición de síntomas o la aparición de una FEVI <50%. La valoración clínica en ocasiones es complicada pues los pacientes se adaptan a su situación funcional y evitan

esfuerzos que les provocan síntomas, por lo que son falsamente asintomáticos. En otros casos, especialmente en paciente añosos, con comorbilidad o sedentarismo, es difícil identificar si los síntomas están en relación con la cardiopatía o están más en relación con la edad, la copatología o el desentrenamiento. En cuanto a la FEVI, sabemos que en ocasiones permanece normal por largo tiempo, mientras que van apareciendo alteraciones en la función y estructura miocárdica, estableciéndose progresivamente un daño miocárdico irreversible, que puede incluso aparecer en estenosis aórtica moderada y previo al desarrollo de síntomas.

Así pues, introducir en el seguimiento la variable fibrosis focal miocárdica mediante la determinación de sST2 en sangre, podría ser útil en el seguimiento, aportando información pronóstica relevante y ayudando a la toma de decisiones clínicas sobre cuando realizar el reemplazo valvular aórtico. Aquellos pacientes asintomáticos, con FEVI conservada, pero con niveles elevados de sST2, es posible que pudieran beneficiarse de un seguimiento más estrecho o incluso de una cirugía de sustitución valvular precoz.

Los resultados del estudio en curso EVOLVED que investiga si los pacientes con estenosis aórtica con realce tardío en RMN cardiaca se pueden beneficiar de una sustitución valvular precoz antes de que progrese la fibrosis y la disfunción ventricular, nos darán la clave para optimizar el manejo de estos pacientes<sup>30</sup>.

Nuestro estudio abre la puerta a futuros ensayos que podrán determinar si el uso de biomarcadores de fibrosis como el sST2 pueden usarse para mejorar la evolución de los pacientes con estenosis aórtica severa asintomática.

En cuanto a la asociación entre los niveles de sST2 y la fibrosis focal de reemplazo, se necesitarían otros estudios que ayudaran a comprender esta relación desde el punto de vista fisiopatológico y confirmaran este hallazgo. Sin embargo, podríamos especular que, en la estenosis aórtica, el aumento en la producción de sST2 producido por la sobrecarga de presión, podría actuar sobre cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales. Nuestros datos muestran que sST2 a nivel de los fibroblastos aumenta el estrés oxidativo afectando a la función mitocondrial, y favorece la inflamación. De hecho, un aumento de estrés oxidativo y del proceso inflamatorio ha sido descrito previamente en la estenosis aórtica<sup>75</sup>. Así, el estrés oxidativo es capaz de inducir la pérdida cardiomiocitaria por apoptosis y necrosis<sup>76</sup>. Además, el sST2 promueve la diferenciación a miofibroblastos, la producción de colágeno y otras moléculas profibróticas. Es posible que en un contexto de

elevación de sST2, el aumento del estrés oxidativo contribuya a la muerte del cardiomiocito y que así aumente la fibrosis focal de reemplazo. Sería muy interesante ampliar el estudio en este aspecto poder confirmar esta hipótesis.

# CONCLUSIONES

1. El tratamiento con sST2 disminuye la expresión de MFN-1 en fibroblastos cardiacos humanos, afectando la fusión mitocondrial, lo cual promueve un aumento del estrés oxidativo y la inflamación.
2. En fibroblastos cardiacos humanos, la estimulación con sST2 induce la sobreexpresión de NRP-1, promoviendo su diferenciación a miofibroblastos y aumentando la producción de colágeno y otros marcadores profibróticos
3. Los efectos prooxidantes, proinflamatorios y profibróticos de sST2 en fibroblastos cardiacos humanos están mediados por la vía de NF- $\kappa$ B.
4. En biopsias miocárdicas de pacientes con estenosis aórtica severa, los niveles de sST2 se asocian con una reducción de MFN-1 y un aumento de marcadores de inflamación.
5. En el miocardio de modelos de rata con sobrecarga de presión, los niveles elevados de sST2 se correlacionan de forma positiva con la expresión de NRP-1.
6. Los pacientes con estenosis aórtica severa con realce tardío en RMN cardiaca presentan niveles significativamente mayores de sST2 en sangre que aquellos sin realce tardío.
7. Los niveles en sangre de sST2 se correlacionan positivamente con la masa de RT y con la masa VI en pacientes con estenosis aórtica severa.
8. Mediante la determinación de niveles de sST2 en sangre podemos identificar de una forma sencilla a los pacientes con estenosis aórtica severa con realce tardío en RMN con una alta sensibilidad y especificidad. De este modo, el sST2 puede convertirse en una útil herramienta en la práctica clínica habitual que sustituya a la RMN cardiaca para detectar fibrosis focal de reemplazo en la estenosis aórtica y nos permita identificar pacientes con un peor pronóstico, que quizá pudieran beneficiarse de una cirugía valvular precoz.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 2003;24:1231-1243.
2. Eweborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. The Tromsø study. *Heart* 2013;99:396-400.
3. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: A disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1854-1863.
4. Otto CM. Calcific aortic stenosis. Time to look more closely at the valve. *N Engl J Med* 2008;359:1395-1398.
5. Orłowska-Baranowska E, Placha G, Gaciong Z, Baranowski R, Zakrzewski D, Michalek P, Hoffman P, Rawczynska-Englert I. Influence of ACE I/D genotypes on left ventricular hypertrophy in aortic stenosis: gender-related differences. *J Heart Valve Dis* 2004;13:574-581.
6. Dal-Bianco JP, Khandheria BK, Mookadam F, Gentile F, Sengupta PP. Management of asymptomatic severe aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1279-1292.
7. Bhattacharyya S, Hayward C, Pepper J, Senior R. Risk stratification in asymptomatic severe aortic stenosis: a critical appraisal. *Eur Heart J*. 2012;33:2377-87.
8. Pellikka PA, Sarano ME, Nishimura RA, Malouf JF, Bailey KR, Scott CG, Barnes ME, Tajik AJ. Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up. *Circulation* 2005;111:3290-3295.
9. Bach DS, Siao D, Girard S, Duvernoy C, McCallister DB, Gualano SK. Evaluation of patients with severe symptomatic aortic stenosis who do not undergo aortic valve replacement: The potential role of subjectively

- overestimated operative risk. *Cir Cardiovasc Qual Outcomes* 2009;2:533-539.
10. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, Capodanno D, Conradi L, De Bonis M, De Paulis R, Delgado V, Freemantle N, Gilard M, Haugaa K, Jeppsson A, Jüni P, Pierard L, Prendergast B, Sádaba R, Tribouilloy C, Wojakowski W. 2021 ESC/EACTS Guidelines on the management of valvular heart disease. *European Heart Journal* 2022;43:561-632.
  11. Owen A, Henein MY. Challenges in the management of severe asymptomatic aortic stenosis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;40:848-50.
  12. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003;107:984-991.
  13. Zheng KH, Tzolos E, Dweck MR. Pathophysiology of aortic stenosis and future perspectives for medical therapy. *Cardiol Clin* 2020;38:1-12.
  14. Shinde AV, Frangogiannis NG. Mechanisms of fibroblast activation in the remodeling myocardium. *Curr Pathobiol Rep* 2017;5:139-148.
  15. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac fibrosis: The fibroblast awakens. *Circ Res* 2016;118:1021-1040.
  16. Aimo A, Catiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, Masi S, Emdin M, Giannoni A. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol* 2020;27:494-510.
  17. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Cardiac Fail* 2002;8:S319-S325.
  18. McLenachan JM, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis. *Am J Hypertens* 1990;3:735-740.

19. Azevedo CF, Nigri M, Higuchi ML, Pomerantzeff PM, Spina GS, Sampaio RO, Tarasoutchi F, Grinberg M, Rochitte CE. Prognostic significance of myocardial fibrosis quantification by histopathology and magnetic resonance imaging in patients with severe aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:278-287.
20. Milano AD, Faggian G, Dodonov M, Golia G, Tomezzoli A, Bortolotti U, Mazzucco A. Prognostic value of myocardial fibrosis in patients with severe aortic valve stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144:830-837.
21. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke C, Lima JAC. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:891-903.
22. Debl K, Djavidani B, Buchner S, Lipke C, Nitz W, Feuerbach S, Riegger G, Luchner A. Delayed hyperenhancement in magnetic resonance imaging of left ventricular hypertrophy caused by aortic stenosis and hypertrophic cardiomyopathy: visualization of focal fibrosis. *Heart* 2006;92:1447-1451.
23. Dweck M R, Joshi S, Murigu T, Alpendurada F, Jabbour A, Melina G, Banya W, Gulati A, Roussin I, Raza S, Prasad N A, Wage R, Quarto C, Angeloni E, Refice S, Sheppard M, Cook S A, Kilner P J, Pennell D J, Newby D E, Mohiaddin R H, Pepper J, Prasad S K. Midwall fibrosis is an independent predictor of mortality in patients with aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:1271-1279.
24. Nigri M, Azevedo CF, Rochitte CE, Schraibman V, Tarasoutchi F, Pommerantzeff PM, Bradao CM, Sampaio RO, Parga JR, Ávila LF, Spina GS, Grinberg M. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging identifies focal regions of intramyocardial fibrosis in patients with severe aortic valve disease: Correlation with quantitative histopathology. *Am Heart J* 2009;157:361-368
25. Weidemann F, Herrmann S, Störk S, Niemann M, Frantz S, Lange V, Beer M, Gattenlöhner S, Voelker W, Ertl G, Strotmann J M. Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis. *Circulation* 2009;120:577-584.

26. Chin CWL, Everett RJ, Kwiecinski J, Vesey AT, Yeung E, Esson G, Jenkins W, Koo M, Mirsadraee S, White AC, Japp AG, Prasad SK, Semple S, Newby DE, Dweck MR. Myocardial fibrosis and cardiac decompensation in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol Img* 2017;10:1320-1333.
27. Barone-Rochette G, Piérard S, De Meester de Ravenstein C, Seldrum S, Melchior J, Maes F, Pouleur AC, Vancraeynest D, Pasquet A, Vanoverschelde JL, Gerber BL. Prognostic significance of LGE by CMR in aortic stenosis patients undergoing valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:144-154.
28. Everett R, Tastet L, Clavel M, Chin C, Capoulade R, Vassiliou V, Kwiecinski J, Gomez M, van Beek E, White A, Prasad S, Larose E, Tuck C, Semple S, Newby D, Pibarot P, Dweck M. Progression of hypertrophy and myocardial fibrosis in aortic stenosis: a multicenter cardiac magnetic resonance study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2018;11(6):e007451.
29. Musa T, Treibel T, Vassiliou V, Captur G, Singh A, Chin C, Dobson L, Pica S, Loudon M, Malley T, Rigolli M, Foley J, Bijsterveld P, Law G, Dweck M, Myerson S, McCann G, Prasad S, Moon J, Greenwood J. Myocardial scar and mortality in severe aortic stenosis. *Circulation* 2018;138:1935-1947
30. Dweck M. Early valve replacement guided by biomarkers of LV decompensation in asymptomatic patients with severe AS (EVoLVeD). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03094143>. Accessed May 2, 2018.
31. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol*. 2015 Apr 2;115(7 Suppl):3B-7B.
32. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD, Rouleau JL, Lee RT. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:2961-2966.

33. Ho JE, Chen WY, Chen MH, Larson MG, McCabe EL, Cheng S, Ghorbani A, Coglianese E, Emilsson V, Johnson AD, Walter S, Franceschini N, O'Donnell CJ, Dehghan A, Lu C, Levy D, Newton-Cheh C, Lin H, Felix JF, Schreiter ER, Vasani RS, Januzzi JL, Lee RT, Wang TJ, Assimes TL, Deloukas P, Erdmann J, Holm H, Kathiresan S, Köng IR, McPherson R, Reilly MP, Roberts R, Samani NJ, Schunkert H, Stewart AFR. Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling. *J Clin Invest* 2013;123:4208-4218.
34. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:827-840.
35. 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. *J Clin Invest* 2007;117:1538-1549.
36. Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A, Poelz W, Pacher R, Haltmayer M. Increased plasma concentrations of soluble ST2 are predictive for 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure. *Clin Chem* 2008;S4:752e756.
37. Ky B, French B, McCloskey K, Rame JE, McIntosh E, Shahi P, Dries DL, Tang WH, Wu AH, Fang JC, Boxer R, Sweitzer NK, Levy WC, Goldberg LR, Jessup M, Cappola TP. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011;4:180e187.
38. Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM, Lee RT. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:2186e2190.
39. Sawada H, Naito Y, Hirotani S, Akahori H, Iwasaku T, Okuhara Y, Miki K, Eguchi A, Mitsuno M, Miyamoto Y, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Expression of interleukin-33 and ST2 in nonrheumatic aortic valve stenosis. *Int J Cardiol* 2013;168:529-630

40. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F, Muller O, Casselman F, De Wiest B, Croes R, Verstreken S, Goethals M, de Raedt H, Sarma J, Joseph L, Vanderheyden M, Weinberg E. Non-myocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(25):2166-2174.
41. Lancellotti P, Dulghour R, Magne J, Henri C, Servais L, Bouznad N, Ancion A, Martinez C, Davin L, Le Goff C, Nchimi A, Piérard L, Oury C. Elevated plasma soluble ST2 is associated with heart failure symptoms and outcome in aortic stenosis. *PLoS ONE* 2015;10:e0138940.
42. Stundl A, Lünstedt N, Courtz F, Freitag-Wolf S, Frey N, Holdenrieder S, Zur B, Grube E, Nickenig G, Werner N, Frank D, Sinning J. Soluble ST2 for risk stratification and the prediction of mortality in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Am J Cardiol* 2017;120:986-993.
43. Schmid J, Stojakovid T, Zweiker D, Scharnagl H, Maderthaner R, Scherr D, Maier R, Schmidt A, März W, Binder J, Rainer P. ST2 predicts survival in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Int J Cardiol* 2017;244:87-92.
44. Zhang HF, Xie SL, Chen YX, Mai JT, Wang JF, Zhu WL, Zhu LG. Altered serum levels of IL-33 in patients with advanced systolic chronic heart failure: correlation with oxidative stress. *J Transl Med* 2012;10:120.
45. Vásquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, Parra V, Hill JA, Rothermel Lavandero S. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol* 2016;594:509-525.
46. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 2010;141:280-289.
47. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 2005;14:283-289.

48. Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:79-99.
49. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005;280:26185-26192.
50. Zanna G, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino ML, Rugolo M, Carelli V. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 2008;131:352-367.
51. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, Connel KAO, Ribeiro Jr RF, Stanley WC, Walsh K. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Circ Physiol* 2012;302:167-179.
52. Joshi SR, Dhagia V, Gairhe S, Edwards JG, McMurtry IF, Gupte SA. MicroRNA-140 is elevated and mitofusin-1 is downregulated in the right ventricle of the Sugen5416/hyoixua/normoxia model of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016;311:H689-H698.
53. Li J, Li Y, Jiao J, Wang J, Li Y, Qin D, Peifeng L. Mitofusin 1 is negatively regulated by microRNA 140 in cardiomyocyte apoptosis. *Mol Cell Biol* 2014;34:1788-1799.
54. Sugamura K, Keaney Jr JF. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2011;51:978-992.
55. Hirotani S, Otsu K, Nishida K, Higuchi Y, Morita T, Nakayama H, Yamaguchi O, Mano T, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, Hori M. Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 2002;105:509-515.

56. Chen W, Lin A, Yu Y, Zhang L, Yang G, Hu H, Luo Y. Serum soluble ST2 as a novel inflammatory marker in acute ischemic stroke. *Clin Lab* 2018;64:1349-1356.
57. Nagata A, Takezako N, Tamemoto H, Ohto-Ozaki H, Ohta S, Tominaga SL, Yanagisawa K. Soluble ST2 protein inhibits LPS stimulation on monocyte-derived dendritic cells. *Cell Mol Immunol* 2012;9:399-409.
58. Matilla L, Arrieta V, Jover E, García-Peña A, Martínez-Martínez E, Sadaba R, Alvarez V, Navarro A, Fernández-Celis A, Gainza A, Santamaria E, Fernández Irigoyen J, Rossignol P, Zannad F, Lopez-Andres N. Soluble ST2 induces cardiac fibroblast activation and collagen synthesis via Neuropilin-1. *Cells* 2020;9:1667.
59. Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 2011;32:613-621.
60. Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* 2008;411:211-226.
61. Ding Z, Du W, Lei Z, Zhang Y, Zhu J, Zeng Y, Wang S, Zheng Y, Liu Z, Huang JA. Neuropilin 1 modulates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2020;56:531-543.
62. Cao S, Yaqoob U, Das A, Shergill U, Jagavelu K, Huebert RC, Routray C, Abdelmoneim S, Vasdev M, Leof E, Charlton M, Watts RJ, Mukhopadhyay D, Shah VH. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF- $\beta$  signaling in hepatic stellate cells. *J Clin Investig* 2010;120:2379-2394.
63. Matkar PN, Singh KK, Rudenko D, Kim YJ, Kuliszewski MA, Prud'homme GJ, Hedley DW, Leong-Poi H. Novel regulatory role of neuropilin-1 in endothelial-to-mesenchymal transition and fibrosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016;7:69489-69506.



64. Ma ZG, Yuan YP, Wu HM, Zhang X, Tang QZ. Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci* 2018;14:1645-1657.
65. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71:549-574.
66. Thakur S, Li L, Gupta S. NF- $\kappa$ B mediated integrin-linked kinase regulation in angiotensin II-induced profibrotic process in cardiac fibroblasts. *Life Sci* 2014;107:68-75.
67. Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:307-314.
68. Takezako N, Hayakawa M, Hayakawa H, Aoki S, Yanagisawa K, Endo H, Tominaga SI. ST2 suppresses IL-6 production via the inhibition of I $\kappa$ B degradation induced by the LPS signal in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:425-432.
69. Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation* 1999;100:999-1008.
70. Bayes-Genis A; De Antonio M; Vila J; Peñafiel J; Galán A; Barallat J; Zamora E; Urrutia A; Lupón J. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:158-166.
71. Quick S, Waessnig NK, Kandler N, Poitz DM, Schoen S, Ibrahim K, Strassner RH, Speiser U. Soluble ST2 and myocardial fibrosis in 3T cardiac magnetic resonance. *Scand Cardiovasc J* 2005;49:361-366.
72. Gawor M, Spiewak M, Kubik A, Wróbel A, Lutynska A, Marczak M, Grzybowski J. Circulating biomarkers of hypertrophy and fibrosis in patients with

- hypertrophic cardiomyopathy assessed by cardiac magnetic resonance. *Biomarkers* 2018;23:676-682.
73. Akdis D, Chen L, Saguner AM, Zhang N, Gawinecka J, Saleh L, von Eckardstein A, Ren J, Matter CM, Hu Z, Chen X, Tanner FC, Manka R, Chen K, Brunckhorst C, Song J, Duru F. Novel plasma biomarkers predicting biventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am Heart J* 2022;244:66-76.
74. Bayes-Genis A, Pascual-Figal D, Januzzi JL, Maisel A, Casas T, Chávarri MV, Ordoñez-Llanos J. La monitorización de ST2 soluble proporciona una estratificación del riesgo adicional en pacientes ambulatorios con insuficiencia cardiaca descompensada. *Rev Esp Cardiol* 2010;63:1171-1178.
75. Greenberg HZE, Zhao G, Shah AM, Zhang M. Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 2022;118:1433-1451.
76. Shah AK, Bhullar SK, Elimban V, Dhalla NS. Oxidative stress as a mechanism for functional alterations in cardiac hypertrophy and heart failure. *Antioxidants* 2021;10:931