

Caracterización de la dinámica de ST2 en el infarto agudo de miocardio: estudio en modelo clínico y experimental

Trabajo Final de Máster

Máster en Biotecnología Biomédica (2017-2019)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (Valencia)



Alumno: Ángel Salas Martí

Correo electrónico: ansamar3@etsiamn.upv.es

Empresa: Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

Tutor de empresa: Vicente Bodí Peris

Tutor académico: José Gadea Vacas

Fecha inicio: 07/01/2019

Fecha fin: 05/07/2019

Índice

1. Resumen	3
2. <i>Summary</i>	5
3. Introducción	7
3.1. El infarto agudo de miocardio y su fisiopatología	8
3.2. El receptor ST2	13
3.2.1. Estructura de las isoformas ST2 _S y ST2 _L	13
3.2.2. Patrón de expresión de ST2 _L y su ligando, la IL-33	14
3.2.3. Vía de señalización IL-33/ST2 _L	15
3.2.4. Patrón de expresión de ST2 _S	17
3.2.5. Implicación del receptor ST2 en cardiología	17
4. Objetivos	21
5. Material y métodos	22
5.1. Modelo clínico	22
5.1.1. Recogida de muestras clínicas	23
5.1.2. Determinación de la dinámica de ST2 _S en el modelo clínico	24
5.1.3. Seguimiento de los pacientes	24
5.2. Modelo experimental porcino	24
5.2.1. Procesamiento de muestras biológicas	25
5.2.2. Determinación de la dinámica de ST2 _S en el modelo experimental porcino	26
5.2.3. Determinación de la dinámica de ST2 _L en tejido cardíaco	26
5.2.4. Caracterización de los productores de ST2 _L en tejido cardíaco	28
5.3. Análisis estadístico	31
6. Resultados	32

6.1.	Modelo clínico.....	32
6.1.1.	Dinámica de ST2 _S en suero del modelo clínico	32
6.1.2.	Relación entre la concentración de ST2 _S y el desarrollo de insuficiencia cardiaca	33
6.2.	Modelo experimental porcino	34
6.2.1.	Dinámica de ST2 _S en suero del modelo experimental porcino.....	34
6.2.2.	Dinámica de ST2 _L en tejido cardiaco.....	35
6.2.3.	Caracterización de los productores de ST2 _L	38
7.	Discusión.....	46
7.1.	Implicación de ST2 en pacientes con IAMEST	48
7.1.1.	Dinámica de ST2 _S en el suero del modelo clínico.....	48
7.1.2.	Relación de ST2 _S con el desarrollo de IC.....	49
7.2.	Implicación de ST2 en el modelo porcino	50
7.2.1.	Dinámica de ST2 _S en el suero porcino	50
7.2.2.	Dinámica de ST2 _L en el tejido cardiaco del modelo porcino.....	51
7.2.3.	Caracterización de los tipos celulares.....	54
8.	Conclusión.....	59
9.	Perspectivas futuras.....	60
10.	Bibliografía	61
11.	Anexo I	68
11.1.	Protocolo técnica inmunohistoquímica	68
11.2.	Protocolo técnica de inmunofluorescencia.....	69

1. Resumen

Interleukin 1 receptor-like 1 (IL1RL-1), comúnmente conocido como ST2, es un miembro de la familia de receptores de la IL-1 que podemos encontrar en dos isoformas principales, una isoforma transmembrana (ST2_L), responsable de la cascada de señalización que media este receptor a través de la unión con su único ligando conocido, la IL-33, y una soluble en el espacio extracelular (ST2_S), la cual actúa como receptor competitivo impidiendo la actividad de la ruta.

Este receptor tiene una gran implicación tanto en los procesos de respuesta inflamatoria, así como en la regulación de ciertas poblaciones celulares del sistema inmune. Es por ello por lo que se ha investigado su papel en enfermedades como el asma, algunos tipos de esclerosis y enfermedades fibróticas entre otras. En el campo de la cardiología, el factor ST2 supone un biomarcador sólido para la estratificación de pacientes con insuficiencia cardíaca (IC), no obstante, su papel en el contexto del infarto agudo de miocardio (IAM) ha sido poco explorado. Dentro de este campo concreto nuestro grupo realizó un estudio en pacientes con IAM con elevación del segmento ST (IAMEST), donde se observó que mayores niveles de la isoforma soluble ST2_S en estos pacientes se correlacionaban con una peor función cardíaca (fracción de eyección deprimida) al 6º mes tras la reperfusión coronaria, sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos subyacentes.

Dado que hoy en día aún no disponemos de información suficiente sobre su papel en el IAM, en el presente trabajo continuamos explorando su implicación tanto en pacientes con IAMEST como en un modelo porcino de IAM reperfundido. En los pacientes se estudió (1) la dinámica de la isoforma ST2_S en suero y (2) su asociación con la aparición de IC. En el modelo porcino se evaluó (3) la dinámica de la isoforma ST2_S en el suero de muestras de sangre seriadas, (4) la dinámica de la isoforma ST2_L en el tejido cardíaco infartado, además de (5) caracterizar que poblaciones celulares expresan ST2_L y en qué medida lo hacen.

En el modelo clínico, constituido por los pacientes con IAMEST, se observó que la concentración de ST2_S en el suero aumentaba drásticamente tras la reperfusión,

alcanzando su valor máximo entre las 24h y las 96h (4 días) y que los niveles elevados de este se correlacionaban positivamente con la aparición de IC a largo plazo. En el modelo porcino se observó que la isoforma ST2_L aumenta progresivamente su concentración alcanzando su valor máximo aproximadamente a la semana tras la reperfusión y manteniendo estos niveles hasta el primer mes tras esta. En el tejido con una semana tras la reperfusión, se observó que los linfocitos T y las células endoteliales suponían aproximadamente un 44% del total de células que se encuentran activamente produciendo ST2_L, mientras que, al mes tras esta, los principales tipos celulares implicados en la expresión de esta isoforma son las células endoteliales y miofibroblastos, alcanzando hasta un 75%.

Con todo ello podemos concluir que la isoforma ST2_S se asocia con una mayor probabilidad de aparición de IC en pacientes con IAMEST y que el receptor ST2 parece tener un papel protagonista en el cambio que se da tras un proceso isquémico, de un ambiente inflamatorio debido al estrés y la falta de oxígeno y nutrientes al que se ve sometido el miocardio, donde destaca la presencia de la isoforma soluble ST2_S como posible conductora del proceso, a uno paliativo de la inflamación y de reparación de tejidos dañados en etapas más tardías, donde toma un papel protagonista la isoforma ST2_L, cuyo principal aporte se obtiene a partir de células endoteliales y miofibroblastos conjuntamente.

Dada la importancia de este biomarcador en la fisiopatología y el pronóstico que ofrece en los pacientes con IAMEST, se hace evidente la necesidad de dilucidar su papel, ya que, conocer la dinámica y la regulación de este receptor, puede suponer una nueva ventana hacia un gran número de posibles dianas terapéuticas que permitan un mejor tratamiento de los pacientes, así como una mejora en su calidad de vida. Además, teniendo en cuenta su importancia en multitud de patologías de carácter inflamatorio, estos resultados se pueden extender a otras áreas en las que estos procesos suponen un reto hoy en día.

Palabras clave: ST2, Infarto, miocardio, necrosis, sistema inmune, biomarcador, fibrosis, cardioprotector.

2. Summary

Interleukin 1 receptor-like 1 (IL1RL-1), commonly known as ST2_s, is a member of the IL-1 receptor family that can be found in two main isoforms, a transmembrane isoform (ST2_L), responsible for the cascade of signaling that mediates this receptor through the union with its only known ligand, IL-33, and a soluble in the extracellular space (ST2_S), which acts as a competitive receptor impeding the activity of the route.

This receptor has a great implication both in the processes of inflammatory response, as well as in the regulation of certain cellular populations of the immune system. That is why it has been investigated its role in diseases such as asthma, some types of sclerosis and fibrotic diseases among others. In the field of cardiology, the ST2 factor is a solid biomarker for the stratification of patients with heart failure, however, its role in the context of acute myocardial infarction (AMI) has been little explored. In a previous study of our group in patients with AMI with ST-segment elevation (STEMI), it was observed that higher levels of the soluble isoform ST2_s in these patients correlated with worse cardiac function (depressed ejection fraction) at the 6th month after coronary reperfusion.

Given that today we still don't have enough information about its role in AMI, in the present work we continue exploring its involvement both in patients with STEMI and in a porcine model of reperfused AMI. In patients, the dynamics of the ST2_s isoform in serum were studied (1) and (2) its association with the onset of heart failure (HF). In the porcine model, the dynamics of the ST2_s isoform in the serum of serial blood samples were evaluated (3), the dynamics of the ST2_L isoform in the infarcted tissue, as well as (5) characterizing the cell populations expressing ST2_L and to what extent they do it.

In the clinical model, constituted by patients with STEMI, we observed that the concentration of ST2_s in the serum increased drastically after reperfusion, reaching its maximum value between 24h and 96h (4 days) and that the high levels of this correlated positively with the long term appearance of HF. In the porcine model we observed that the ST2_L isoform progressively increases its concentration reaching its maximum value

approximately a week after reperfusion and maintaining these levels until the first month after this. In the tissue with 1 week after reperfusion, we observed that T lymphocytes and endothelial cells account for approximately 44% of the total number of cells that are actively producing ST2_L, however, one month after this, the main cell types involved in the expression of this isoform are endothelial cells and myofibroblasts, reaching up to 75%.

With all this we can conclude that the ST2_S isoform is associated with a higher probability of HF development in patients with STEMI and that the ST2 receptor seems to have a leading role in the change of an ischemic process, an inflammatory environment due to stress and the lack of oxygen and nutrients that have been seen in the myocardium, where the presence of the soluble isoform ST2_S is highlighted as a possible driver of the process, to one palliative of inflammation and tissue repairing environment in the later stages, where the ST2_S isoform takes a leading, whose main contribution is obtained from endothelial cells and myofibroblasts.

Given the importance of this biomarker in the pathophysiology and prognosis that offers in patients with STEMI, the need to clarify its role becomes evident, since knowing the dynamics and regulation of this receptor can mean a new window to a large number of possible therapeutic targets that will allow us a better treatment of patients, as well as an improvement in their quality of life. In addition, taking into account its importance in many pathologies of an inflammatory nature, these results can be extended to other areas in which these processes are a challenge today.

Key words: Infarction, myocardium, necrosis, immune system, ST2, biomarker, fibrosis, cardioprotective.

3. Introducción

El contexto en el que se enmarca el presente trabajo es el de las cardiopatías isquémicas, cuyo estudio e investigación son de vital importancia, ya que constituyen una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (Figura 1), según recogen los datos publicados por la OMS en 2016.

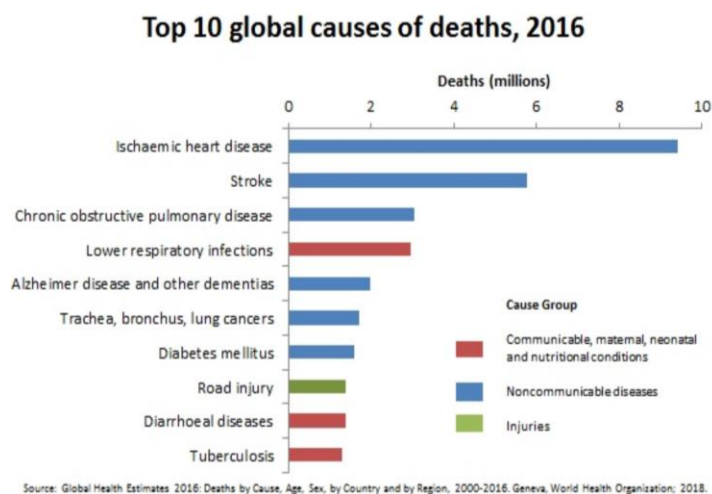


Figura 1. Principales causas de mortalidad mundial en el año 2016¹.

Dentro de este campo y de los considerados síndromes coronarios agudos encontramos el infarto agudo de miocardio (IAM), un evento con una alta mortalidad y morbilidad en la población^{2,3}. Pese a que en los últimos años ha habido un gran avance en cuanto a la estratificación de los factores de riesgo, las técnicas de reperfusión o de los agentes anticoagulantes y antiplaquetarios entre otros, su prevalencia continúa siendo un reto hoy en día. Es por ello por lo que el estudio de los procesos que tienen lugar durante y tras el IAM, así como las moléculas que los llevan a cabo, nos ofrecen una oportunidad de conocer nuevas dianas y biomarcadores que permitan una prevención, tratamiento y seguimiento de los pacientes eficaz.

3.1. El infarto agudo de miocardio y su fisiopatología

El IAM es un evento cardiovascular que ocurre tras un proceso de bloqueo de las arterias coronarias (Figura 2A) que irrigan el músculo cardíaco, ocasionando procesos de necrosis de cardiomiocitos, las células musculares cardíacas. En nuestro caso, se trabaja con un tipo de IAM conocido como tipo 1, que generalmente tiene lugar por la erosión o rotura del endotelio vascular, favoreciendo la liberación de placas ateroscleróticas que ocluyen totalmente la arteria (Figura 2B). Este tipo de infarto se identifica gracias a la realización de un electrocardiograma (ECG), una técnica que registra la actividad eléctrica cardíaca que se produce en cada latido, en el que se observa un patrón anormal con la elevación del segmento ST (Figura 2C), además de la presencia de ciertos biomarcadores como la troponina ultrasensible^{3,4}.

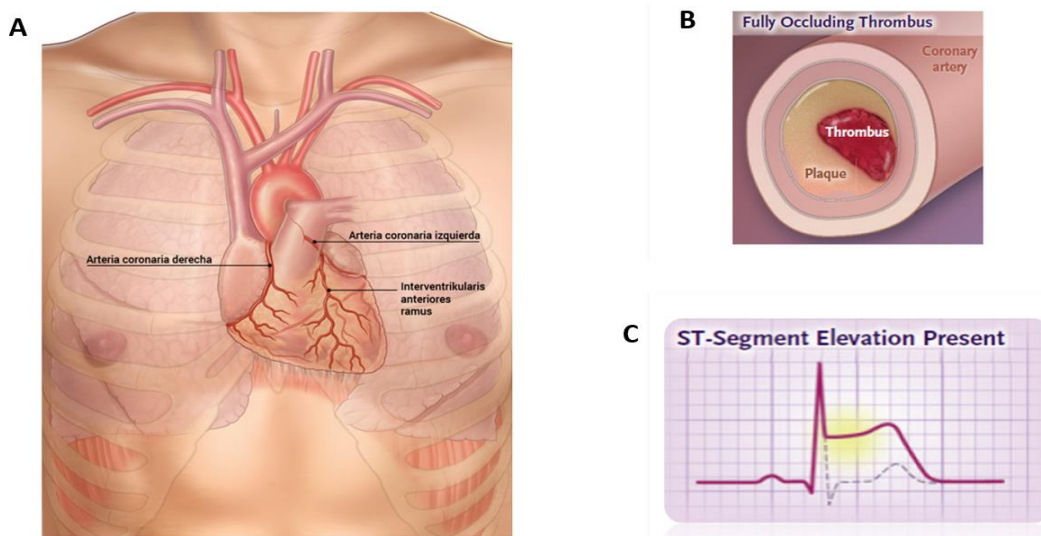


Figura 2. (A) Representación gráfica cardíaca donde se señala la posición de las arterias coronarias izquierda y derecha que irrigan el miocardio⁵. (B) Ilustración de la fisiopatología del infarto agudo de miocardio (IAM) tipo 1, con oclusión completa de la arteria coronaria a causa de una placa aterosclerótica⁴. (C) Electrocardiograma (ECG) asociado a un IAM con elevación del segmento ST (IAM-EST), donde la línea discontinua marca el trazado de un ECG normal⁴.

El paso inmediato tras un evento de esta índole consiste en la reperfusión temprana de la arteria ocluida mediante angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), que consiste en la inserción a través de la arteria femoral de un catéter de balón que permite recuperar el flujo sanguíneo y generalmente la disposición de una malla metálica o *stent*, que mantendrá abierta la arteria comprometida. Con ello se recupera el flujo sanguíneo, sin embargo, ciertos factores como el área de riesgo sometida a isquemia o el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la intervención entre otros (Figura 3), serán claves para un mejor pronóstico del paciente^{3,6}.

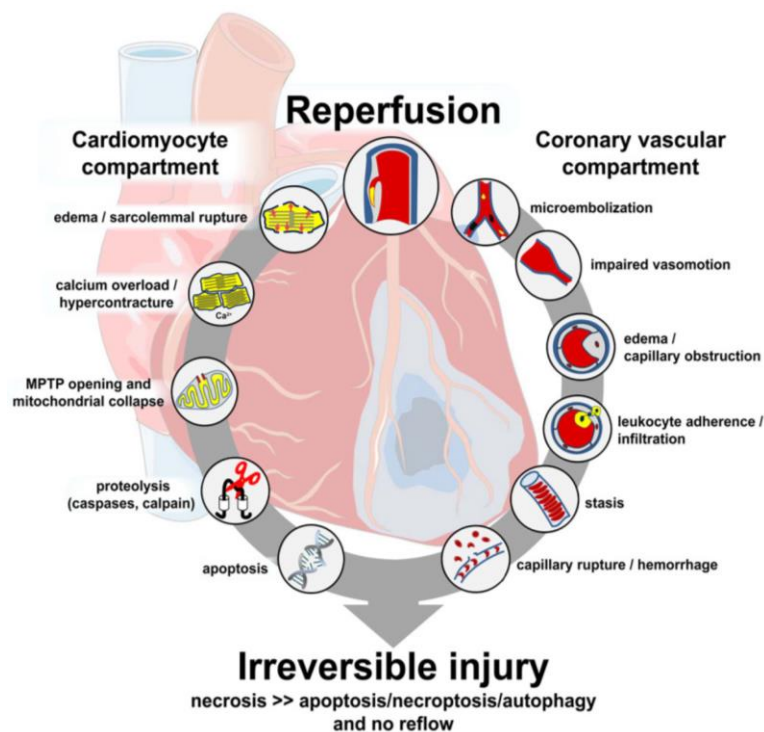


Figura 3. Diagrama de algunos de los factores que contribuyen a daños irreversibles tras un IAM⁶. MPTP: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

Incluso tras la reperfusión temprana de la arteria ocluida, el estrés y la falta de oxígeno y nutrientes al que es sometido el miocardio provoca la necrosis de cardiomiocitos, lo que lleva a la activación de la inmunidad innata a través de la vía del complemento al reconocer patrones moleculares asociados a daño (PMADs) y con ello, la amplificación por

diferentes vías de una respuesta inflamatoria mediada por la liberación de diferentes citoquinas y la activación completa del sistema inmune tanto innato como adaptativo. Esta fase, a la cual nos referiremos como **fase aguda**, tiene una duración aproximada de 3 a 10 días como bien se ilustra en la Figura 4 y concluirá con la degradación de las células necróticas, parte de la matriz extracelular, la infiltración al tejido dañado de neutrófilos, monocitos y linfocitos T entre otros y la diferenciación de estos linfocitos T a *T helper 1* (Th1) y de los monocitos a macrófagos M1, ambos de carácter proinflamatorio⁷⁻¹⁰.

Tras esta fase aguda se disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias y se genera un ambiente que favorece la diferenciación de los macrófagos al fenotipo M2, de carácter anti-inflamatorio y profibrótico, de los linfocitos Th1 a Th2, destinados a la reparación del tejido y de los cuales se ha observado que poseen un efecto anti-aterosclerótico y de linfocitos T a linfocitos T reguladores (Treg), necesarios para la resolución de la inflamación, entre otros muchos cambios¹¹⁻¹³. Esta es una etapa de reparación y regeneración del tejido cardíaco a la que nos referiremos como **fase crónica**, la cual se extiende desde aproximadamente la primera semana tras la reperfusión hasta al menos un mes tras esta. En esta fase la matriz fagocitada es sustituida por fibras de colágeno formando la cicatriz fibrótica y se induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos con capacidad contráctil, con el fin de recuperar la funcionalidad del área afectada⁸.

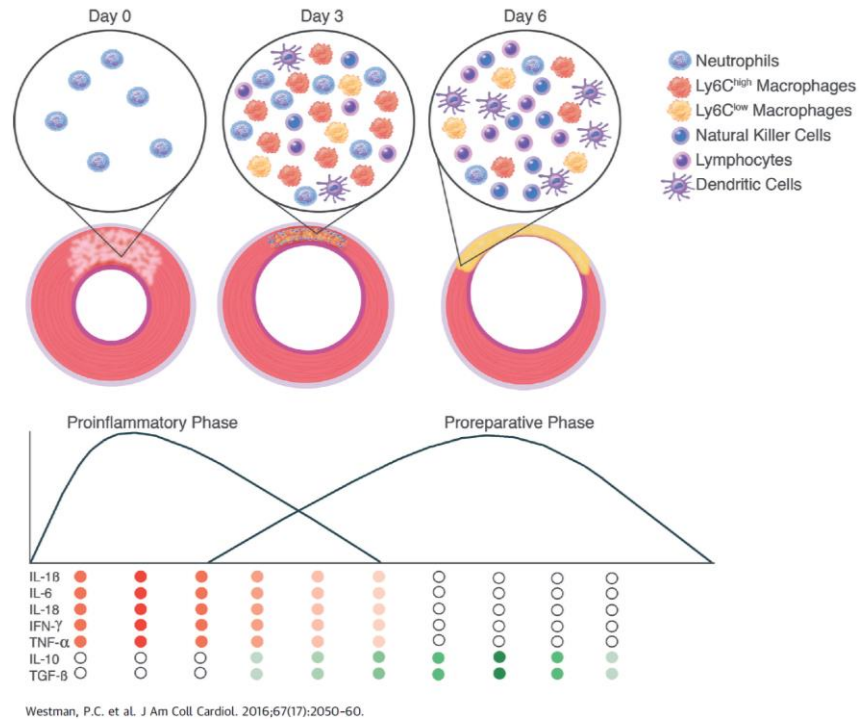


Figura 4. Diagrama de los diferentes tipos celulares del sistema inmune, citoquinas e interleucinas implicados en el desarrollo de la fase aguda⁷.

Aun con ello, comúnmente en los pacientes IAMEST, el estrés al que es sometido el ventrículo izquierdo por el sobre esfuerzo derivado de mantener una fracción de eyección (FE) apropiada, que es una medida del volumen de sangre capaz de bombear el corazón en cada contracción, provoca que su pared se dilate como mecanismo de compensación (hipertrofia compensatoria), lo cual palia temporalmente el déficit en la demanda sanguínea pero acaba provocando un remodelado ventricular (RV) (Figura 5), proceso en el que se consolida esta dilatación de la pared ventricular con la disminución de su grosor, el cual aumenta en gran medida las probabilidades de sufrir una IC a largo plazo, una de las principales causas de muerte en este tipo de pacientes^{7,12,14}.

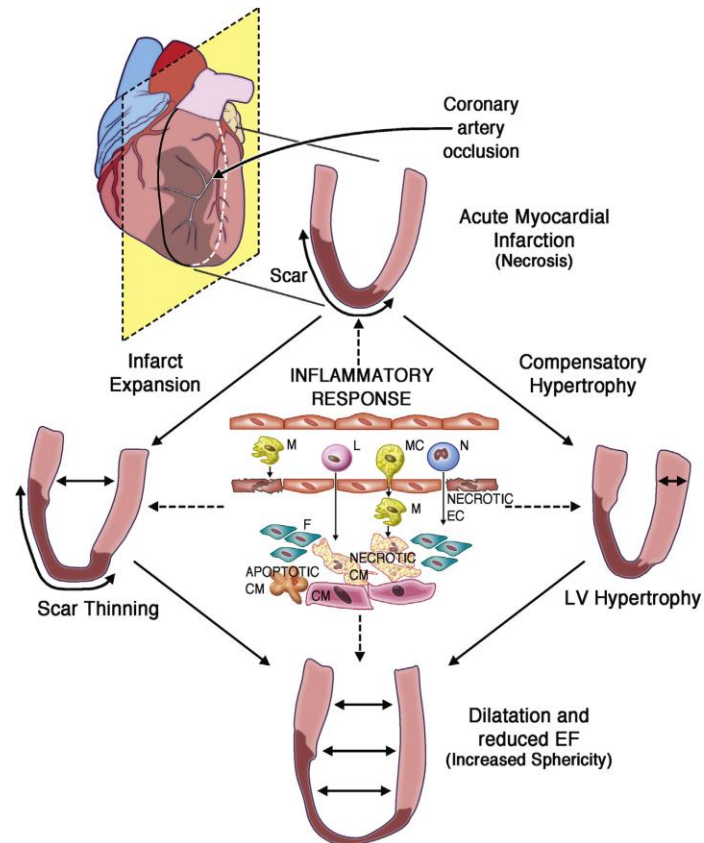


Figura 5. Representación esquemática de la fisiopatología del remodelado ventricular (RV) tras el infarto agudo de miocardio (IAM). Con la oclusión de las arterias coronarias se dan los procesos de necrosis de cardiomiocitos que dan lugar a la formación de la cicatriz fibrótica que se aprecia en color más oscuro. Tras esto tienen lugar los procesos de hipertrofia compensatoria (derecha) y el adelgazamiento de la cicatriz (izquierda), que constituyen el remodelado ventricular y que desencadenan en la disminución de la fracción de eyección (FE). El conductor principal de todo este proceso lo constituye la respuesta inflamatoria (centro). M: Macrófagos; L: Linfocitos; MC: Cardiomiocitos; N: neutrófilos; EC: Células endoteliales; F: fibroblastos¹².

Como podemos observar, la regulación del proceso inflamatorio tras el IAM es crucial para el pronóstico de los pacientes, por ello el estudio de los procesos que tienen lugar, así como las moléculas responsables de estos son de vital importancia. Dada la conocida implicación del receptor ST2 en estos procesos inflamatorios, actualmente los esfuerzos de investigación se están centrando en este receptor, y por lo que parece, los resultados

son muy prometedores. Teniendo en cuenta esto, conocer su dinámica de expresión, las interacciones con otras proteínas y la regulación que ejerce, entre otros puntos clave, puede suponer la obtención de una nueva diana terapéutica con la que tratar inmediatamente a los pacientes que han sufrido un IAM y reducir los eventos adversos a largo plazo que se observan tras este.

3.2. El receptor ST2

Son cada vez más los artículos que ponen de manifiesto la importancia de las vías de señalización inflamatorias en este tipo de patologías, como conductoras del proceso hacia una mejor o peor evolución de los pacientes. En concreto en el ámbito del IAM se dirige la atención hacia el receptor ST2 quien constituye, como veremos a continuación, un biomarcador clave en el pronóstico de los pacientes y una posible diana terapéutica que consiga reducir en gran medida los efectos adversos de estos eventos cardiovasculares^{7,8,15}.

3.2.1. Estructura de las isoformas ST2_S y ST2_L

Interleukin 1 receptor-like 1 (IL1RL-1), comúnmente conocido como ST2 es un miembro de la familia de receptores de la IL-1, más conocido como ST2. Este puede encontrarse en dos isoformas, bien con una localización transmembrana (ST2_L) o bien, gracias al procesamiento alternativo del ARNm que lo codifica, soluble en el espacio extracelular (ST2_S) (Figura 6). La estructura de ST2_L consta de un dominio extracelular con capacidad para reconocer su ligando (común en ambas isoformas), un segmento transmembrana y un dominio intracelular que se asocia a IL-1RAcP, una proteína accesoria que aumenta la afinidad del receptor extracelular por su ligando y media la cascada de señalización¹⁶⁻¹⁹.

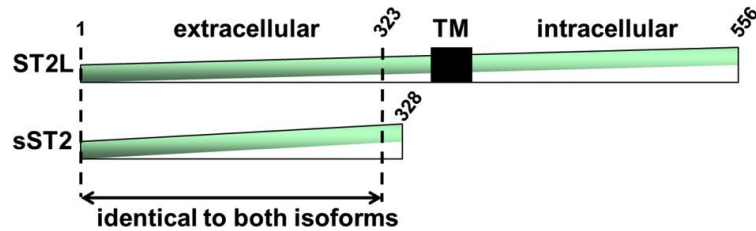


Figura 6. Gen codificante del receptor ST2, en el que se muestran los diferentes dominios que dan lugar a sus dos isoformas ST2_L y ST2_s, por el procesamiento alternativo del ARNm que lo codifica. TM: segmento transmembrana¹⁶.

3.2.2. Patrón de expresión de ST2_L y su ligando, la IL-33

En cuanto al patrón de expresión de este receptor encontramos que los fibroblastos y cardiomiocitos son capaces de expresar ST2_L en modestas concentraciones bajo estímulos como el estrés, mientras que las células endoteliales parecen ser las principales productoras dentro del conjunto de células no hematopoyéticas^{11,16,17,20}. La expresión de este recibe un mayor protagonismo entre las diferentes líneas celulares que conforman el sistema inmunitario, destacando la expresión de carácter constitutivo que podemos encontrar en mastocitos²¹⁻²⁴, linfocitos Th2²⁵⁻²⁷, linfocitos Treg^{28,29}, linfocitos B³⁰ y Natural Killer (NK)^{31,32}. Los eosinófilos³³, células dendríticas^{34,35}, neutrófilos^{36,37} y macrófagos^{31,35} presentarían también una expresión de ST2_L constitutiva, sin embargo, esta se daría a concentraciones bajas pudiendo ser fuertemente inducidas por estímulos como la IL-33 o IL-4 entre otros compuestos.

El único ligando conocido del receptor ST2 es la IL-33, una interleucina secretada principalmente como señal de estrés o daño, tanto es así que se ha reconocido su posible papel como alarmina, pudiendo ser una de las moléculas que actuaría en sinergia junto con la activación del mencionado sistema del complemento al inicio de la fase inflamatoria^{16,17,38}. La expresión de esta interleucina está restringida a ciertos tipos celulares, donde se expresaría de manera constitutiva y permanecería en el citoplasma hasta ser liberada por procesos como la necrosis. La IL-33 es expresada en bajas concentraciones por células inmunitarias como células dendríticas activadas, linfocitos

Th2, eosinófilos y mastocitos entre otros^{17,36,39}, sin embargo, el principal aporte de esta interleucina es proporcionado por células de origen no hematopoyético como fibroblastos o células endoteliales, capaces de inducir su producción ante estímulos proinflamatorios como el TNF- α o la IL-1 β ^{16,40-43}.

3.2.3. Vía de señalización IL-33/ST2_L

La interacción de ST2_L con la IL-33 resulta, a través de una compleja cascada de señalización que implica el reclutamiento de MyD88, IRAK1, IRAK4 y TRAF6, en la activación factor de transcripción nuclear NF- κ B (Figura 7), permitiendo la actividad de la vía MyD88/NF- κ B además de la activación de las proteínas MAP quinastas p38, JNK y ERK. En conjunto llevarán a cabo, mediante la secreción de citoquinas Th2-relacionadas como la IL-5, IL-4 e IL-13, un efecto anti-inflamatorio, antiapoptótico y de reparación de los tejidos dañados^{11,16,17,19,20,36,39,40,42,44,45}.

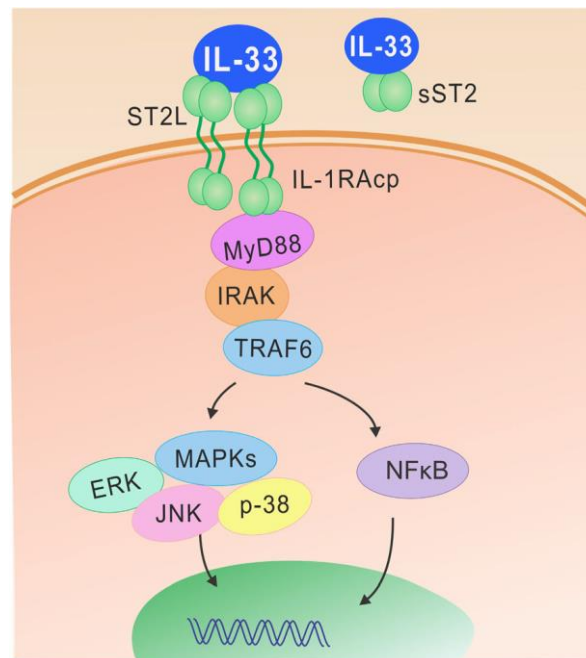


Figura 7. Cascada de señalización de la vía IL-33/ST2_L⁴⁶.

Es por esta actividad de la vía por la que se le atribuye un papel importante en el proceso inflamatorio que se desarrolla frente a estímulos de estrés o daño celular, ya que además efectos comentados anteriormente, induce la mencionada diferenciación de los linfocitos y macrófagos hacia el fenotipo Th2 y M2 respectivamente, regula la actividad de otros tipos celulares como mastocitos, eosinófilos, basófilos o los Linfocitos Treg, algunos de ellos con una gran implicación en diferentes patologías como el asma, la dermatitis atópica, la enfermedad inflamatoria intestinal o la fibrosis pulmonar entre otras⁴⁷⁻⁵³ y es capaz en ciertos tipos celulares como las células endoteliales, de inducir la síntesis de moléculas de adhesión como las selectinas y las ICAM-1 para favorecer la migración de leucocitos al tejido dañado, entre otros procesos^{16,17,36,39,45,54,55}.

Dado que esta vía favorece la generación de un ambiente atenuante del proceso inflamatorio y de reparación de los daños ocasionados por la isquemia, se le atribuye un papel cardioprotector. De hecho, se ha podido comprobar en diferentes estudios con modelo de rata y ratón, que la sobreexpresión bien de su ligando o su receptor, entre otras aproximaciones, aumentando así la interacción entre estos y una mayor activación de la vía, reduce la fibrosis, previene la hipertrofia de los cardiomiocitos, reduce la apoptosis y mejora la función miocárdica de un modo dependiente de la dosis^{16,17,56,57}.

La clave de esta actividad cardioprotectora aún no ha sido dilucidada. Algunos estudios sugieren que esta reside en la propia vía NF- κ B y los genes que regula a nivel transcripcional, sin embargo, esta respuesta podría ser dependiente del tipo celular, del ambiente celular en el que se encuentra y del momento de activación. Otros sugieren que existen diversos elementos que modularían su activación como la angiotensina II, la endotelina-1 o la fenilefrina que actuarían contrarrestando el efecto cardioprotector de la IL-33 y en otros se postula que la actividad podría residir en la activación de la proteína MAP quinasa p38. Aún es necesario el estudio en profundidad de estas propiedades, pues cada uno de los hallazgos que se realizan al respecto, pueden formar parte de un mismo sistema cuya regulación sea más compleja de lo que aparenta^{43,56-58}.

3.2.4. Patrón de expresión de ST2_s

En la revisión de los diferentes artículos, ponen de manifiesto la capacidad de las células endoteliales de expresar la isoforma soluble de forma natural, mientras que los cardiomiocitos y fibroblastos requieren de un estímulo mediado por el estrés mecánico o ciertas citoquinas como IL-1 β y TNF- α , para inducir la expresión de ST2_s^{16,17,45,54,59}. También se propone que la presencia de ciertas moléculas mencionadas con anterioridad como la endotelina-1 o la angiotensina II entre otras, podrían inducir la secreción de ST2_s^{44,60,61}. Por lo que respecta a las células inmunitarias, se postula que los macrófagos son capaces de mantener una secreción constitutiva de ST2_s, mientras que en otros tipos celulares esta secreción debe ser inducida. Este es el caso de los mastocitos y basófilos, en los cuales la IL-33 es necesaria para la expresión de esta isoforma, especialmente en los primeros en los cuales se induce fuertemente su expresión. Ocurre de igual forma con los linfocitos Th1 y Th17, en los cuales la estimulación en este caso de CD3 dirige la expresión de este receptor soluble^{34-36,54,62}.

3.2.5. Implicación del receptor ST2 en cardiología

Dada su implicación en la fisiopatología de las distintas enfermedades inflamatorias y cardiovasculares⁴⁷⁻⁵³, así como por la regulación de la actividad del sistema inmune^{36,39,45,54} y los efectos beneficiosos que se derivan de esta vía^{13,16,56,57}, en los últimos años el estudio de este receptor ha cobrado una gran importancia ya que resulta evidente su potencial como diana terapéutica y como medio para entender los procesos conductores de otras muchas patologías inflamatorias.

Además, el interés de este marcador es doble, puesto que no solo es una posible diana terapéutica, sino que como veremos a lo largo del presente trabajo, también constituye un sólido biomarcador del pronóstico de los pacientes tras el IAM. Actualmente las técnicas más fiables para aproximar la evolución de los pacientes las constituyen los niveles de troponina⁶³, la resonancia magnética cardiaca (RMC) y la obstrucción microvascular (OMV)⁶⁴, sin embargo, para su detección implican la presencia de cambios físicos lo que pone de manifiesto la acuciante necesidad de un biomarcador temprano. Se

han elaborado estudios con diferentes moléculas asociadas a fibrosis, hormonas natriuréticas y micro ARNs entre otros, pero encontramos que presentan diferencias entre poblaciones, varían sus niveles ya que regulan o se induce su expresión debido a gran cantidad de procesos o requieren de técnicas para su análisis (retrotranscripción, cuantificación, secuenciación, etc.) que hacen tedioso su establecimiento como biomarcadores^{7,65-68}.

El potencial de ST2 como biomarcador reside en la mencionada isoforma soluble (ST2_s), la cual surge como un biomarcador de fácil acceso por métodos no invasivos ya que se encuentra presente en el suero sanguíneo y predice con gran fiabilidad la evolución de los pacientes. Bien solo o acompañado de otros marcadores, la predicción que establece en la evolución a largo plazo del paciente se hace evidente en diversos estudios^{20,59,61,69,70}. Entre ellos, cabe destacar el estudio realizado por nuestro grupo⁶⁴, en el que se observó como los niveles elevados de ST2_s se correlacionaban con una peor función cardíaca al 6^o mes tras la reperfusión, a través de una FE deprimida en los pacientes con IAMEST.

La base de esta correlación se centra en la capacidad que tiene esta isoforma soluble de unir el mismo ligando, la IL-33, actuando como receptor competitivo e impidiendo los efectos cardioprotectores de la cascada de señalización que la interacción de ST2_L con la IL-33 activan (Figura 8).

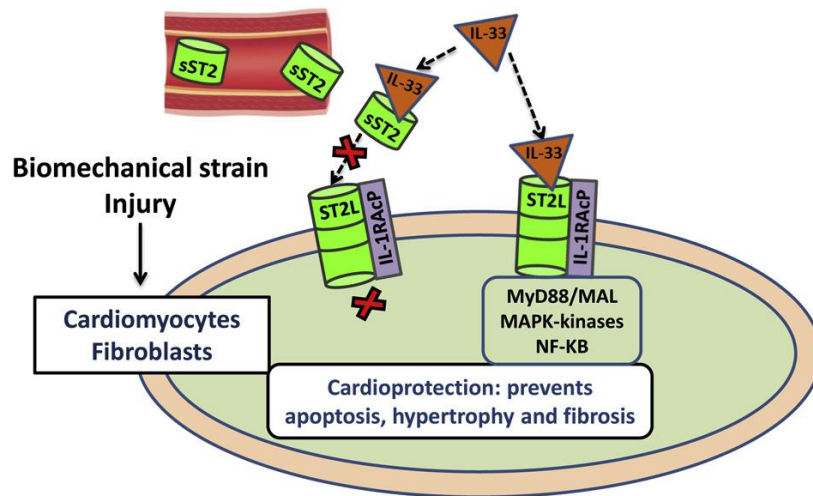


Figura 8. Representación esquemática del efecto competitivo por sustrato que establecen las dos isoformas del receptor ST2 por su ligando. Mientras que la unión de IL-33 con ST2_L desencadena procesos cardioprotectores, la isoforma ST2_S actúa como receptor competitivo bloqueando la activación de la vía¹⁶.

Por lo que respecta a ST2_S, vemos que no solo constituye un biomarcador robusto capaz de predecir la evolución de los pacientes a largo plazo, sino que también conforma en sí una posible diana terapéutica, dado que su bloqueo como se ha visto en experimentos con modelos de rata o ratón^{43,57}, consigue reducir eficazmente los niveles de hipertrofia y necrosis que se observan, entre otros efectos adversos.

Como hemos visto, la fisiopatología del IAM y los procesos que tiene lugar tras ella, dependen en parte de la respuesta inmunitaria que tiene lugar, en la cual posee una gran implicación el receptor ST2. Sabemos que los niveles elevados de su isoforma soluble ST2_S se correlacionan con una mayor probabilidad de desarrollo de eventos cardiovasculares adversos, a través del bloqueo competitivo por sustrato de la isoforma ST2_L, cuya vía de señalización posee un efecto anti-inflamatorio, profibrótico, anti-apoptótico y de reparación tisular entre otros efectos. Dado que la dinámica de expresión de este receptor

en el contexto del IAM no ha sido explorada y gracias a los resultados previos obtenidos en el estudio del grupo⁶⁴, nos planteamos continuar con el estudio de este a fin de conocer su dinámica y principales tipos celulares implicados en su expresión entre otros puntos clave, ya que esto puede suponer la instauración a largo plazo de nuevas aproximaciones terapéuticas que mejoren la calidad de vida de estos pacientes

4. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es la caracterización de la dinámica de expresión del receptor ST2 en el contexto del IAM tanto en un modelo clínico constituido por pacientes con IAMEST como en un modelo experimental porcino de IAM reperfundido. Para ello, los objetivos específicos del trabajo se basarán en:

- (1) Analizar la dinámica de expresión de la isoforma ST2_S en suero de pacientes con IAMEST
- (2) Correlacionar los niveles de ST2_S con la aparición de IC en pacientes IAMEST
- (3) Evaluar de la dinámica de expresión de la isoforma ST2_S en suero del modelo experimental porcino
- (4) Estudiar la dinámica de expresión de la isoforma ST2_L en tejido infartado del modelo experimental porcino
- (5) Caracterizar los principales tipos celulares productores de la isoforma ST2_L en tejido infartado del modelo experimental porcino

5. Material y métodos

5.1. Modelo clínico

El modelo clínico se elaboró a partir de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) que sufrieron un IAM extenso y que accedieron a participar en el estudio bajo aprobación del consentimiento informado. Los criterios de inclusión de los pacientes se centraron en una fracción de eyección cardiaca deprimida, la no existencia de contraindicaciones médicas para la realización de RMC y la mayoría de edad, mientras que los criterios de exclusión comprendían leucopenias, resonancias cardiacas en las que se observaron cuerpos extraños y *éxitus* entre otros. En este modelo se incluyeron un total de 153 pacientes cuyas características se presentan en Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes con IAMEST incluidos en el modelo clínico.

Edad (años)	59 ± 12
Hombres (%)	55
Mujeres (%)	45
HTA (%)	37,3
DM (%)	15,7
Dislipemia (%)	32,7
Fumadores (%)	43,8
Episodios de infarto previos (%)	34,6

HTA: Hipertensión arterial; DM: Diabetes *Mellitus*.

5.1.1. Recogida de muestras clínicas

La recogida de muestras con las que se trabajó comienza cuando un paciente entra en urgencias con sospecha de IAM. El protocolo de actuación en esta situación es la activación del conocido “código infarto”, donde el paciente es trasladado a una sala de hemodinámica en la cual se le practica una ACTP. Tras esta intervención el paciente es trasladado a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) donde aguarda bajo observación durante 1 día; pasado este periodo crítico pasan a la sala de cardiología donde permanecen de 3 a 4 días hasta finalmente obtener el alta de hospitalización. Durante el ingreso y al mes tras la ACTP, el personal del HCUV llevó a cabo una serie de extracciones de sangre tal y como se indica en la Figura 9, constituyendo las muestras de trabajo que emplearemos para los ensayos en el modelo clínico.

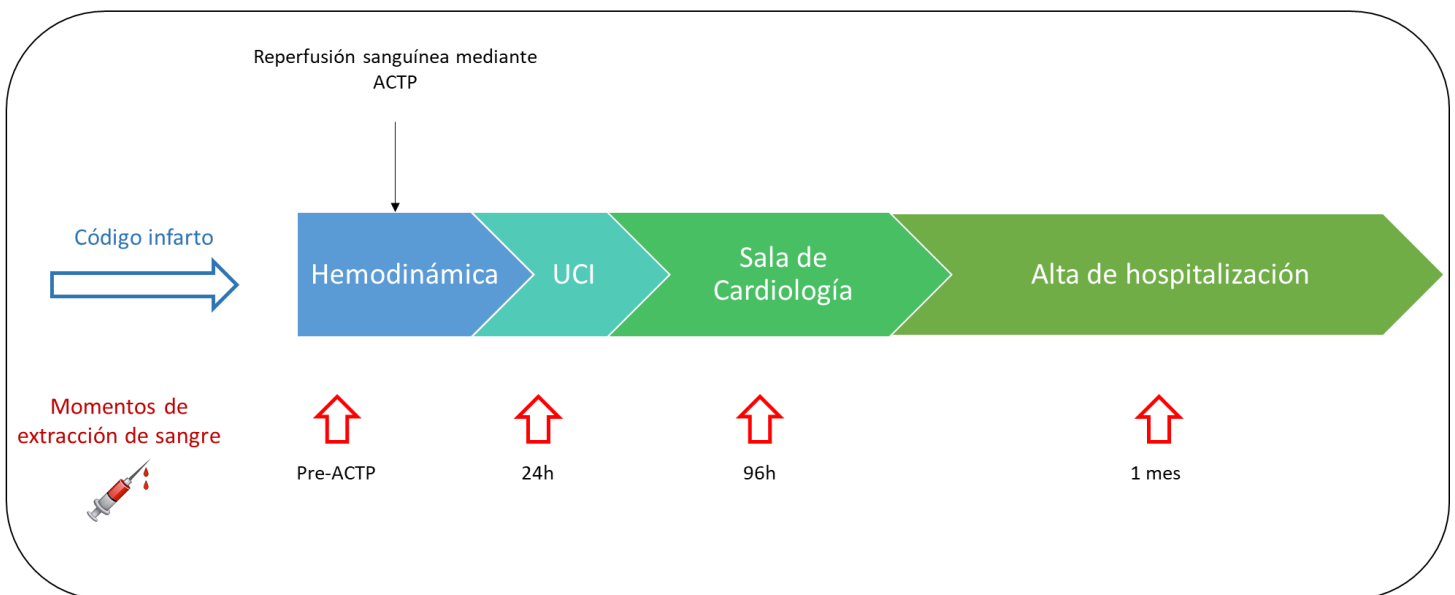


Figura 9. Protocolo de actuación ante un código de infarto y momentos de la toma de muestras para el estudio en el modelo clínico. ACTP: Angioplastia coronaria transluminal percutánea; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

5.1.2. Determinación de la dinámica de ST2_s en el modelo clínico

Se recolectaron muestras de sangre de 16 pacientes en los momentos mencionados anteriormente y se almacenaron en viales de 3 mL cada uno. El procesamiento de estas muestras consistió en dejar coagular los viales durante 1h aproximadamente, centrifugar los viales coagulados a 2500 rpm durante 15 minutos en una centrífuga *EBA20s (Hettich)* para posteriormente extraer el suero sobrenadante. Este suero se preservó mediante métodos de ultracongelación a -80°C y constituye el material con el que realizaremos la cuantificación de la isoforma ST2_s.

Una vez obtenido el suero, para determinar la concentración de ST2_s y con ello interpretar la dinámica de expresión de esta isoforma durante las distintas fases del IAM en el modelo clínico, se empleó la técnica de ELISA competitivo siguiendo el protocolo que detalla el proveedor en el kit *Ensayo ST2 Presage (Critical Diagnostics)*. El resultado de las técnicas se cuantificó empleando el espectrofotómetro *Espectro-max Plus (Molecular Devices)*.

5.1.3. Seguimiento de los pacientes

Para la correlación de los niveles de ST2_s con el desarrollo de IC en los pacientes con IAMEST, dos cardiólogos del HCUV revisaron el historial clínico de 153 pacientes, prestando especial atención a la aparición de este evento. Una vez revisado el historial de todos ellos, se registraron estos eventos en la base de datos del grupo, con la que posteriormente realizaríamos el análisis.

5.2. Modelo experimental porcino

Para llevar a cabo este estudio fue necesario el desarrollo de un modelo porcino de IAM cuyo protocolo ha sido puesto a punto por parte del propio Grupo de Investigación Traslacional en Cardiopatía Isquémica de INCLIVA, previamente validado en otros trabajos⁷¹. En éste se emplearon cerdos hembra con un peso aproximado de 30 Kg, a los que se les practicó la introducción percutánea de un catéter de angioplastia. Después se hinchó el balón durante 90 min en el segmento medio de la arteria descendente anterior

izquierda para provocar el infarto. Tras esta intervención se confirmó la oclusión del flujo a través de la inyección de contraste angiográfico y la elevación del segmento ST mediante ECG. A continuación, se procedió al sacrificio del animal mediante una inyección de cloruro potásico y se extrajo el corazón.

- Grupos experimentales del modelo:

Para este modelo se diseñaron 5 grupos experimentales (n = 5 animales/grupo experimental): un grupo (1) control al que no se le practicó ninguna intervención, y cuatro grupos con 90 minutos de isquemia. Estos cuatro se dividen en un grupo (2) control sin reperusión (pre-ACTP) y tres con reperusión (post-ACTP) a los (3) 5 minutos, (4) 1 semana (modelo en fase aguda) y (5) 1 mes (modelo en fase crónica) tras la reperusión cardiaca.

5.2.1. Procesamiento de muestras biológicas

Las muestras de sangre se extrajeron antes del sacrificio del animal en cada grupo experimental y su procesado consistió en dejarlas coagular durante 1 hora aproximadamente, centrifugarlas a 2500 rpm durante 15 minutos y extraer el suero sobrenadante. Este suero se conservó para su posterior uso mediante procesos de ultracongelación a -80°C.

Las muestras de tejido cardiaco se obtuvieron por la realización de cortes seriados desde el ápex hasta la base del corazón extraído anteriormente (Figura 10). Una vez realizados, se incubaron 24h en paraformaldehído para más tarde ser enviados al Servicio de Anatomía Patológica del HCUV, donde se encargan tanto de su inclusión y preservación en bloques de parafina, como de la elaboración de los cortes que constituyen el material de trabajo que empleamos en el presente estudio.

Obtención de cortes de tejido cardiaco en las diferentes fases

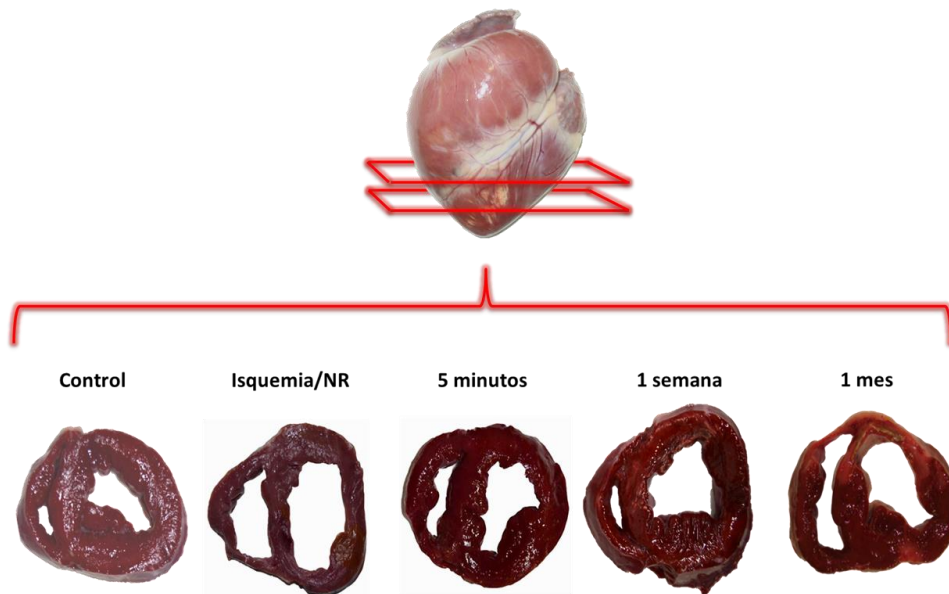


Figura 10. Obtención de cortes de tejido cardiaco infartado del modelo experimental porcino representativas de cada una de las fases analizadas. NR: no reperusión.

5.2.2. Determinación de la dinámica de ST2_s en el modelo experimental porcino

Con este suero se determinó la concentración de la isoforma ST2_s mediante la técnica de ELISA competitivo, siguiendo el protocolo que detalla el proveedor en el kit *Porcine soluble IL-1 Receptor 4/ST2* (MyBioSource). Mediante esta técnica analizamos un total de 13 muestras de sangre y el resultado de las técnicas se cuantificó empleando el espectrofotómetro *Espectra-max Plus* (Molecular Devices).

5.2.3. Determinación de la dinámica de ST2_L en tejido cardiaco

Para determinar la concentración relativa en tejido del receptor ST2_L y de este modo establecer la dinámica de expresión de esta isoforma durante las distintas fases del IAM para el modelo experimental porcino, se empleó la técnica de inmunohistoquímica.

El protocolo empleado para llevar a cabo esta técnica se detalla en el **Anexo 1**, así como las condiciones implementadas en la Tabla 2. Para los diferentes pases de lavado se empleó un tampón Tris salino con 1% de tritón (TBS) 1x elaborado a partir el tampón de lavado *EnVision™ FLEX Wash Buffer 20x DM 831 (Dako)*, permitiendo una permeabilización de las membranas celulares mayor que al emplear un tampón fosfato salino (PBS) y facilitando así la interacción antígeno-anticuerpo. El desenmascaramiento antigénico para este marcador en concreto se llevó a cabo mediante un desenmascaramiento por calor empleando la solución *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution High pH (50x) DM 829 (Dako)* y un autoclave *4001745-Micro 8 (JP Selecta)*.

Tabla 2. Condiciones implementadas para el marcador ST2 en la técnica de inmunohistoquímica.

Marcador	Anticuerpo 1º			Anticuerpo 2º			
	Concentración	Tiempo de incubación	Referencia	Especie de origen	Concentración	Tiempo de incubación	Referencia
IL1RL1 (ST2)	1:1000	1h	60112 (Proteintech)	Ratón	Sin diluir	30 min	<i>EnVision™ Flex SM 802 (Dako)</i>

Los resultados de la técnica obtenidos mediante la captura de fotografías se llevaron a cabo en un microscopio *Leica ICC50W*, recolectando un total de 100 fotografías tomadas a 20x aumentos, representativas de los diferentes grupos analizados. Estas imágenes fueron más tarde analizadas empleando el software *Image-Pro-Plus v6.0* donde se cuantificó el número de células ST2_L positivas, tal como se muestra en la Figura 11.

Análisis del receptor ST2_L en tejido cardiaco

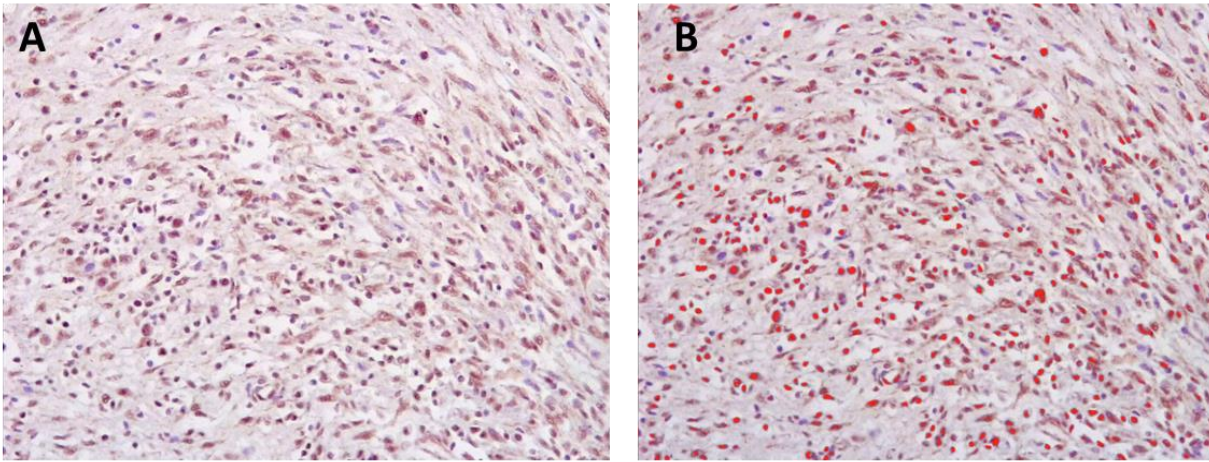


Figura 11. Análisis del receptor ST2_L en tejido cardiaco del modelo experimental porcino, en el que se muestra en la imagen (A) un tejido en fase aguda y en (B) el mismo tejido, pero en el que se marca en color rojo todos los receptores ST2_L presentes en los diferentes tipos celulares.

5.2.4. Caracterización de los productores de ST2_L en tejido cardiaco

La identificación de los tipos celulares responsables de la expresión del receptor ST2_L en el tejido del modelo experimental porcino, se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia. Esta técnica permitió la colocalización del receptor de interés (ST2_L) junto a marcadores específicos de ciertos tipos celulares con una alta especificidad. Entre los tipos celulares seleccionados para el análisis se encuentran las células endoteliales, linfocitos T y miofibroblastos, cuyos marcadores son CD31, CD3 y α -SMA respectivamente.

El protocolo empleado para llevar a cabo la colocalización del marcador ST2_L junto al resto de marcadores se describe en el **Anexo 1**, así como las condiciones implementadas en la Tabla 3. Cabe destacar que, dado que no empleaban esta técnica con anterioridad en el laboratorio, fue necesaria su puesta a punto modificando los diferentes tiempos de desparafinación, proceso muy importante debido a la autofluorescencia que presenta la parafina en la que están incluidas las muestras de tejido, el tiempo de incubación y concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios, así como el método de

desenmascaramiento antigénico. El proveedor de los anticuerpos sugiere el tipo de desenmascaramiento apropiado para cada marcador, sin embargo, dado que en la técnica de colocalización se emplean anticuerpos para marcadores diferentes, hubo que hallar el desenmascaramiento apropiado para la combinación de ambos, bien empleando un método enzimático mediante el uso de la proteínasa bacteriana P8038 (Sigma-Aldrich) en una solución de 1 mg/ml o bien mediante calor, en cuyo caso se emplearon soluciones *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Low/High pH (50x) DM828* y *DM 829* respectivamente (*Dako*), utilizándolas a una concentración 1x según recomienda el proveedor.

Para los diferentes lavados se empleó una solución de TBS 1x, la cual se elaboró a partir del tampón de lavado *EnVision™ FLEX Wash Buffer 20x DM 831 (Dako)*. Esta solución a diferencia del PBS, permite una mayor permeabilización de las membranas celulares gracias a su contenido en tritón, facilitando así la acción de los diferentes reactivos y la unión de los anticuerpos con sus antígenos correspondientes. La solución bloqueante de endoperoxidasa del tejido empleada fue *EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent SM801 (Dako)*. Como optimización del protocolo y para minimizar el gasto de recursos, se empleó el rotulador siliconado *PAP pen ab2601 (abcam)* rodeando las muestras de tejido. Los anticuerpos empleados para la localización de los diferentes marcadores en el tejido bajo estudio se diluyeron empleando *Common Antibody diluent (Dako)*. Tras la incubación con los anticuerpos primario y secundario de acuerdo con las especificaciones de la Tabla 3 se empleó el medio de montaje *Slowfade™ Gold antifade reagent with DAPI S36942 (Invitrogen)* capaz de revelar los núcleos celulares además de fijar las muestras.

Tabla 3. Condiciones implementadas para los distintos marcadores en la técnica de inmunofluorescencia.

Marcador	Desenmascaramiento Antigénico	Anticuerpo 1º			Anticuerpo 2º			
		Concentración	Tiempo de incubación (oscuridad)	Referencia	Especie de origen	Concentración	Tiempo de incubación (oscuridad)	Referencia
IL1RL1 (ST2)	pH High/enzimático	1:100	O/N	60112 (Proteintech)	Ratón	1:200	2 h	A11032 Alexa Fluor™ 594 (Invitrogen)
α -SMA (α -actina de músculo esquelético)	enzimático	1:50		Ab5694 (abcam)	Conejo			A11034 Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen)
CD3	enzimático	1:25		Ab 16669 (abcam)				
CD31	pH High	1:20		Ab28364 (abcam)				

O/N: toda la noche

Una vez puesto a punto el protocolo obtuvimos los resultados mediante la toma de fotografías empleando un microscopio *dmi300B (Leica)* y la lámpara *DFC450C (Leica)*. Una vez obtenidas se empleó el software *ImageJ* versión 1.5 para analizar únicamente las fotografías seleccionadas, constando de un total de 450 imágenes para el análisis del marcador ST2_L junto a CD31 en las que se analizaron 1416 células endoteliales, 167 imágenes para su colocalización con CD3 en las que se estudiaron un total de 724 linfocitos T y 150 imágenes para el análisis del marcador ST2_L junto a α -SMA en las que se estudiaron un total de 611 miofibroblastos. Entre los diferentes parámetros analizados para responder a las preguntas planteadas en el presente trabajo, se cuantificó el número total de células por campo de cada imagen, el número de células que se encontraban expresando el receptor ST2_L y el número total de células pertenecientes al tipo celular de interés, registrando tanto si se encontraban activamente expresando ST2_L como si no lo hacían.

5.3. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó el software *GraphPad Prism versión 6.01*. Los estadísticos empleados para el análisis de resultados comprenden el estadístico de ANOVA de una vía para datos no paramétricos empleando la prueba de Kruskal-Wallis, curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) con la prueba de log rank, comparaciones múltiples y el test t para datos no paramétricos empleando el test de Mann-Whitney, todos ellos con una significancia menor al 0,05.

6. Resultados

6.1. Modelo clínico

6.1.1. Dinámica de ST2_s en suero del modelo clínico

El histograma representado en la Figura 12 muestra la evolución de la dinámica de la isoforma soluble del receptor ST2 en suero de 16 pacientes con IAMEST, desde el inicio de la isquemia (Pre-ACTP) hasta etapas posteriores a la reperfusión (post-ACTP) a las 24h, 96h y 1 mes tras esta. Como podemos observar los resultados obtenidos revelaron la presencia de este marcador al inicio del proceso isquémico, los cuales sufrieron un aumento estadísticamente significativo de la concentración de ST2_s tras la reperfusión, alcanzando su valor máximo entre las 24h y las 96h (4 días) y finalmente descendiendo a niveles basales al mes de la intervención.

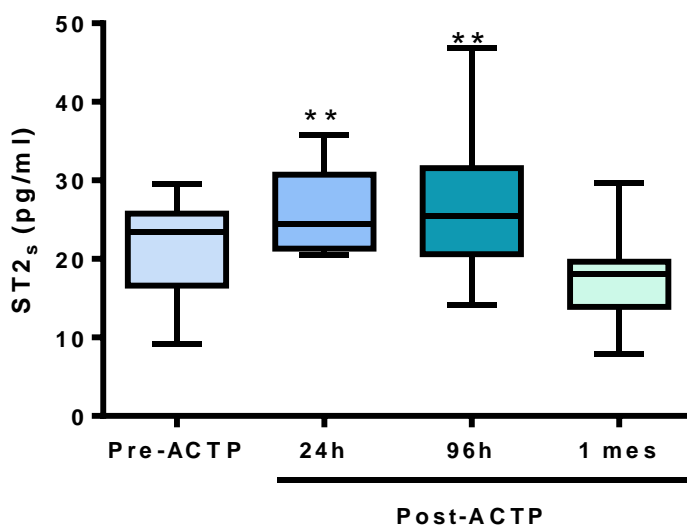


Figura 12. Dinámica de la concentración de ST2_s en suero de pacientes IAMEST desde el momento del proceso isquémico hasta un mes tras la reperfusión cardiaca. Los asteriscos (*) marcan la significancia respecto de Pre-ACTP. El estadístico empleado fue el ANOVA de una vía junto al método no paramétrico Kruskal-wallis. (**): $p < 0.01$ vs. pre-ACTP

6.1.2. Relación entre la concentración de ST2_s y el desarrollo de insuficiencia cardiaca

El periodo de seguimiento de los 153 pacientes tuvo una duración de 187 semanas. De estos, 73 tenían niveles bajos de ST2_s y 2 de ellos desarrollaron IC. Los 80 pacientes restantes, poseían niveles elevados de ST2_s y 12 de ellos desarrollaron IC, resultando así la correlación estadísticamente significativa que se muestra en la Figura 13.

Como podemos ver en la gráfica, se representa la predicción de supervivencia de los pacientes con IAMEST frente al desarrollo de IC, teniendo en cuenta los valores séricos de ST2_s. La gráfica reveló que los pacientes con mayores niveles séricos de este receptor soluble poseen una disminución de la supervivencia, debido al desarrollo de IC, de hasta un 20% aproximadamente a los 5-6 años tras la reperfusión coronaria.

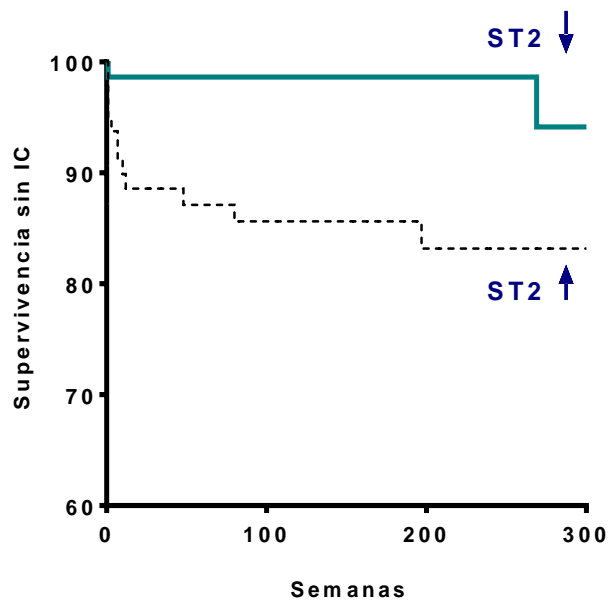


Figura 13. Curva de supervivencia de pacientes con IAMEST ante el desarrollo de IC a largo plazo, en la que se valora los niveles séricos de concentración de ST2_s. El estadístico empleado fue la curva de supervivencia (Kaplan-Meier) empleando el test de log rank. $p < 0.009$

6.2. Modelo experimental porcino

6.2.1. Dinámica de ST2_s en suero del modelo experimental porcino

En la Figura 14 se muestra la representación gráfica de la dinámica de ST2_s en el suero del modelo experimental porcino (n=13 muestras de sangre). No se obtuvieron valores estadísticamente significativos entre los niveles de ST2_s y los distintos momentos de la toma de muestras de cada sujeto y como podemos observar debido a la dispersión de los valores obtenidos, tampoco se pudo establecer un valor medio de dicha concentración en las diferentes etapas. Pese a esto, los resultados parecen indicar la existencia de cierta concentración basal de este receptor y posteriormente una tendencia de aumento de estos valores a los 5 minutos de la inducción del infarto (isquemia/NR), los cuales tienden a disminuir a los 5 minutos tras la reperfusión coronaria (post-R). Mas allá de los valores obtenidos tras los 5 minutos post-R, no muestran un patrón claro en cuanto los niveles del receptor soluble, salvo por unos valores que parecen retornar a la concentración basal en la fase crónica (1 mes tras la reperfusión aproximadamente).

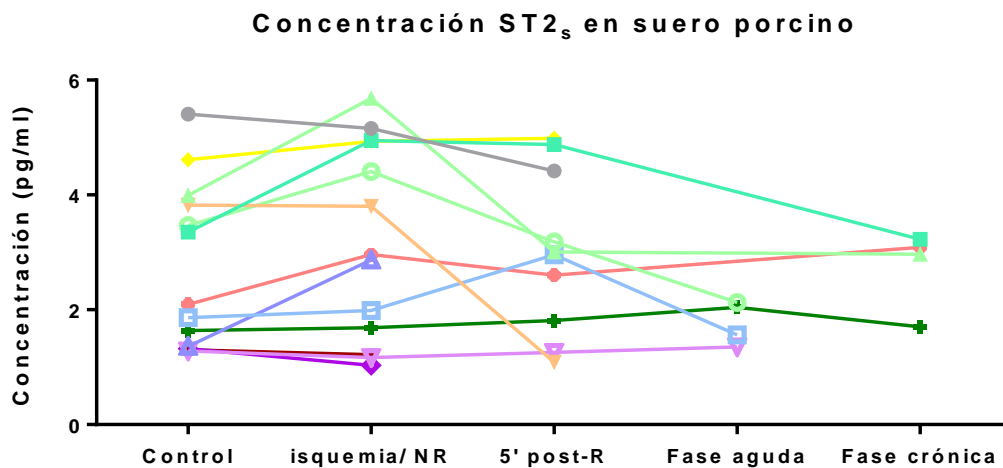


Figura 14. Dinámica de la concentración de ST2_s en suero del modelo experimental porcino (n= 13) desde el grupo control al que no se le induce el infarto, hasta el grupo de 1 mes tras la reperfusión coronaria. El estadístico empleado fue el ANOVA de una vía junto al método no paramétrico Kruskal-wallis. NR: no reperfusión.; post-R: tras la reperfusión coronaria.

6.2.2. Dinámica de ST2_L en tejido cardiaco

Para el análisis de esta dinámica, se descartó el tejido representativo de los 5 minutos tras la reperfusión ya que no se apreciaban cambios significativos respecto de la muestra en el momento de la isquemia. Como podemos observar, en la Figura 15, se muestran los tejidos correspondientes a cada una de las cuatro fases analizadas. En la fila superior de esta se representa cada uno de los tejidos con una tinción de hematoxilina-eosina (HE) facilitadas por el servicio de Anatomía Patológica del HCUV, mientras que en la fila inferior se representan los tejidos en la misma fase, pero con una tinción inmunohistoquímica en la que se encuentra marcado el receptor ST2_L. Los núcleos en ambas tinciones se muestran de color lila, mientras que las fibras de colágeno se muestran en un color rosado y únicamente en la tinción de inmunohistoquímica podemos apreciar la presencia del receptor ST2_L con una tonalidad morada oscura o rojiza. En las imágenes correspondientes al tejido control observamos como existe una organización espacial de los cardiomiocitos y cierta expresión basal del receptor ST2_L. En el tejido correspondiente al proceso de isquemia sin reperfusión se observó como los cardiomiocitos se desorganizaron, apareció cierto grado de edema entre las células y como se formaron espacios libres de cardiomiocitos debido a los procesos de necrosis, acompañados de una mayor expresión del receptor ST2_L respecto del control. En el tejido asociado a la fase aguda (1 semana tras la reperfusión aproximadamente) se observó un aumento del área afectada por el proceso isquémico con una notable desaparición de cardiomiocitos, la aparición de un mayor número de células, en su mayor parte infiltrados de linfocitos y monocitos entre otros tipos celulares, además de un considerable aumento en la expresión del marcador ST2_L. También pudimos observar que en esta fase comenzaban a verse pequeños depósitos de colágeno, que resultan muy evidentes a simple vista en la fase crónica (1 mes tras la reperfusión aproximadamente), en la cual la consolidación de la cicatriz fibrótica vino acompañada de un aumento en la presencia de miofibroblastos (morfología fusiforme), mientras que la expresión de ST2_L disminuyó ligeramente, a valores aún superiores a los niveles que se observan en el momento de la isquemia.

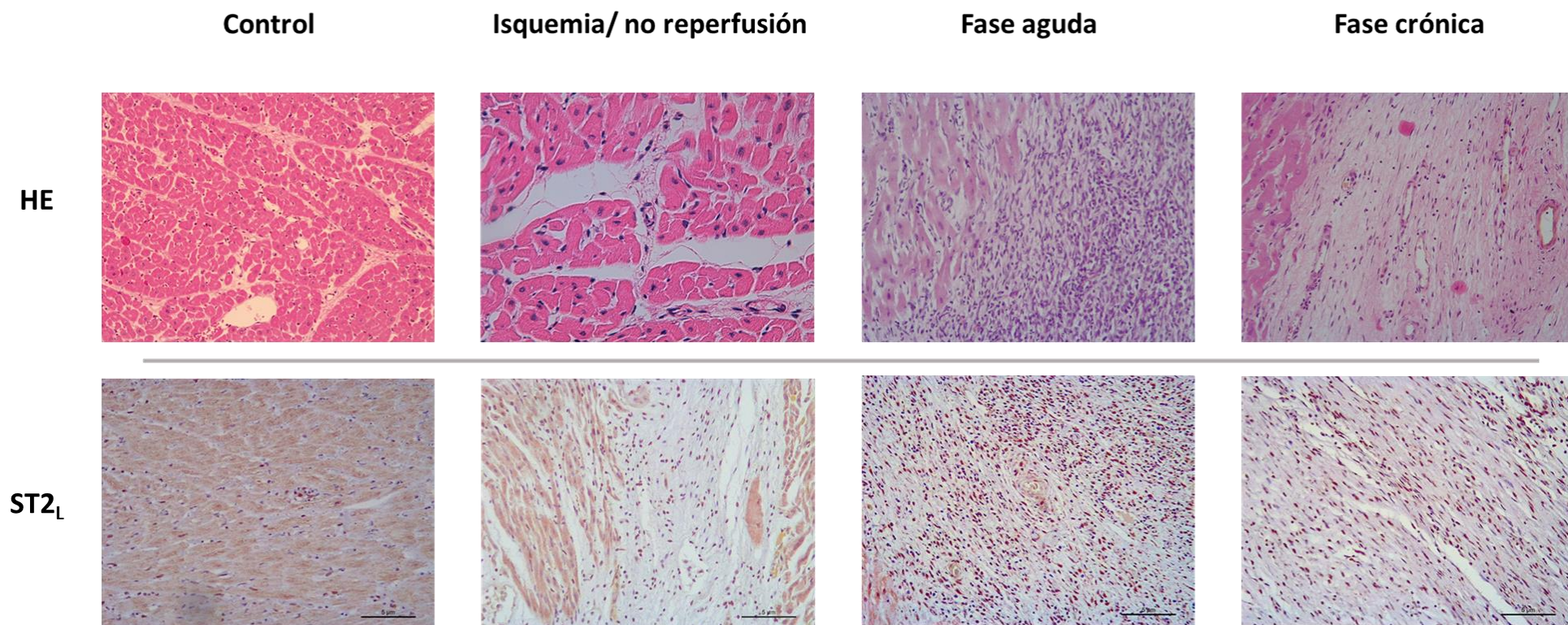


Figura 15. Imágenes con tinción Hematoxilina-eosina (HE) tomadas a 20x aumentos representativas de las cuatro fases analizadas, en las que los núcleos celulares poseen un color lila, la expresión del marcador ST2_L se denota por una coloración morada oscura o rojiza y donde las fibras de colágeno se observan de color rosado. HE: Hematoxilina-eosina.

En la Figura 16 se muestra la dinámica obtenida al analizar la concentración del receptor ST2_L en los distintos grupos experimentales mencionados anteriormente, en función del número de células que expresan dicho marcador. En el gráfico de cajas se observó cómo hay un aumento gradual de la concentración del receptor de interés en el momento de la isquemia respecto del control, que continuó aumentando hasta alcanzar su valor máximo en la fase aguda (1 semana aproximadamente tras la reperfusión) y cuyo nivel se mantiene estable al menos hasta la fase crónica (aproximadamente 1 mes tras la reperfusión).

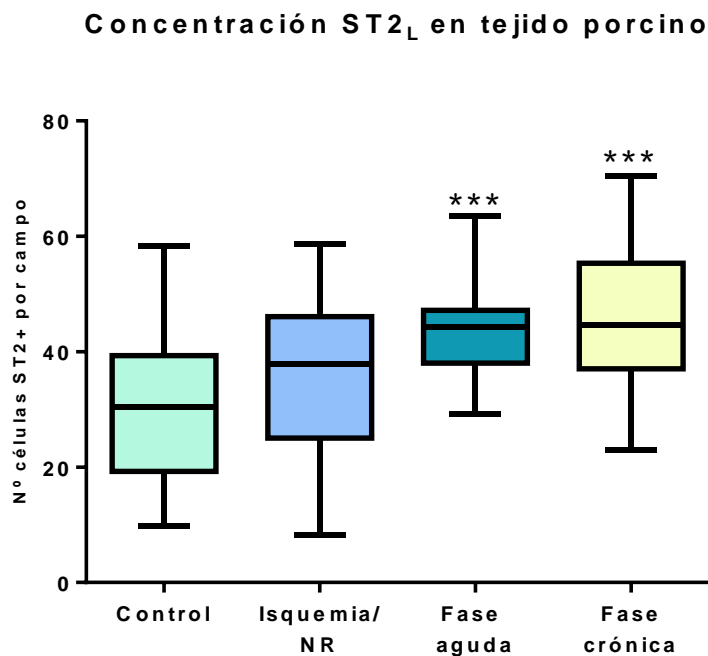


Figura 16. Dinámica de la concentración de ST2_L en tejido cardíaco del modelo experimental porcino en función del número de células que expresan dicho marcador, en el que se representan los valores obtenidos en el tejido control y desde el momento del proceso isquémico hasta un mes tras la reperfusión coronaria. Los asteriscos (*) marcan la significancia respecto del control. El estadístico empleado fue un ANOVA una vía empleando el test de krystal wallis. (***): $p < 0.001$ vs. control

6.2.3. Caracterización de los productores de ST2_L

La técnica de inmunofluorescencia nos permitió colocalizar el receptor de membrana ST2_L junto con otros tipos celulares de interés, en concreto junto a células endoteliales (CD31), linfocitos T (CD3) y miofibroblastos (α -SMA). Dado que la puesta a punto de esta técnica no nos permitió profundizar más por cuestiones de tiempo, se realizaron las tinciones en las dos fases más representativas del proceso del IAM, como son la fase aguda y la fase crónica, además del grupo control.

En primer lugar y antes de pasar a analizar los resultados obtenidos para cada tipo celular en concreto, observamos tal y como se muestra en la Figura 17, que acorde con los resultados previos en cuanto a la expresión de ST2_L, también aquí encontramos una relación creciente en la producción de esta isoforma transmembrana conforme avanzamos hacia etapas más tardías, pero en este caso atendiendo al porcentaje de células halladas en el tejido expresando ST2_L respecto del total de células presentes por campo. Como vemos de manera constitutiva en el tejido control, hallamos que un 26% de los diferentes tipos celulares presentes en la muestra expresan este receptor. En la fase aguda, la proporción de células positivas para la expresión de ST2_L aumenta hasta un 41% aproximadamente, valor que continúa creciendo ligeramente hasta la fase crónica, encontrándonos en esta fase que hasta un 55% de los tipos celulares hallados en la muestra expresan nuestro receptor de interés.

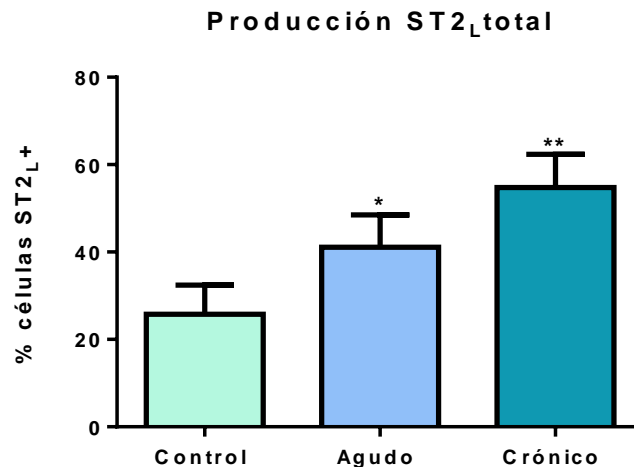


Figura 17. Histograma representativo del porcentaje de células que expresan ST2_L en membrana en cada fase analizada. En análisis estadístico empleando fue ANOVA de una vía empleando el test de krystal wallis. Los asteriscos (*) marcan la significancia respecto del control. (*); $p < 0.1$ vs. Control; (**): $p < 0.01$ vs. Control

Cabe destacar que tanto estos valores como los de los análisis que obtuvimos posteriormente, son un reflejo de la cantidad de células que se encuentran activamente produciendo nuestro receptor de interés y a que tipo celular concreto pertenecen respecto del número total de células presentes, y no necesariamente guardan una relación directa con la cantidad de ST2_L producido en cada fase.

- Células endoteliales:

En la Figura 18 podemos observar los tres tejidos del modelo experimental porcino correspondientes a los grupos control, fase aguda y fase crónica, en los que se denota en azul mediante la tinción DAPI los núcleos celulares, en verde el marcador CD31, en rojo el receptor ST2_L y en *merge* la superposición de los tres canales juntos. En estas imágenes se puede apreciar como las células endoteliales producen cierta concentración constitutiva de ST2_L en el tejido control, la cual aumentó considerablemente tanto en la fase aguda como en la fase crónica, donde se aprecia perfectamente como hay una mayor colocalización de las células endoteliales expresando este receptor transmembrana.

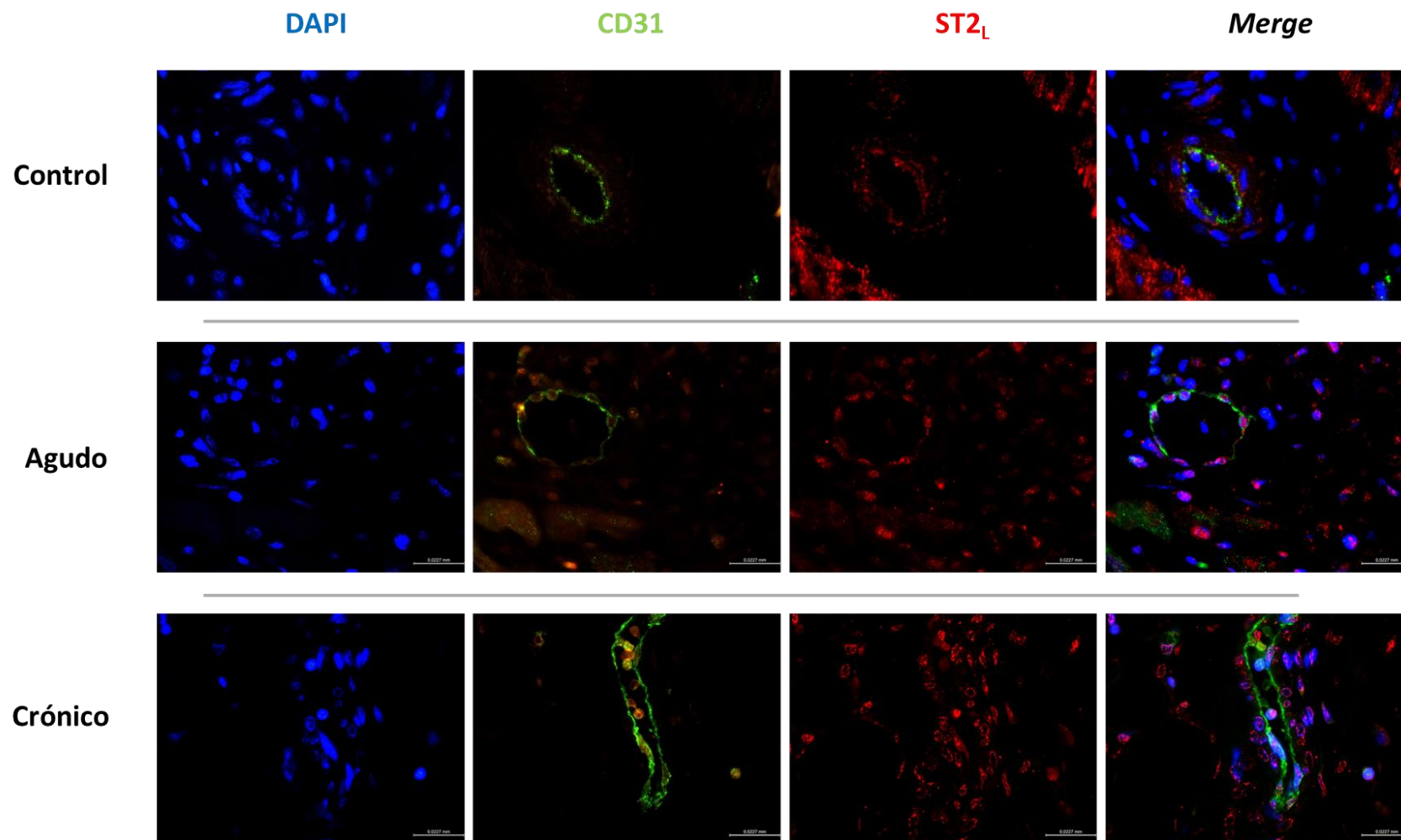


Figura 18. Inmunofluorescencia de tejidos del modelo porcino en las diferentes fases del IAM en las que se denotan de azul los núcleos celulares, en verde el marcador de células endoteliales CD31 y en rojo el receptor de membrana ST2_L. Por último, se muestra la combinación de los tres canales (*merge*) necesaria para la evaluación de la expresión del receptor por parte del tipo celular de interés.

Al analizar más en detalle los resultados que obtuvimos, observamos que de la población de células endoteliales totales registradas en cada fase, un 23% de su población se encontraba activamente expresando este receptor en su membrana en el tejido control, indicativo de una expresión constitutiva basal de esta isoforma por parte de este tipo celular. En fases más avanzadas, tal y como se puede apreciar también en las imágenes, el porcentaje de células endoteliales ST_{2L}⁺ aumenta hasta alcanzar un 78% en la fase aguda, cuyo valor se mantiene con un ligero aumento hasta la fase crónica, donde un 82% de las células endoteliales presentan este receptor anclado en su membrana (Figura 19).

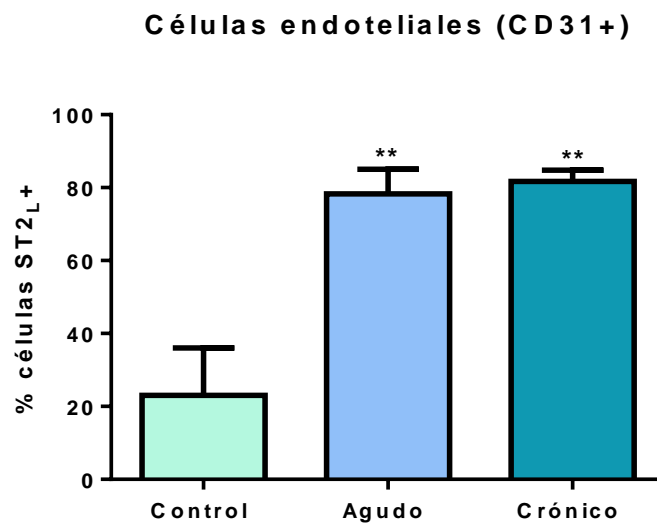


Figura 19. Histograma representativo del porcentaje de células, dentro de la población de células endoteliales, que se encuentran activamente expresando el receptor ST_{2L} en las diferentes fases analizadas. Los asteriscos (*) marcan la significancia respecto del control. El estadístico empleado fue ANOVA de una vía empleando el test de krystal wallis. (**): $p < 0.01$ vs. Control

Para interpretar correctamente estos datos debemos tener en cuenta la cantidad de células endoteliales presentes en cada fase, pues tal y como comentábamos anteriormente, el porcentaje de células ST_{2L}⁺ de un tipo celular no tiene porque necesariamente ser proporcional a la aportación de estos tipos celulares en cada fase. Así

pues, encontramos que en el tejido control había una densidad de 478 células endoteliales/mm², en el tejido en fase aguda hallamos un promedio de hasta 778 células endoteliales/mm² y durante la fase crónica un total de 718 células endoteliales/mm².

- Linfocitos T y miofibroblastos:

En la Figura 20 podemos observar dos tejidos del modelo experimental porcino donde se colocaliza el marcador de linfocitos T (CD3) en un tejido en fase aguda y el marcador de miofibroblastos (α -SMA) en un tejido en fase crónica, junto con ST2_L. Como podemos observar en la fila de imágenes superior, pese a encontrarnos en una respuesta inflamatoria aguda el número de linfocitos T por campo que pudimos encontrar era limitado, además no todos ellos eran productores de ST2_L como podemos ver en la imagen. En cuanto a la serie inferior donde se colocalizan miofibroblastos junto al receptor ST2_L en un tejido en fase crónica, pudimos encontrar no solo que el área isquémica se encontraba en gran medida poblada por este tipo celular, sino que una gran parte de ellos se encontraba expresando el receptor ST2_L.

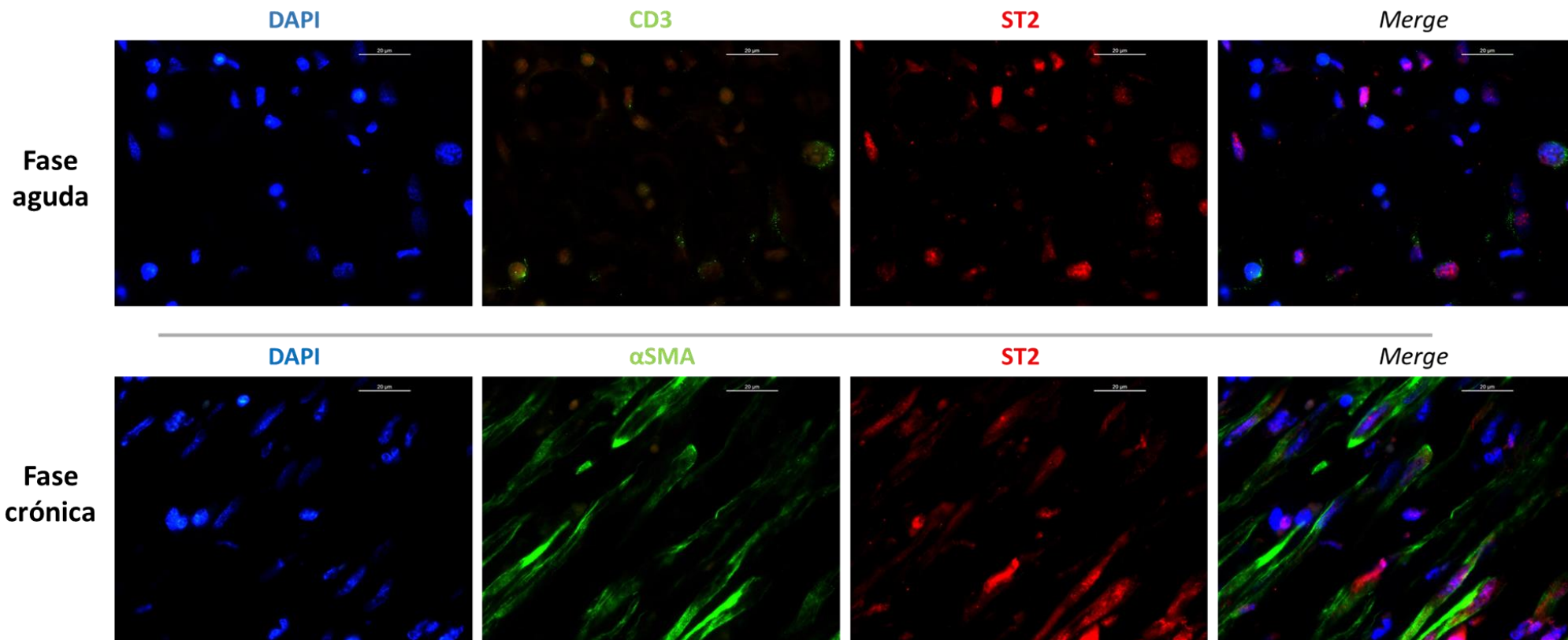


Figura 20. Inmunofluorescencia de tejidos del modelo porcino en las fases aguda y crónica del IAM, en las que se denotan de azul los núcleos celulares, en verde el marcador de linfocitos T (CD3) y de miofibroblastos (α SMA) respectivamente y en rojo el receptor de membrana ST2_L. Por último, se muestra la combinación de los tres canales (*merge*) necesaria para la evaluación de la expresión del receptor por parte del tipo celular de interés.

Al analizar en profundidad estas imágenes, pudimos observar que aproximadamente el 56% de los linfocitos T presentes en el tejido en fase aguda expresaban este receptor en membrana, mientras que el 85% de los miofibroblastos se encontraban expresándolo en etapas más tardías como es la fase crónica (Figura 21). En el tejido en fase aguda encontramos una densidad de linfocitos T de 303 linfocitos T/mm² mientras que, en la fase crónica, encontramos un total de 851 miofibroblastos/mm².

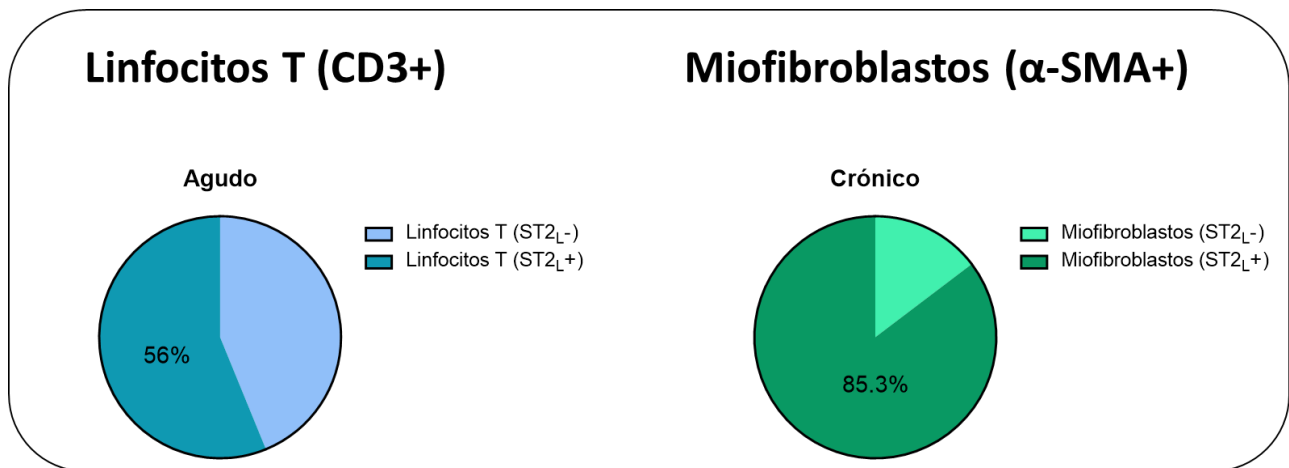


Figura 21. Representación gráfica del porcentaje de células, dentro de la población de linfocitos T y miofibroblastos, que presentan una expresión positiva para el receptor ST2_L en las fases aguda y crónica respectivamente.

Una vez analizamos la producción de ST2_L dentro de cada población celular estudiada, no dispusimos a analizar conjuntamente cual era la contribución de cada uno de estos tipos celulares a la concentración total de ST2_L en el tejido cardiaco en cada fase y como resultado de este análisis, obtuvimos la Figura 22. En esta se aprecia como del 26% de células que se encontraban expresando el receptor ST2_L en el tejido control, las células endoteliales solo suponen un 10% del total de células que se encontraban expresando ST2_L en ese momento. En la fase aguda se produce un aumento significativo de la expresión total de ST2_L con la producción de este receptor por parte del 39% de los células presentes, del cual hasta el 30% son células endoteliales, la cuales junto a los

linfocitos T, suponen hasta un 44% de la producción hallada en esta fase. Durante la fase crónica se registró la mayor proporción de células ST_{2L}+ respecto de las células totales, alcanzando hasta un 57%. Dentro de este, observamos que las células endoteliales aumentan ligeramente a un 32%, quienes junto al 43% de los miofibroblastos, representan de manera conjunta hasta el 75% de la producción total de ST_{2L} en la mencionada fase.

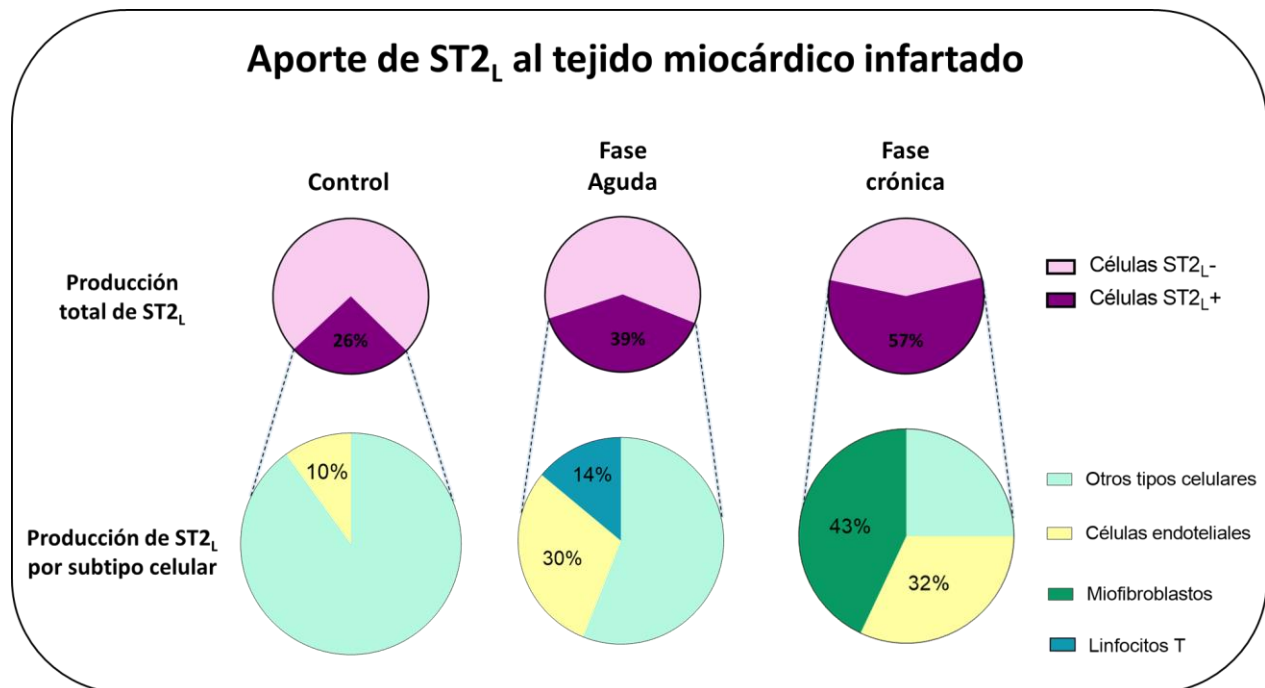


Figura 22. Diagrama representativo del porcentaje de células ST_{2L}+ presentes en el tejido miocárdico durante las diferentes fases analizadas y dentro de la población ST_{2L}+ los subtipos celulares responsables del aporte de la isoforma transmembrana del receptor ST₂.

7. Discusión

Antes de interpretar los resultados obtenidos, es necesario tener en cuenta la regulación de la vía que modula este receptor desde una perspectiva más amplia, lo cual nos permitirá tener una visión aproximada de la complejidad y la dinámica de este proceso. Como hemos comentado anteriormente y podemos observar en la Figura 23, ciertos tipos celulares producen IL-33 de manera constitutiva, como es el caso de los fibroblastos y células endoteliales^{17,40,54,59}.

Esta no necesita ser procesada para ser liberada o tener actividad funcional, únicamente encontramos que es posible atenuar su efecto biológico mediante el procesado por la caspasa-3 y caspasa-7 o incluso inactivada por acción de la caspasa-1, sin embargo, estas no se encuentran activas durante la necrosis sino en procesos controlados como la apoptosis^{36,54,72,73}. Ante un estímulo de estrés como el que se produce en el IAM, esta interleucina es liberada junto con moléculas que constituyen PMADs, los cuales serán reconocidos por sistema del complemento. Este activará los procesos de inflamación y reclutamiento de células del sistema inmunitario mediante la liberación de citoquinas y quimioatrayentes como la IL-1 β , IL-18, TNF- α , e INF- γ entre otras⁷⁻¹⁰.

Aquí es donde se produce el paso más complejo en la regulación de la vía, puesto que se dan varios procesos simultáneamente y el efecto de estas moléculas depende del tipo celular diana. En ciertos tipos celulares como las endoteliales, se aumentará la producción de IL-33 en respuesta al estrés y a algunas de las citoquinas liberadas al medio, mientras que en los cardiomiocitos solo el estrés mecánico provoca un aumento en la producción de esta interleucina^{40,54,59}. Al mismo tiempo, la acción de los quimioatrayentes provoca la migración al foco isquémico de células inmunitarias en las cuales el resto de las interleucinas provoca una acción proinflamatoria, como podemos observar en la diferenciación de linfocitos T a Th1 y macrófagos a un fenotipo M1. A su vez, la acción de la IL-33 liberada provoca en mastocitos, macrófagos y otros tipos celulares la secreción de

la isoforma soluble ST2_s la cual favorece el proceso inflamatorio, consolidando la degradación de productos necróticos y de matriz celular.

Dado que las propias células endoteliales producen de manera constitutiva pequeñas concentraciones de ST2_s, una vez la producción de IL-33 alcanza la concentración adecuada, esta comienza a unirse a los receptores ST2_L de células que lo expresan en su membrana como las propias células endoteliales o linfocitos Th2 entre otros^{17,55}. Con ello se induce la expresión de la isoforma ST2_L y se reprime la transcripción de la isoforma soluble, además de la activación de la vía MyD88/NF- κ B que favorecerá la secreción de citoquinas que darán lugar a lo que se conoce como una respuesta inmune de tipo II, mediante la secreción de interleucinas como la IL-4, IL-5 o IL-13 entre otros compuestos. Esta tendrá como resultado el cambio de fenotipo de los linfocitos Th1 a Th2 y de macrófagos M1 a M2, la diferenciación de linfocitos Treg además de la activación de otros tipos celulares y en conjunto, el cambio de una fase aguda caracterizada por los procesos inflamatorios y niveles elevados de ST2_s, a una fase crónica donde los niveles de ST2_L, la resolución de la inflamación, la reparación de tejidos dañados y la inducción de fibrosis son los protagonistas^{16,19,36,40,42,44}.

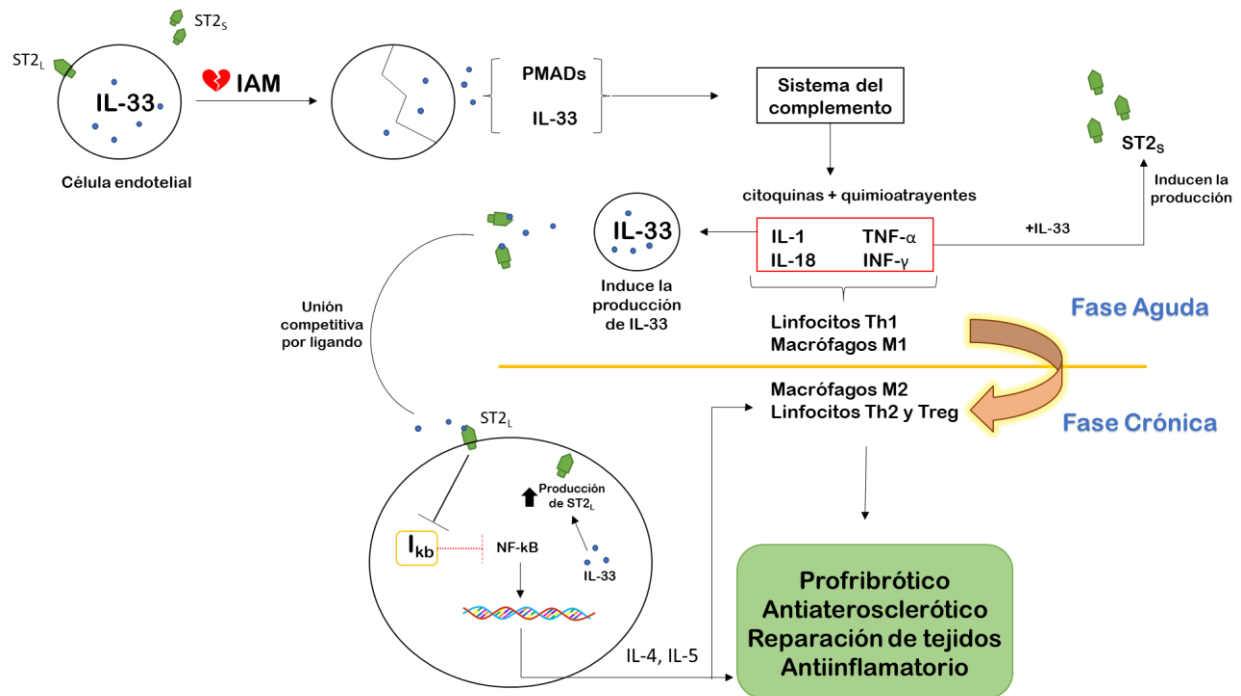


Figura 23. Representación esquemática de los procesos más relevantes en el trascurso de las fases aguda y crónica tras el IAM en relación con la liberación y regulación de las isoformas del receptor ST2.

7.1. Implicación de ST2 en pacientes con IAMEST

7.1.1. Dinámica de ST2_S en el suero del modelo clínico

En el suero de pacientes con IAMEST se estudió la dinámica de la isoforma soluble ST2_S y como hemos podido observar, existe una concentración basal de este receptor que aumenta hasta alcanzar su valor máximo entre las 24h y las 96h, concretamente en lo que consideramos como la fase aguda y en la cual tiene lugar la máxima expresión el proceso inflamatorio por la implicación de un sistema inmune que responde a un gran estrés como es la isquemia prolongada. Los resultados obtenidos concuerdan tanto con otros estudios^{59,74} como con lo que se observa a nivel histológico, ya que en esta fase es donde se presenta una mayor muerte celular ante la falta de oxígeno y nutrientes y si bien entendemos al eje IL-33/ST2_L como un mecanismo de freno de la respuesta inflamatoria, es necesaria la expresión de este receptor soluble al comienzo de esta, a fin de eliminar eficazmente los restos de células necróticas y matriz desorganizada para establecer una

sólida cicatriz fibrótica. Si bien consideramos como en toda reacción inflamatoria que estos procesos son necesarios para una limpieza eficaz de la zona afectada, en el contexto del IAM existe una estrecha línea que separa en que proporción esta actividad es adecuada, pues la capacidad del tejido miocárdico de recuperar la funcionalidad de esta área se ve gravemente comprometida y como hemos comentado, el beneficio que supone este proceso en otros tejidos, en el corazón supone un factor de riesgo que predispone a la aparición de eventos adversos como veremos a continuación.

7.1.2. Relación de ST2_s con el desarrollo de IC

En el ámbito de la cardiología, es ampliamente reconocida la relación entre las imágenes obtenidas por RMC con la probabilidad de aparición de eventos adversos en pacientes IAMEST, entre otras causas por el RV que modifica visiblemente la cámara ventricular cardiaca, desencadenante de patologías como la IC como principal causa de mortalidad^{7,15,64,75}. Sin embargo, la aparición de ST2 como un biomarcador de fácil obtención y capaz de predecir la evolución de los pacientes tempranamente, impulsó a los investigadores a explorar su contribución en diferentes áreas. Concretamente en el área de la cardiología se había observado que estos niveles pueden estar relacionados con el remodelado hipertrófico que sufre la cámara ventricular, de hecho, estudios previos del grupo demuestran que niveles elevados de ST2 se correlacionan con la aparición de remodelado ventricular adverso⁶⁴.

Por lo que respecta al presente trabajo, los resultados obtenidos al relacionar los niveles de ST2_s con la aparición de IC, nos muestran como una concentración elevada de este receptor se asocia con un aumento considerable de la probabilidad de padecer esta patología. Esta asociación se refleja en la predicción que establece que en los pacientes con IAMEST, la mayor concentración de ST2_s sérico supone el descenso de hasta un 20% en la supervivencia de los mismos a los 5-6años, dejando entrever el gran potencial de esta molécula como biomarcador. De acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos previos basados en los datos clínicos, se ha visto una clara correlación entre el tamaño del infarto o la disfunción cardiaca con niveles elevados de ST2_s^{14,64,70,76}. Teniendo en cuenta

estos datos y la regulación descrita con anterioridad, los niveles altos de esta isoforma soluble actuarían de modo competitivo por la unión con su ligando natural, la IL-33, prolongando en mayor medida la respuesta inflamatoria e impidiendo el cambio hacia un ambiente antiinflamatorio y de reparación de tejidos. Como consecuencia se formará una cicatriz fibrótica de mayor área que al ser repoblada por miofibroblastos con una capacidad contráctil limitada, obligará al tejido miocárdico a dilatar la cámara ventricular para paliar la fracción de eyección sanguínea deprimida y a largo plazo, a padecer eventos adversos como la IC. Con todo ello se pone de manifiesto que el receptor ST2_s además de una posible diana terapéutica, constituye un biomarcador temprano de fácil obtención por métodos no invasivos dada su presencia en el suero sanguíneo, que señala con gran fiabilidad el pronóstico del paciente, lo cual nos va a permitir establecer unas pautas de actuación preventivas y de seguimiento de los pacientes que aumentarán notablemente la supervivencia de estos.

7.2. Implicación de ST2 en el modelo porcino

7.2.1. Dinámica de ST2_s en el suero porcino

Una vez revisados los datos clínicos, pasamos a interpretar en detalle los resultados obtenidos para el modelo experimental porcino. En cuanto a la cuantificación del biomarcador ST2_s en el suero porcino, observamos que no replica los resultados que obtenemos en humanos. Pese a que entendemos, que el estrés al que es sometido el miocardio provoca un aumento en la secreción de la isoforma soluble del receptor, tal y como observamos por la tendencia marcada en los modelos experimentales examinados, no se observa un patrón tan claro como en el modelo clínico. Además, los valores obtenidos en cada sujeto varían en un amplio rango de manera que hace imposible determinar un rango de concentración en la expresión de ST2_s en cada fase del proceso. El experimento se llevó a cabo empleando varios kits en los que figuran diferentes controles internos proporcionados por la casa comercial para garantizar el éxito del ensayo, sin embargo, en todos los ensayos obtuvimos los mismos resultados lo que nos permite

descartar a la técnica empleada o su proceder como posible causa de los resultados poco concluyentes obtenidos. Entre las posibles causas aún no descartadas nos planteamos que el tamaño muestral fuese demasiado pequeño, aunque a primera vista, dada la variación de los resultados parece una explicación poco probable. También nos planteamos que, teniendo en cuenta que el pico máximo de expresión de este receptor en el modelo clínico se alcanza entre las 24-96h tras la reperfusión, y que en el modelo experimental las mediciones realizadas para los valores séricos de esta isoforma pasan de los 5 minutos tras la reperfusión a la fase aguda directamente, existe un gran margen de tiempo en el que los valores de concentración de esta isoforma puedan haber experimentado un pico de expresión significativo. En cualquier caso, este vacío nos impide descartar la existencia o no de un pico en los niveles séricos de ST2_s durante este periodo, además de hacer evidente la necesidad de un control de los niveles entre estas dos etapas.

7.2.2. Dinámica de ST2_L en el tejido cardiaco del modelo porcino

Pese a que los resultados del biomarcador en el suero porcino no hayan sido significativos, el análisis del biomarcador ligado a la membrana nos muestra un patrón que concuerda con los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de ST2_s en el modelo clínico. Si bien la expresión del receptor soluble está asociado a la fase aguda, podemos observar como la expresión del receptor transmembrana ST2_L se corresponde con el inicio de los procesos antiinflamatorios y de reparación de tejidos, propios de la fase crónica. Este aumenta progresivamente hasta alcanzar su concentración máxima a la semana tras la reperfusión, donde mantiene estable el nivel de expresión hasta al menos 1 mes tras esta. El aumento de expresión progresivo de ST2_L concuerda con los estudios que revelan una expresión constitutiva de este receptor por parte de ciertos tipos celulares^{17,54}, la cual se vería inducida por la acción de su propio ligando, la IL-33, cuya producción es a su vez regulada por la acción de ciertas citoquinas e interleucinas de carácter proinflamatorio, como el TNF- α o la IL-1 β entre otras, que actuarían fomentando su producción. Dado que se trata de dos isoformas que actúan de manera competitiva, es lógico que los valores máximos de expresión solapen durante un breve periodo de tiempo, a partir del cual se favorece la expresión del receptor transmembrana como protagonista de la fase crónica. Estos

resultados nos muestran una dinámica de expresión de ambas isoformas coherente con lo que se conoce actualmente y en el que se muestra claramente, qué isoforma es la protagonista de cada fase y como la expresión de estas se superpone en un momento clave para el cambio del ambiente proinflamatorio a uno resolutivo del daño isquémico.

Como apoyo de los resultados obtenidos hasta el momento, podemos observar en la Figura 15 como en el tejido control al que no se le ha practicado la inducción de la isquemia, los cardiomiocitos presentan una disposición regular y existe cierto grado de expresión del receptor ST2_L, que correspondería con la expresión constitutiva de ciertos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales y cardiomiocitos. En el tejido isquémico al que no se le practica reperfusión coronaria, la falta de oxígeno y nutrientes tiene como consecuencia un alto grado de muerte celular por necrosis, que se hace evidente por el área libre de cardiomiocitos, así como un ligero aumento en la expresión de ST2_L. Aquí es donde se produciría la liberación de PMADs e IL-33, que mediarán la activación del sistema del complemento y este a su vez, la liberación de interleucinas proinflamatorias y quimioatrayentes de leucocitos. En el tejido en fase aguda se puede apreciar como existe cierto grado de edema entre las células y una notable infiltración de diferentes tipos celulares, en su mayoría productores de la isoforma transmembrana del receptor. En esta fase se da el punto álgido de la respuesta inflamatoria en el que linfocitos Th1, macrófagos M1 y mastocitos entre otros se encontrarían produciendo la isoforma ST2_S y mediando la eliminación de los restos necróticos y parte de la matriz celular afectada. Al mismo tiempo y en concordancia con lo observado anteriormente, se hace patente el aumento en la expresión de la isoforma ST2_L, quien al establecer una unión competitiva por el ligando IL-33 comenzaría a reprimir la expresión de la isoforma soluble, a la par que induce la diferenciación de los infiltrados leucocitarios hacia fenotipos antiinflamatorios y profibróticos, como prueba de este cambio, se puede observar la disposición de los pequeños depósitos de colágeno que comienzan a verse en esta fase. Por último, en la fase crónica se denotan los depósitos de fibras de colágeno que constituirán la cicatriz fibrótica, así como el aumento en el número de miofibroblastos de morfología fusiforme y una ligera disminución de la expresión del marcador ST2_L aún

superior a los niveles que se observan en el tejido isquémico sin reperfusión. Esta fase correspondería a la disminución que se observa en los niveles de expresión de ST2_s, mientras que la expresión de la isoforma transmembrana mantiene estable su concentración a fin de resolver el proceso inflamatorio y consolidar la cicatriz fibrótica.

Una vez analizados los diferentes patrones de expresión de ambas isoformas podemos inferir que la dinámica de estas sigue una tendencia similar al que se muestra en la Figura 24, donde la isoforma soluble ST2_s sería conductora y principal protagonista de la fase aguda, caracterizada por el proceso inflamatorio y la degradación de restos celulares necróticos y parte de la matriz celular, y la isoforma ST2_L como protagonista de la fase crónica, caracterizada por un ambiente anti-inflamatorio y de reparación de tejidos.

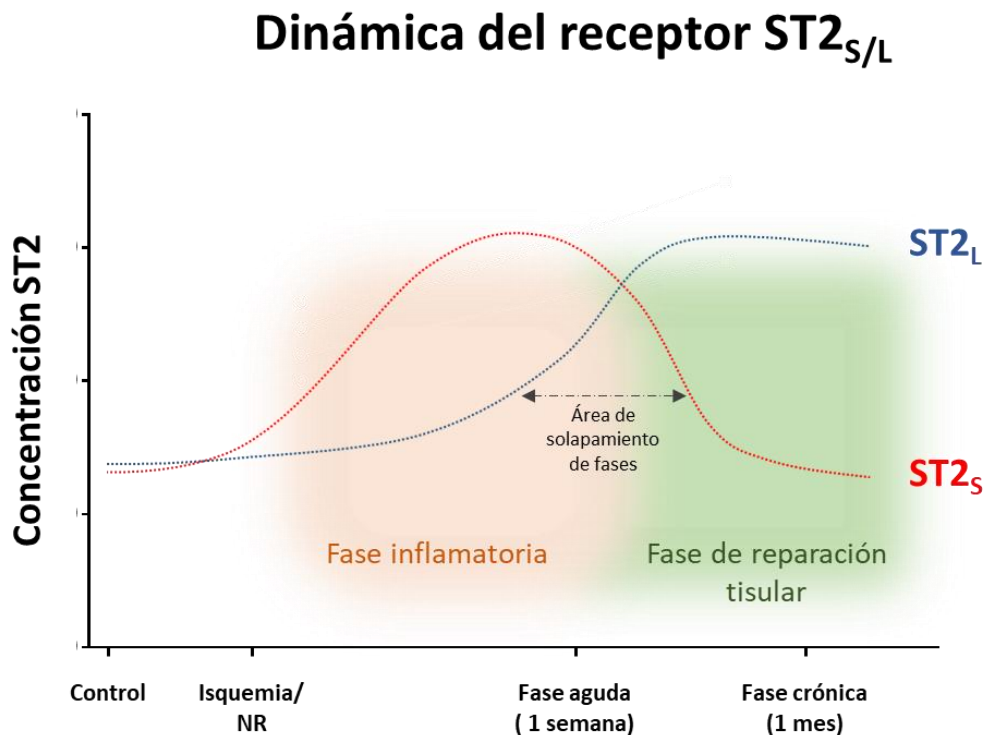


Figura 24. Dinámica de las dos isoformas del receptor ST2, inferida a partir de los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de concentración de cada una de ellas en el modelo clínico (ST2_s) y experimental porcino (ST2_L). En esta se muestra como la fase inflamatoria coincide con los niveles elevados de ST2_s, como existe un área de solapamiento en el que ambas isoformas establecen una relación competitiva por el sustrato, la IL-33, y como finalmente predomina la expresión de la isoforma ST2_L durante la fase crónica. NR: no reperfusión.

7.2.3. Caracterización de los tipos celulares

Una vez conocida la dinámica de expresión de las isoformas del receptor ST2, investigamos que tipos celulares son los responsables de la producción de la isoforma ST2_L, ya que, siendo el conductor de los procesos cardioprotectores que se han observado en diferentes estudios, consideramos un punto importante conocer el tipo celular diana de una posible aproximación terapéutica. En primer lugar, cabe destacar que el tiempo empleado en el proceso de puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia no nos permitió ahondar más en la expresión de los tipos celulares examinados, así como en otros de gran interés, de modo que el experimento se centró en los que, según la bibliografía revisada, parecían ser los principales productores de esta isoforma, como es el caso de las células endoteliales o los miofibroblastos, o bien por su importancia en el proceso, como es el caso de los linfocitos T.

Así pues, se diseñó el experimento de manera que pudiéramos medir no solo la proporción de células ST2_L+ total en cada fase (basal, aguda y crónica), sino también a que tipos celulares pertenecen, bien sean células endoteliales, linfocitos T o miofibroblastos. Dado que toda la población de células endoteliales, linfocitos T y miofibroblastos presentes en el tejido infartado, no tienen porque necesariamente expresar el marcador ST2_L en la membrana, también analizamos que porcentaje, dentro de cada tipo celular mencionado, era ST2_L+. Con todo ello pretendemos resolver las cuestiones que se plantean en el presente trabajado en cuanto a quienes son los principales productores de la isoforma ST2_L y en qué medida expresan dicho marcador.

De manera general e independiente del tipo celular concreto, hemos visto en la Figura 17 una relación creciente a través de las fases, en cuanto a porcentaje de células que se encuentran expresando este receptor en su membrana. Si tenemos en cuenta las imágenes anteriormente mostradas en la Figura 15, donde se mostraban con una tinción HE e inmunohistoquímica para el receptor de interés los tejidos del modelo experimental en las cuatro fases analizadas, se pudo apreciar como el número de infiltrados celulares en el área isquémica en fase aguda es mayor que en la fase crónica. Si cruzamos ambos

datos, observaremos que, en comparación con la fase aguda, en la fase crónica hay un menor número de células por campo, sin embargo, un mayor porcentaje de ellas se encuentran expresando este marcador en membrana, lo cual replica a la perfección los resultados obtenidos en la dinámica de la concentración de ST2_L en el tejido cardiaco que obtuvimos anteriormente, además de apoyar a la teoría que indica que la isoforma ST2_L parece tener un papel protagonista en el desarrollo de la fase crónica

- Células endoteliales:

Por lo que respecta a las células endoteliales, se ha demostrado que existe una expresión basal constitutiva de este receptor, tal y como se describía en diferentes trabajos previos^{11,16,17,20}, la cual aumenta drásticamente en las fases aguda y crónica. Mientras que en tejido control solo el 23% de las células endoteliales se encuentran expresando este receptor, en las fases aguda y crónica sufre un dramático aumento alcanzado hasta un 78% y 82% respectivamente, lo cual concuerda con la estimulación descrita anteriormente en estas células, donde ciertas citoquinas e interleucinas proinflamatorias liberadas tanto por la activación del sistema del complemento como por el resto de leucocitos, inducirían en este tipo celular una mayor producción de IL-33, la cual a su vez, induce una mayor transcripción de ST2_L.

Además de esto, para una correcta interpretación de los datos, debemos tener en cuenta la densidad celular, pues como comentábamos una mayor expresión del receptor en un tipo celular en concreto, no es necesariamente proporcional a la aportación de este en cada fase. Así pues, si tenemos en cuenta las densidades celulares de cada fase mencionadas con anterioridad y las cruzamos con el porcentaje de ellas que expresan el marcador en la superficie, podremos comprobar como en el tejido control encontramos un promedio de 109 células endoteliales ST2_L⁺/mm², 607 células endoteliales ST2_L⁺/mm² en la fase aguda y 589 células endoteliales ST2_L⁺/mm² en la fase crónica. Con estos datos, de nuevo se replican los resultados obtenidos en cuanto a la dinámica de la concentración de ST2_L hallada en el tejido cardiaco, reafirmando como se alcanza un valor máximo de su

concentración en la fase aguda y como se mantienen estos niveles en la fase crónica, con un pequeño descenso de su concentración.

- Linfocitos T:

En cuanto a los linfocitos T, cabe destacar que su estudio se centra en la fase aguda, ya que su concentración en el tejido control y en la fase crónica son insignificantes. Como pudimos comprobar, la presencia de estos linfocitos en el tejido era sorprendentemente baja, teniendo en cuenta que nos encontramos en el punto donde la respuesta inflamatoria es máxima. Sin embargo, al analizar los linfocitos presentes observamos que el 56% de estos expresaban el receptor ST2_L. Una posible explicación a este resultado reside en el periodo de solapamiento que encontramos entre las fases aguda y crónica, donde coetáneamente encontramos linfocitos Th1 y Th17 que no presentan expresión de este marcador^{27,54}, mediando la respuesta inflamatoria y de eliminación de los restos necróticos, propios de la fase aguda, y también linfocitos Th2 y Treg, los cuales presentan una expresión constitutiva de ST2_L^{25,26,28,29,54} y que se encontrarían mediando el proceso anti-inflamatorio y de reparación de tejidos, propios de la fase crónica. Con ello podríamos entender que aproximadamente la mitad de la población linfocitaria exprese este marcador en su superficie, sin embargo, esto pone de manifiesto la necesidad de ahondar más en la expresión de este marcador según las subpoblaciones linfocitarias. De nuevo, teniendo en cuenta la densidad celular de linfocitos en esta fase, encontramos un promedio de 170 linfocitos T ST2_L+/ mm^2 .

- Miofibroblastos:

Por lo que respecta a los miofibroblastos, su estudio se centra en la fase crónica. Dado que estos provienen de la diferenciación de fibroblastos, cuya finalidad en este proceso es la repoblación de la zona isquémica afectada a base de células con capacidad contráctil con el objetivo de recuperar la funcionalidad de este área, la presencia de este tipo celular en

los tejidos control y en fase aguda es muy baja. Como hemos visto, dentro de esta población encontramos que hasta un 85% se encuentra activamente expresando la isoforma ST_{2L} en esta fase. Pese a que la expresión del receptor bajo estudio en este tipo celular no ha sido ampliamente explorada, algunos artículos^{16,17} apuntan que el estrés podría inducir en estos una mayor expresión de esta isoforma transmembrana. No podemos descartar que esta expresión sea consecuencia de varios estímulos que actúan en sinergia, como podría ser el estrés al que es sometido el miocardio junto con ciertas citoquinas o interleucinas, sin embargo, podemos afirmar que, en la fase crónica ambos tipos celulares (células endoteliales y miofibroblastos) son conjuntamente los principales productores de ST_{2L}. En el tejido en fase crónica hallamos un promedio de 723 miofibroblastos ST_{2L}+ /mm², que junto al promedio de 589 células endoteliales ST_{2L}+ /mm² que encontramos en la fase crónica, respaldan la hipótesis de que ambos tipos celulares suponen el aporte principal de esta isoforma en la mencionada fase.

Por último, pese a que gracias al análisis de las densidades en las que se presentan los diferentes tipos celulares en cada fase ya nos ofrece una idea aproximada de cuál es su aportación a la concentración de ST_{2L}, en la Figura 22 se muestra de manera conjunta cual es la expresión de ST_{2L} total en el tejido infartado y dentro de estas células ST_{2L}+ a que tipos celulares pertenecen, bien sean células endoteliales, linfocitos T o miofibroblastos. En el tejido control el 23% de todas las células presentes se encuentran expresando este receptor y de estas, solo el 10% son células endoteliales. Si bien en diferentes artículos^{11,16,17,20} se pone de manifiesto que estas suponen posiblemente el aporte principal de esta isoforma, por los resultados obtenidos en el presente trabajo no podemos apoyar esta conclusión, lo que pone de manifiesto la necesidad de analizar la aportación de este receptor por parte de los diferentes tipos celulares que constituyen el 90% restante en el tejido control cardiaco.

En la fase aguda encontramos que el 39% de las células presentes expresan nuestro marcador de interés y de estas, el 30% son células endoteliales y el 14% linfocitos T. Teniendo en cuenta que el proceso inflamatorio que se desarrolla en esta fase va a actuar como un foco atrayente de un gran número de tipos celulares diferentes, la

representación por parte de las células endoteliales no es para nada despreciable y no descarta que sean las posibles principales productoras de ST2_L en esta fase. Si no poseen este papel como principal fuente de ST2_L en el tejido miocárdico en fase aguda, sería lógico pensar que al menos se encuentren entre las principales, pues al estar en contacto directo con el torrente sanguíneo facilitarían una rápida transmisión de las señales de peligro a otras células endoteliales y al resto de tipos celulares presentes en el tejido miocárdico. Por lo que respecta a los linfocitos T y teniendo en cuenta la poca concentración en la que se presentan estos, como podíamos ver en la Figura 20, el resultado obtenido guarda coherencia con lo observado, sin embargo, se hace evidente la necesidad de investigar dentro de la población linfocitaria quienes son los subtipos celulares responsables de esta producción.

Una vez alcanzada la fase crónica, observamos que el porcentaje de células ST2_L+ halladas en el tejido aumenta ligeramente hasta un 57%, constituido en un 32% por células endoteliales y en un 43% por miofibroblastos. La conclusión más interesante que podemos extraer de este resultado es que conjuntamente suponen hasta un 75% de la producción total que se da en el tejido, situando a ambos tipos celulares como los actores principales de los eventos anti-inflamatorios y de reparación que ocurren en esta fase crónica y como posibles tipos celulares diana de futuras aproximaciones terapéuticas.

8. Conclusión

1. En pacientes con IAMEST, el pico máximo de ST2_s se alcanza a las 24-96h tras la reperfusión coronaria, volviendo a valores basales de concentración pasado 1 mes tras esta.
2. Los niveles séricos elevados de la isoforma soluble ST2_s en pacientes con IAMEST, se asocian con una mayor probabilidad en el desarrollo de IC.
3. En el modelo experimental porcino la isoforma ST2_L alcanza su valor máximo a la semana tras la reperfusión y mantiene estos niveles de concentración hasta el primer mes tras esta.
4. La dinámica del receptor ST2 muestra una fase inflamatoria dirigida por su isoforma soluble ST2_s y una fase anti-inflamatoria y de reparación del tejido conducida por la isoforma transmembrana ST2_L.
5. Las células endoteliales se encuentran posiblemente entre las principales productoras de ST2_L durante la fase aguda (1 semana tras la reperfusión)
6. Las células endoteliales junto con los miofibroblastos suponen hasta el 75% de la producción total de ST2_L en la fase crónica (1mes tras al reperfusión)

9. Perspectivas futuras

Dada la importancia de las células linfocitarias en el cambio que ocurre de un ambiente proinflamatorio en la fase aguda a uno de reparación de tejidos en la fase crónica, es necesario continuar estudiando en mayor profundidad estas poblaciones, es por ello que paralelamente a este estudio y para una mejor comprensión de los procesos, se está evaluando mediante citometría de flujo la expresión de ST2_L atendiendo a los diferentes subtipos de linfocitos T como son los linfocitos Th1 y Th2 entre otros.

Conociendo la importancia de este receptor en el pronóstico y la regulación de los procesos que se desarrollan tras el IAM, otra posible aproximación futura de su estudio sería a través de la realización de un modelo experimental *Knock-out* para el gen ST2, que nos permita ver en el contexto del IAM como afecta a parámetros como el tamaño de infarto, la función cardíaca o la respuesta inflamatoria entre otros. También la administración exógena de IL-33 en diferentes tipos celulares, podría permitirnos medir ciertas moléculas de interés como citoquinas o interleucinas, amén de las propias isoformas del receptor ST2, para dilucidar la compleja regulación que posee este biomarcador y como responden los diferentes tipos celulares a estos estímulos.

10. Bibliografía

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. L. Anderson J, W. Campion E, A. Morrow D. Acute Myocardial Infarct. *N Engl J Med*. 2019. doi:10.1016/j.rcl.2018.08.006
3. Grant W R, Jeffrey E R, Christopher P C. Acute myocardial infarction. *J Am Med Assoc*. 2017. doi:10.1001/jama.1942.02830030066024
4. Jeffrey L. Anderson, M.D., and David A. Morrow MD, A. Acute Myocardial Infarction. *Tenside*. 2017;12(4):200-204. doi:10.1056/NEJMra1606915
5. <http://es.heart.erasmusnursing.net/content/1-0-anatomia-del-corazon/1-1-el-pericardio/>.
6. Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge. *Eur Heart J*. 2017. doi:10.1093/eurheartj/ehw224
7. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, et al. Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016. doi:10.1016/j.jacc.2016.01.073
8. Turner NA. Effects of interleukin-1 on cardiac fibroblast function: Relevance to post-myocardial infarction remodelling. *Vascul Pharmacol*. 2014. doi:10.1016/j.vph.2013.06.002
9. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2013. doi:10.1111/eci.12118
10. Knorr M, Münzel T, Wenzel P. Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction. *Front Physiol*. 2014. doi:10.3389/fphys.2014.00295
11. Miller AM, Xu D, Asquith DL, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008. doi:10.1084/jem.20071868
12. Seropian IM, Toldo S, Van Tassell BW, Abbate A. Anti-Inflammatory Strategies for Ventricular Remodeling Following ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014. doi:10.1016/j.jacc.2014.01.014
13. Li J, Shen D, Tang J, et al. IL-33 attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction through inducing alternatively activated macrophages ethical standards statement. *Eur J Pharmacol*. 2019. doi:10.1016/j.ejphar.2019.04.046

14. Tseng CCS, Huibers MMH, van Kuik J, de Weger RA, Vink A, de Jonge N. The Interleukin-33/ST2 Pathway Is Expressed in the Failing Human Heart and Associated with Pro-fibrotic Remodeling of the Myocardium. *J Cardiovasc Transl Res*. 2018. doi:10.1007/s12265-017-9775-8
15. Carrick D, Haig C, Rauhalampi S, et al. Pathophysiology of LV Remodeling in Survivors of STEMI. *J Am Coll Cardiol*. 2015. doi:10.1016/j.jcmg.2015.03.007
16. Pascual-figal DA, Januzzi JL. The Biology of ST2 : The International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol*. 2015. doi:10.1016/j.amjcard.2015.01.034
17. Demyanets S, Kaun C, Pentz R, et al. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *J Mol Cell Cardiol*. 2013. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.03.020
18. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-kosaka A, et al. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem*. 1999.
19. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, et al. IL-1 Receptor Accessory Protein and ST2 Comprise the IL-33 Receptor Complex. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2551
20. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev*. 2008. doi:10.1038/nrd2660
21. Moritz DR, Rodewald H, Klemenz R. The IL-1 Receptor-Related T1 Antigen Is Expressed on Immature and Mature Mast Cells and on Fetal Blood Mast Cell Progenitors. *J Immunol*. 2019.
22. Bandara G, Beaven MA, Olivera A, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33. *Eur J Immunol*. 2016. doi:10.1002/eji.201545501.Activated
23. Wang J, Kaieda S, Ameri S, Fishgal N, Dwyer D, Dellinger A. IL-33/ST2 axis promotes mast cell survival via BCLXL. *PNAS*. 2014. doi:10.1073/pnas.1404182111
24. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting Edge: The ST2 Ligand IL-33 Potently Activates and Drives Maturation of Human Mast Cells. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2051
25. LÖHNING M, STROEHMANN A, COYLE AJ, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. 1998.

26. Xu D, Chan WL, Leung BP, et al. Selective Expression of a Stable Cell Surface Molecule on Type 2 but Not Type 1 Helper T Cells. *J Exp Med*. 1998.
27. Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, Li W. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2016. doi:10.1126/scitranslmed.aab0166.ST2
28. Matta BM, Reichenbach DK, Zhang X, et al. Peri-alloHCT IL-33 administration expands recipient T-regulatory cells that protect mice against acute GVHD. *Blood*. 2019. doi:10.1182/blood-2015-12-684142.
29. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, et al. The Alarmin IL-33 Promotes Regulatory T Cell Function in the Intestine. *Nature*. 2015. doi:10.1038/nature13577.The
30. Komai-koma M, Gilchrist DS, Andrew NJ, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 Activates B1 Cells and Exacerbates Contact Sensitivity. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.1002103
31. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen- reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol*. 2008. doi:10.1093/intimm/dxn060
32. Bourgeois E, Van LP, Samson M, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-g production. *Eur J Immunol*. 2009. doi:10.1002/eji.200838575
33. Brett Cherry W, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A NOVEL IL-1 FAMILY CYTOKINE, IL-33, POTENTLY ACTIVATES HUMAN EOSINOPHILS. *J Allergy Clin Immunol*. 2010. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.005.A
34. Turnquist HR, Sumpter TL, Tsung A, et al. IL-1 β -Driven ST2L Expression Promotes Maturation Resistance in Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.181.1.62
35. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-ACTIVATED DENDRITIC CELLS INDUCE AN ATYPICAL TH2- TYPE RESPONSE. *J Allergy Clin Immunol*. 2010. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.026.IL-33-ACTIVATED
36. Suzukawa M, Ikura M, Koketsu R, et al. An IL-1 Cytokine Member, IL-33, Induces Human Basophil Activation via Its ST2 Receptor. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.181.9.5981
37. Alves-filho JC, Sônego F, Souto FO, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010. doi:10.1038/nm.2156

38. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. Interleukin 33 as a Mechanically Responsive Cytokine Secreted by Living Cells. *J Biol Chem*. 2012. doi:10.1074/jbc.M111.298703
39. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
40. Küchler AM, Polheimer J, Balogh J, et al. Nuclear Interleukin-33 Is Generally Expressed in Resting Endothelium but Rapidly Lost upon Angiogenic or Proinflammatory Activation. *Am J Pathol*. 2008. doi:10.2353/ajpath.2008.080014
41. Moussion C, Ortega N, Girard J. The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo : A Novel 'Alarmin'? *PLoS One*. 2008. doi:10.1371/journal.pone.0003331
42. Carriere V, Roussel L, Ortega N, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *PNAS*. 2007.
43. 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. doi:10.1172/JCI30634.1538
44. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm*. 2011. doi:10.1186/1476-9255-8-22
45. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, Mckenzie ANJ. T1/ST2-deficient Mice Demonstrate the Importance of T1/ST2 in Developing Primary T Helper Cell Type 2 Responses. *J Exp Med*. 2000.
46. Xu H, Turnquist HR, Hoffman R, Billiar TR. Role of the IL-33-ST2 axis in sepsis. *Mil Med Res*. 2017. doi:10.1186/s40779-017-0115-8
47. Anderson J, Seol H, Gordish-Dressman H, et al. Interleukin 1 Receptor-Like 1 Protein (ST2) is a Potential Biomarker for Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Cardiol*. 2017;38(8):1606-1612. doi:10.1007/s00246-017-1703-9
48. Papińska-goryca M, Nejman-gryz P, Proboszcz M, Kwiecień I, Hermanowicz-salamon J, Grabczak EM. Expression of TSLP and IL-33 receptors on sputum macrophages of asthma patients and healthy subjects. *J Asthma*. 2018. doi:10.1080/02770903.2018.1543435
49. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, et al. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(3):598-605. doi:10.1136/ard.2009.119321

50. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 Blocks Interleukin-33 Signaling in Allergic Airway Inflammation. *J Biol Chem*. 2007. doi:10.1074/jbc.M704916200
51. Lin J, Zhang L, Zhao G, Su Z, Deng R, Pflugfelder SC. A Novel Interleukin 33/ST2 Signaling Regulates Inflammatory Response in Human Corneal Epithelium. *PLoS Genet*. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0060963
52. Cui G, Ren J, Xu G, Li Z, Zheng W, Yuan A. Cellular and clinicopathological features of the IL - 33 / ST2 axis in human esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Cell Int*. 2018. doi:10.1186/s12935-018-0700-2
53. Gao Q, Li Y, Li M. The potential role of IL-33 / ST2 signaling in fibrotic diseases. *J of Leukocyte Biol*. 2015. doi:10.1189/jlb.3RU0115-012R
54. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/iL-33 Axis in immune Cells during inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.00475
55. Demyanets S, Konya V, Kastl SP, et al. Interleukin-33 Induces Expression of Adhesion Molecules and Inflammatory Activation in Human Endothelial Cells and in Human Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011. doi:10.1161/ATVBAHA.111.231431
56. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple Facets of NF-kB in the Heart To Be or Not to NF-kB. *Circulation*. 2011. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226928
57. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, et al. Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling. *Circulation*. 2009. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.873240
58. Ruisong M, Xiaorong H, Gangying H, Chunfeng Y, Changjiang Z. The Protective Role of Interleukin-33 in Myocardial Ischemia and Reperfusion Is Associated with Decreased HMGB1 Expression and Up-Regulation of the P38 MAPK Signaling Pathway. *PLoS One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0143064
59. Sánchez-Más J, Lax A, Asensio-López M del C, et al. Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: Correlation with cardiac remodelling markers. *Eur J Clin Invest*. 2014. doi:10.1111/eci.12282
60. Grabow N, Kramer S, Schmitz K. Mechanical Properties of Laser Cut Poly (L-Lactide) Micro-Specimens : Implications for Stent Design , Manufacture , and Sterilization. 2016;127(February 2005):25-31. doi:10.1115/1.1835349

61. Jenkins WS, Roger VL, Jaffe AS, et al. Prognostic Value of Soluble ST2 after Myocardial Infarction: A Community Perspective. *Am J Med*. 2017. doi:10.1016/j.amjmed.2017.02.034
62. Kurowska-stolarska M, Stolarski B, Murphy G, et al. IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.0901575
63. Fathil MFM, Arshad MK, Gopinath SCB, et al. Diagnostics on acute myocardial infarction : Cardiac troponin biomarkers. *Biosens Bioelectron*. 2015. doi:10.1016/j.bios.2015.03.037
64. Miñana G, Núñez J, Bayés-Genís A, et al. ST2 and left ventricular remodeling after ST-segment elevation myocardial infarction: A cardiac magnetic resonance study. *Int J Cardiol*. 2018. doi:10.1016/j.ijcard.2018.06.073
65. Gonzalo-calvo D De, Cediel G, Bär C, et al. Circulating miR-1254 predicts ventricular remodeling in patients with ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: A cardiovascular magnetic resonance study. *Sci Rep*. 2018. doi:10.1038/s41598-018-33491-y
66. Marie A, Kuster N, Curinier C, et al. Exploring collagen remodeling and regulation as prognosis biomarkers in stable heart failure. *Clin Chim Acta*. 2019. doi:10.1016/j.cca.2018.08.042
67. Bhat P, Tang WHW. Biomarkers to Assess and Guide the Management of Heart Failure. In: *Biomarkers in Cardiovascular Disease*. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/B978-0-323-54835-9.00009-0
68. Maciejak A, Kostarska-srokosz E, Gierlak W, et al. Circulating miR-30a-5p as a prognostic biomarker of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Sci Rep*. 2018. doi:10.1038/s41598-018-28118-1
69. Caporali A, Meloni M, Miller AM, et al. Soluble ST2 Is Regulated by p75 Neurotrophin Receptor and Predicts Mortality in Diabetic Patients With Critical Limb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300497
70. Bière L, Garcia G, Guillou S, Larcher F, Furber A, Willoteaux S. ST2 as a predictor of late ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2018. doi:10.1016/j.ijcard.2018.02.058
71. Ríos-Navarro C, Hueso L, Miñana G, et al. Coronary Serum Obtained After Myocardial Infarction Induces Angiogenesis and Microvascular Obstruction Repair. Role of Hypoxia-inducible Factor-1A. *Rev Esp Cardiol*. 2018;71(6):440-449. doi:10.1016/j.recesp.2017.06.024
72. Lu AU, Cullen SP, Mcneela EA, et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity*. 2009. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.007

73. Cayrol C, Girard J. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *PNAS*. 2009.
74. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, et al. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002.
doi:10.1161/01.CIR.0000038705.69871.D9
75. Larroza A, Materka A, López-Lereu MP, Monmeneu J V., Bodí V, Moratal D. Differentiation between acute and chronic myocardial infarction by means of texture analysis of late gadolinium enhancement and cine cardiac magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol*. 2017;92(January):78-83.
doi:10.1016/j.ejrad.2017.04.024
76. Weir RAP, Miller AM, Murphy GEJ, et al. Serum Soluble ST2: A Potential Novel Mediator in Left Ventricular and Infarct Remodeling After Acute Myocardial Infar. *JAC*. 2010.
doi:10.1016/j.jacc.2009.08.047

11. Anexo I

11.1. Protocolo técnica inmunohistoquímica

-Desparafinación e hidratación de muestras:

Mantener los cortes en una estufa a 60°C durante 20 minutos

Sumergir los cortes en una cubeta con xilol durante 20 minutos

-Pasar los cortes por un tren hidratante (xilol → OH)

-Lavar con agua del grifo y agua destilada

-Desenmascaramiento antigénico

A) Desenmascaramiento por calor

Sumergir los cortes en solución pH low/high (en función del anticuerpo).

Introducir la cubeta con los cortes en un autoclave y llevarlo a 121°C y 1,5 bar de presión

Una vez alcanzada la temperatura y presión adecuada, esperar 3 minutos antes de apagar la máquina.

Dejar enfriar al baño maría

Lavar con agua del grifo, agua destilada y TBS

B) Desenmascaramiento enzimático

Preparar solución de proteinasa (1mg/ml)

Incubar los cortes con la solución de proteinasa durante 10 minutos a Tª ambiente

Lavar con agua del grifo, agua destilada y TBS

-Delimitar la muestra con un marcador siliconado (Sigmacote)

-Incubar los cortes con solución de bloqueo de endoperoxidasa (metanol 3% de H₂O₂) durante 10 minutos a Tª ambiente

-Lavar con TBS

- Agregar el anticuerpo (Ac) primario diluido en Common Antibody diluent e incubar durante 1 hora a T^a ambiente
- Lavar con TBS
- Agregar Ac secundario diluido en Common Antibody diluent e incubar 30 minutos a T^a ambiente
- Lavar con TBS y agua destilada
- Revelar incubando los cortes con el cromógeno un tiempo máximo de 10 minutos a T^a ambiente
- Lavar con agua destilada
- Contratinción incubando los cortes con hematoxilina durante 4 minutos
- Lavar con agua del grifo y agua destilada
- Deshidratar muestras pasando los cortes por un tren deshidratante (OH→Xilol)
- Montar los cristales con medio de montaje y cubreobjetos

11.2. Protocolo técnica de inmunofluorescencia

- Desparafinación e hidratación de muestras:

Mantener los cortes en una estufa a 60°C durante 30 minutos

Sumergir los cortes en una cubeta con xilol durante 30 minutos

- Pasar los cortes por un tren hidratante (xilol→ OH)

- Lavar con agua del grifo y agua destilada

- Desenmascaramiento antigénico

A) Desenmascaramiento por calor

Sumergir los cortes en solución pH low/high (en función del anticuerpo).

Introducir la cubeta con los cortes en un autoclave y llevarlo a 121°C y 1,5 bar de presión

Una vez alcanzada la temperatura y presión adecuada, esperar 3 minutos antes de apagar la máquina.

Dejar enfriar al baño maría

Lavar con agua del grifo, agua destilada y TBS

B) Desenmascaramiento enzimático

Preparar solución de proteinasa (1mg/ml)

Incubar los cortes con la solución de proteinasa durante 10 minutos a Tª ambiente

Lavar con agua del grifo, agua destilada y TBS

-Delimitar la muestra con un marcador siliconado (Sigmacote)

-Incubar los cortes con solución de bloqueo de endoperoxidasa (metanol 3% de H₂O₂) durante 20 minutos a Tª ambiente

-Lavar con TBS

-Agregar anticuerpo (Ac) primario diluido en *Common Antibody diluent* e incubar durante 24h en nevera a 4°C (a partir de este paso realizar en oscuridad)

-Lavar con TBS

-Agregar Ac secundario diluido en *Common Antibody diluent* e incubar 2 horas a Tª ambiente

-Lavar con TBS y agua destilada

-Montar los cristales con medio de montaje acuoso *Slowfade antifade reagent with DAPI*, cubrir con el cubreobjetos y sellar