

Elsevier Editorial System(tm) for Revista

Clínica Española

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Ausencia de implicación de la cistatina C en el remodelado ventricular y la insuficiencia cardiaca. Lack of involvement of Cistatyn C in ventricular remodeling and heart failure

Article Type: Original

Keywords: Insuficiencia cardiaca; cistatina C; remodelado ventricular; remodelado cardiaco; productos genes de mantenimiento; proteasas ricas en cisteína

Heart failure; Cystatin C; Left ventricle remodeling; Heart remodeling; Housekeeping gene products; Cysteine proteases.

Corresponding Author: Prof. Juan Ignacio Pérez-Calvo, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Hospital Clínico Universitario

First Author: Juan Ignacio Pérez-Calvo, MD, PhD

Order of Authors: Juan Ignacio Pérez-Calvo, MD, PhD; Tomás Castiella-Muruzábal, MD, PhD; Marina Búcar-Barjud; Claudia Josa-Laorden; Marta Sánchez-Marteles; Isaac Lacambra-Blasco; Mari C Asensio-López; Domingo A Pascual-Figal, MD, PhD

Abstract: La cistatina C (CisC) es una proteasa codificada por genes de mantenimiento ("housekeeping genes"). Aunque su valor pronóstico en la insuficiencia cardiaca (IC) es bien conocido, se debate si es debido a su mayor precisión en la estimación del filtrado glomerular, o está implicada en el remodelado ventricular patológico. El propósito del estudio fue comprobar si la expresión de la CisC se modificaba en el miocardio de fetos de diferentes edades y en el de adultos con diversas enfermedades cardiovasculares. Así mismo analizar la correlación entre sus concentraciones séricas y la estructura y morfología cardiaca en un grupo de pacientes con IC.

Pacientes y métodos: se analizaron las correlaciones (test de Pearson y Spearman) de la CisC sérica y los parámetros ecocardiográficos de 351 pacientes con IC. También se realizó una tinción inmunohistoquímica para CisC, metaloproteínasa 9 (MMP-9) y desmina en 9 muestras de tejido cardiaco procedentes de autopsia de 4 fetos con diferente edad gestacional y 5 adultos sanos o con enfermedad cardiovascular.

Resultados: en pacientes con IC no se encontró correlación entre las concentraciones de CisC y los parámetros cardiacos medidos por ecocardiografía 2D. La inmunohistoquímica mostró en todos los casos una débil tinción de fondo para CisC en todas las muestras, independientemente de la edad y la presencia o no de enfermedades cardiovasculares.

Conclusiones: nuestros resultados sugieren que la CisC no tiene un papel significativo en el remodelado patológico del ventrículo izquierdo en la IC.

Background: Cystatin C is a product of housekeeping genes with antiprotease activity. Its role as a prognostic factor in heart failure (HF) is well known. It is debatable whether this is related solely to its accuracy in measuring renal function or whether it is actually involved in heart remodeling.

Aim: To see left-ventricle CysC expression at different fetal ages and stages of cardiovascular disease in adults. We also aimed to correlate serum concentrations of CysC with heart structure in HF patients.

Design: Cross-sectional study aimed at discovering association between serum CysC concentration and structural parameters in HF. In a separate non-related cohort we performed a descriptive study of the immunohistochemical staining pattern of CysC in several samples of healthy and unhealthy hearts.

Methods: We analyzed the correlations (Pearson and Spearman tests) between serum CysC and 2D echocardiographic structural and functional parameters among 351 patients admitted for acute HF (clinical cohort). We also performed an immunohistochemical staining for CysC, MMP-9 and Desmin in left-ventricle samples obtained from autopsies of fetuses and adult subjects (without heart disease, with LV hypertrophy or with HF).

Results: In the clinical cohort no correlation was found between either functional or structural parameters of the heart and serum CysC. In immunohistochemical staining, all cardiomyocytes had weak expression of Cystatin C. This pattern was similar in all fetal and adult samples, irrespective of age and cardiovascular health status.

Conclusions: Our data suggest that CysC has not an actual role in LV remodeling or HF progression.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

1 Abstract

2
3 La cistatina C (CisC) es una proteasa codificada por genes de mantenimiento
4 (*“housekeeping genes”*). Aunque su valor pronóstico en la insuficiencia cardiaca (IC)
5
6 (*“housekeeping genes”*). Aunque su valor pronóstico en la insuficiencia cardiaca (IC)
7
8 es bien conocido, se debate si es debido a su mayor precisión en la estimación del
9
10 filtrado glomerular, o está implicada en el remodelado ventricular patológico. El
11
12 propósito del estudio fue comprobar si la expresión de la CisC se modificaba en el
13
14 miocardio de fetos de diferentes edades y en el de adultos con diversas
15
16 enfermedades cardiovasculares. Así mismo analizar la correlación entre sus
17
18 concentraciones séricas y la estructura y morfología cardiaca en un grupo de
19
20 pacientes con IC.
21

22
23 Pacientes y métodos: se analizaron las correlaciones (test de Pearson y Spearman) de
24
25 la CisC sérica y los parámetros ecocardiográficos de 351 pacientes con IC. También se
26
27 realizó una tinción inmunohistoquímica para CisC, metaloproteinasa 9 (MMP-9) y
28
29 desmina en 9 muestras de tejido cardiaco procedentes de autopsia de 4 fetos con
30
31 diferente edad gestacional y 5 adultos sanos o con enfermedad cardiovascular.
32
33

34
35 Resultados: en pacientes con IC no se encontró correlación entre las concentraciones
36
37 de CisC y los parámetros cardiacos medidos por ecocardiografía 2D. La
38
39 inmunohistoquímica mostró en todos los casos una débil tinción de fondo para CisC
40
41 en todas las muestras, independientemente de la edad y la presencia o no de
42
43 enfermedades cardiovasculares.
44

45
46 Conclusiones: nuestros resultados sugieren que la CisC no tiene un papel significativo
47
48 en el remodelado patológico del ventrículo izquierdo en la IC.
49

50
51
52
53
54
55 Structured abstract

56
57 Background: Cystatin C is a product of housekeeping genes with antiprotease
58
59 activity. Its role as a prognostic factor in heart failure (HF) is well known. It is
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

debatable whether this is related solely to its accuracy in measuring renal function or whether it is actually involved in heart remodeling.

Aim: To see left-ventricle CysC expression at different fetal ages and stages of cardiovascular disease in adults. We also aimed to correlate serum concentrations of CysC with heart structure in HF patients.

Design: Cross-sectional study aimed at discovering association between serum CysC concentration and structural parameters in HF. In a separate non-related cohort we performed a descriptive study of the immunohistochemical staining pattern of CysC in several samples of healthy and unhealthy hearts.

Methods: We analyzed the correlations (Pearson and Spearman tests) between serum CysC and 2D echocardiographic structural and functional parameters among 351 patients admitted for acute HF (clinical cohort). We also performed an immunohistochemical staining for CysC, MMP-9 and Desmin in left-ventricle samples obtained from autopsies of fetuses and adult subjects (without heart disease, with LV hypertrophy or with HF).

Results: In the clinical cohort no correlation was found between either functional or structural parameters of the heart and serum CysC. In immunohistochemical staining, all cardiomyocytes had weak expression of Cystatin C. This pattern was similar in all fetal and adult samples, irrespective of age and cardiovascular health status.

Conclusions: Our data suggest that CysC has not an actual role in LV remodeling or HF progression.

Key words:

Heart failure; Cystatin C; Left ventricle remodeling; Heart remodeling; Housekeeping gene products; Cysteine proteases.

Introducción

1
2 La cistatina C (CisC) es una proteasa inhibidora de proteasas ricas en cisteína,
3
4 ampliamente distribuida en fluidos biológicos humanos ¹. Es una proteína de bajo
5
6 peso molecular, formada por 120 aminoácidos en una cadena única. Se sintetiza
7
8 como preproteína y emite un péptido señal representativo de su función
9
10 extracelular². El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 20³ y pertenece a
11
12 los denominados genes de mantenimiento (“*housekeeping genes*”). Por ello, no
13
14 existe una expresión específica en ningún tejido, sino que su distribución es ubicua
15
16 que se expresa en el riñón, hígado, páncreas, intestino, estómago, pulmón, placenta
17
18 y vesículas seminales⁴. La función fisiológica principal de la CisC es la regulación de
19
20 la actividad de las cisteín-proteasas extracelulares^{5,6}. Gracias a su participación en el
21
22 equilibrio entre proteasas y antiproteasas, se ha sugerido que la CisC está implicada
23
24 en el remodelado tisular⁷, la arterioesclerosis y aneurismas de la aorta⁸ y la
25
26 hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI)⁹ y, en consecuencia, en la patogenia de la
27
28 insuficiencia cardiaca (IC)^{10,11}.

29
30 La CisC se comporta como un factor pronóstico relacionado inversamente con la
31
32 calidad del envejecimiento¹² y directamente, en la población general, con la
33
34 aparición de eventos cardiovasculares¹³ y la incidencia de IC¹⁴⁻¹⁶. Entre quienes ya
35
36 sufren una IC, la CisC es un marcador pronóstico robusto de mortalidad, tanto en la
37
38 IC aguda¹⁷⁻¹⁹, como crónica²⁰, independiente de la fracción de eyección (FE)²¹. Se
39
40 desconoce si su capacidad pronóstica es debida a su implicación en el remodelado
41
42 ventricular, tal y como sugiere Pate et al.¹⁰; o a su mayor precisión en la estimación
43
44 del filtrado glomerular (FG)²², cuya capacidad pronóstica en la IC es bien conocida²³.
45
46 El presente estudio se diseñó para analizar si existen cambios en la tinción de CisC en
47
48 el miocardio ventricular dependientes de la edad y el estado de salud cardiovascular
49
50 y, en segundo lugar, si las concentraciones plasmáticas de CisC guardan alguna
51
52 relación con las modificaciones estructurales del corazón en la IC ya establecida.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 Pacientes y métodos
3

4 Se estudiaron dos grupos de pacientes no relacionados entre si.
5

6 1) Análisis de CisC en el tejido miocárdico:
7

8 Se seleccionaron 9 muestras de tejido miocárdico obtenido de autopsias clínicas
9 (Tabla 1) sobre las que se realizó una tinción inmunohistoquímica para CisC,
10 metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) y desmina. Se pretendía comparar de modo
11 cualitativo la expresión miocárdica de la CisC, con una proteína de expresión
12 obligada (desmina) y otra de expresión variable (MMP9).
13
14
15
16
17
18
19

20 Se seleccionaron 4 muestras fetales con diferente edad gestacional y 5 de adultos sin
21 enfermedad estructural cardíaca conocida (3 pacientes) o de pacientes con
22 antecedentes de enfermedad cardíaca (2 pacientes), hallazgos confirmados en la
23 autopsia. Se pretendía valorar posibles cambios dependientes del desarrollo
24 evolutivo, de la edad, y las enfermedades subyacentes, ya que la expresión de los
25 genes de mantenimiento es muy constante e independiente.
26
27
28
29
30
31
32

33 Las muestras estaban fijadas en formalina y embebidas en una mezcla de cera y
34 parafina. Se tallaron secciones de 3 µm que se colocaron sobre placas de cristal
35 cubiertas de poly-L-lisina. Las secciones se desparafinizaron y pre-trataron con
36 solución Dako-PT-Link ® durante 20 minutos a 97°C, empleando una solución de
37 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH ® (Dako, Denmark). La
38 inmunotinción, propiamente, se realizó con EnVision ® FLEX+ (Dako), según
39 recomendaciones del fabricante. Previo enfriamiento de la peroxidasa endógena, las
40 secciones se incubaron durante 30 minutos con un anticuerpo primario para la
41 proteína seleccionada a temperatura ambiente. Para la desmina se utilizó un
42 anticuerpo monoclonal (Clone D33, solución 1:100). Para la MMP9 se usó un
43 anticuerpo policlonal (ab3898, 1:100), ambos de Dako y Abcam (Cambridge, MA,
44 Estados Unidos de América) respectivamente. Para la CisC se utilizaron anticuerpos
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 de Novus Biologicals (Cambridge, Reino Unido) (Cystatin C Antibody 2C8). Tras la
2 incubación con el anticuerpo primario las secciones se incubaron con el anticuerpo
3 secundario seguido de la exposición al complejo estreptavidina-biotina y
4 diaminobenzidina.
5
6
7
8
9

10 2) Análisis de la relación entre CisC sérica y la estructura cardíaca.

11 Se analizó una cohorte de pacientes consecutivamente ingresados por una
12 descompensación aguda de su IC. Se midieron las concentraciones séricas de CisC
13 durante las primeras 48 horas tras el ingreso y se realizó un estudio ecocardiográfico
14 bidimensional. Los pacientes fueron seleccionados en el Servicio de Medicina Interna
15 del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) y dieron su consentimiento
16 para el estudio, que había sido aprobado por el Comité de Ética de Aragón (PI10/038).
17 Se consideró como agudización de la IC al inicio gradual o rápido de signos y síntomas
18 de IC que requirieron un ingreso hospitalario no planificado. Se incluyeron tanto
19 pacientes con IC “de novo”, como aquellos con IC crónica descompensada²⁴. Para
20 asegurar el diagnóstico de IC, especialmente en pacientes con FE preservada, solo se
21 incluyeron si la concentración sérica del fragmento amino terminal del propéptido
22 natriurético cerebral (NT-proBNP) fue superior a 900 pg/mL²⁵.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 La ecocardiografía se realizó según los protocolos estándar de acuerdo a las guías²⁶
41 por un cardiólogo experto que desconocía los datos clínicos y analíticos de los
42 pacientes.
43
44
45

46 La determinación de CisC y NT-proBNP se realizó en el laboratorio de Bioquímica
47 Clínica del HCULB con un analizador BN ProSpec (Dade Behring GmbH, Liederbach,
48 Alemania) y un equipo Modular Analytics E170 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
49 Alemania), respectivamente, siguiendo las especificaciones de los fabricantes.
50
51
52
53
54
55
56
57

58 Análisis estadístico.
59
60
61
62
63
64
65

1 Para las variables cualitativas se midió la dispersión y la tendencia central (media y
2 desviación estándar o mediana y rango intercuartílico, según la distribución fuera
3 normal o no). Para el análisis bivalente se empleó el test del Chicuadrado; para los
4 análisis de asociación entre variables cualitativas se aplicó el test exacto de Fisher.
5
6 Para variables cuantitativas se aplicó la t de Student, el test de ANOVA y el de Mann-
7
8
9 Whitney o el de Kruskal-Wallis. Para las correlaciones, los test de Spearman o
10
11 Pearson si la distribución era normal. Se consideraron significativos los valores de $p <$
12
13 0,05. Se empleo el software Statistical Package Social Sciences (SPSS 20.0).
14
15
16

17 Resultados

20 1) Inmunohistoquímica miocárdica (Fig. 1)

21 Al contrario que las muestras de tejido procedentes de los adultos, las fetales
22 mostraban una mayor riqueza celular y un patrón estructural desordenado. La débil
23 expresión de la desmina en el miocardio fetal se explica por un estadio de desarrollo
24 sarcomérico todavía temprano (Figura 1, Panel B). En los tejidos adultos la desmina
25 fue positiva en todas las muestras, mostrando una estriación transversal
26 correspondiente a discos intercalares (Figura 1, Panel C). La MMP9 mostró una
27 inmunotinción similar en las muestras fetales (Figura 1, Panel D) y en las de adultos
28 (Figura 1, Panel E). Se encontraron algunas células intersticiales que captaron
29 pigmento pero la tinción fue negativa para MMP9. Todos los cardiomiocitos, fetales
30 (Figura 1, Panel F) y adultos (Figura 1, Panel G), mostraron una tinción débil y difusa
31 para la CisC independientemente de la edad fetal y del estado de salud de los
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

51 2) Relación entre CisC sérica y estructura cardiaca.

52 Se estudiaron 351 pacientes, 245 (73%) con IC con FE preservada (ICFEp) y 102 (27%)
53
54 IC con FE reducida (ICFEr). Las características clínicas de la cohorte se muestran en
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 La correlación entre las concentraciones séricas de CisC y los principales parámetros
2 estructurales obtenidos por ecocardiografía se muestran en la Tabla 3. No se
3
4 encontró ninguna correlación significativa entre la CisC y los hallazgos
5
6 ecocardiográficos.
7

8 Aunque no fue el propósito del estudio, se analizó la información pronóstica ofrecida
9
10 por la CisC sérica y su correlación con el FG estimado por la fórmula de MDRD-4
11
12 (*“Modification Diet in Renal Diseases formula”*, basada en 4 parámetros). La
13
14 concentración de CisC tuvo una correlación directa con la mortalidad por cualquier
15
16 causa a un año y con el FG estimado.
17
18
19
20
21

22 Discusión

23
24 Nuestros resultados muestran que la CisC no cambia su patrón de expresión en el
25
26 miocardio ventricular en distintas etapas de desarrollo fetal, ni en el adulto en
27
28 función de su estado de salud cardiovascular. La tinción inmunohitoquímica de la
29
30 CisC, débil y generalizada en todas las muestras miocárdicas analizadas, sugiere que
31
32 esta proteasa se sintetiza de modo constitutivo, no inducido, y se secreta al torrente
33
34 circulatorio. Este patrón está en consonancia con las acciones biológicas de la CisC,
35
36 fundamentalmente extracelulares^{1,2}. El hecho de que la tinción de CisC en muestras
37
38 de miocardio ventricular de pacientes con hipertrofia del VI, o con IC, no denoten
39
40 cambios en la distribución, sugiere que la CisC no está involucrada en la progresión
41
42 de la hipertensión hacia la IC. Aunque la cohorte clínica analizada no tenía relación
43
44 con los pacientes de los que se analizaron muestras tisulares, la ausencia de
45
46 correlación entre las concentraciones de CisC sérica y la estructura cardíaca también
47
48 debe ser interpretada en este contexto. La CisC no se relaciona con las anomalías
49
50 morfológicas cardíacas, medidas por ecocardiografía, en la etapa evolutiva final del
51
52 remodelado cardíaco, es decir en presencia de IC. Sin embargo las concentraciones
53
54 de CisC tienen un valor pronóstico incuestionable en la IC^{10,11,14-22}. Por su pequeño
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 tamaño molecular y carga eléctrica, la CisC se filtra libremente en el glomérulo y se
2 cataboliza en el túbulo contorneado proximal, sin sufrir ulteriores modificaciones,
3 como ocurre con la urea o la creatinina¹¹. Estas razones hacen que la CisC sea
4 particularmente precisa en la estimación del FG en la disfunción renal con
5 aclaramientos entre 40 y 60 ml/min., márgenes en los que la creatinina proporciona
6 estimaciones de FG muy poco precisas. De hecho la estimación del riesgo de muerte
7 en pacientes con IC y estos rangos de FG mejora y permite reclasificar a
8 los pacientes de modo más preciso incluyendo la CisC en las fórmulas de
9 estimación^{22,27}.

10 La posibilidad de que la CisC esté implicada en etapas precoces del remodelado
11 cardiaco surge de los resultados de una cohorte poblacional del Dallas Heart Study¹⁰.
12 En ella se estudio mediante resonancia magnética cardiaca una población de 2548
13 sujetos no seleccionados y se encontró una relación lineal entre las concentraciones
14 séricas de esta proteasa, el espesor de la pared posterior del VI y el cociente entre la
15 masa y el volumen telediastólico del VI, un parámetro novedoso al que los autores
16 denominaron “concentricidad” cardiaca. Los autores sugieren que la CisC sería un
17 parámetro útil para identificar individuos con alteraciones preclínicas en la
18 estructura cardiaca, concretamente con un fenotipo específico de hipertrofia VI
19 concéntrica que, de acuerdo con su hipótesis, precedería en años a la aparición de
20 disfunción diastólica o IC¹⁰. En algunos estudios se ha sugerido que este fenotipo de
21 hipertrofia VI concéntrica depende del equilibrio entre las cisteína-proteinasas
22 (catepsina B, S y K) y sus inhibidores (CisC)^{9,28,29}. Sin embargo, en nuestro estudio no
23 encontramos cambios en el patrón de tinción de la CisC miocárdica, ni entre sus
24 concentraciones séricas y los parámetros ecocardiográficos, que apoyen esta
25 interpretación. Estas diferencias pueden, al menos en parte, explicarse por las
26 diferencias en la metodología y poblaciones de ambos estudios. Aunque en el estudio
27 de Patel et al¹⁰ se utilizó una técnica precisa como la resonancia magnética, debe

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

resaltarse que el remodelado es un proceso local y que las concentraciones séricas de la CisC podrían no reflejar lo que ocurre a nivel tisular³⁰, algo que apoyan los resultados de la inmunohistoquímica en nuestro estudio.

La importancia del equilibrio entre proteasas y antiproteasas en la fisiopatología del remodelado cardiaco se ha estudiado en algunos trabajos³¹. Algunos autores atribuyen al balance entre las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMP) un papel clave en la diferenciación de los fenotipos de ICFeP e ICFeR³².

Stypman et al²⁸ analizó la histología y los cambios histomorfométricos en los corazones de 40 ratones con ausencia del gen codificante de la catepsina L. Al cabo de un año, los ratones deficientes mostraban, en comparación con los controles, un crecimiento significativo de la aurícula y el ventrículo, secundario a la fibrosis del intersticio miocárdico. Estas anomalías se reflejaban en la ecocardiografía en un deterioro importante de la contractilidad del VI, interpretado como una respuesta adaptativa a los cambios histológicos experimentados por el ratón deficitario para la catepsina L²⁸. También se ha encontrado un incremento en la expresión de la catepsina B, tanto a nivel del RNA mensajero, como de la proteína, en un grupo de 20 pacientes con miocardiopatía dilatada grave, en comparación con 5 sujetos donantes de corazón²⁹. Existen por tanto indicios de que algunas proteasas lisosomales participan en el remodelado cardiaco, no obstante el papel de las antiproteasas no se analizó de modo simultáneo en estos estudios.

En cualquier caso las familias de proteasas y antiproteasas son numerosas y sus papeles fisiológicos variados, por lo que el comportamiento de algunas de ellas pueden no ser extrapolables. Chen et al⁹ analizaron por PCR en tiempo real, inmunoblot e inmunohistoquímica, la expresión de catepsina S y K y su antiproteasa, la CisC, en corazones hipertróficos en humanos y en ratas. Encontraron que la expresión de las catepsinas era mayor en los corazones de sujetos con IC, que en aquellos que solo tenían hipertrofia del VI, o los del grupo control. Sin embargo la expresión de

1 CisC no aumentó en ningún espécimen de tejido de ninguno de los sujetos
2 analizados⁹. Estos resultados coinciden con los que nosotros encontramos en el
3 presente estudio. Existen algunas explicaciones que justifican la ausencia de
4 expresión de la CisC en el remodelado ventricular. En primer lugar, podría ser que la
5 secreción de CisC en respuesta al incremento de la producción de catepsinas sea
6 defectuoso. En este caso, la ausencia de acción de la CisC conduciría a un aumento
7 de la actividad elastolítica de las catepsinas, lo que indirectamente favorecería la
8 dilatación ventricular y la IC. En segundo lugar, es posible que determinados factores
9 locales sean decisivos en la localización de la actividad de la CisC. Se sabe que un pH
10 neutro del entorno extracelular reduce la actividad de las catepsinas y se ha
11 demostrado que la enzima H⁺-ATPasa lisosomal se trasloca a la membrana³³ y crea un
12 ambiente ácido que favorece la activación de las catepsinas activadoras de las
13 MMP³⁴. Es posible que algo similar ocurra con la CisC. De hecho esta proteasa ejerce
14 sus acciones fisiológicas en los fluidos corporales, lejos de las células que la
15 producen².

16 Limitaciones del estudio: el número de muestras tisulares estudiadas es pequeño y la
17 tinción inmunohistoquímica puede no reflejar de modo suficientemente sensible lo
18 que ocurre a nivel tisular en procesos biológicos complejos y dinámicos.

19 En conclusión, el patrón de distribución débil y homogéneo de la tinción
20 inmunohistoquímica para la CisC en el tejido miocárdico de fetos de diferentes
21 edades; de adultos con y sin enfermedades cardíacas; así como, de modo indirecto,
22 la ausencia de relación entre las concentraciones séricas de CisC y los parámetros
23 morfológicos y funcionales obtenidos por ecocardiografía en pacientes con IC,
24 sugieren que la CisC no está implicada directamente en el remodelado cardíaco que
25 conduce a la IC. Es muy probable que la información que la CisC proporciona en los
26 pacientes con IC, sea un marcador subrogado del FG, cuya importancia pronóstica es

de sobra conocida²³ y puede medirse con mayor precisión mediante la incorporación
de la CisC a las formulas de estimación^{22,27}.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Referencias

- 1
2 1.- Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Jarvinen M, Katunuma N, et al.
3
4 Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-
5
6 proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* 1986; 236: 312.
7
8
9
- 10 2.- Abrahamson M, Grubb A, Olafsson I, Lundwall A. Molecular cloning and sequence
11
12 analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor
13
14 cystatin C. *FEBS Lett* 1987; 216: 229-233.
15
16
17
- 18 3.- Abrahamson M, Islam MQ, Szpirer J, Szpirer C, Levan G. The human cystatin C
19
20 gene (CST3), mutated in hereditary cystatin C amyloid angiopathy, is located on
21
22 chromosome 20. *Hum Genet* 1989; 82: 223-226
23
24
25
26
27
- 28 4.- Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall A, Jansson O, et al.
29
30 Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* 1990; 268: 287-
31
32 294.
33
34
35
36
37
- 38 5.- Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. The place of human gamma-trace (cystatin C)
39
40 amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;
41
42 120:631-636.
43
44
45
46
- 47 6.- Merz GS, Benedikz E, Schwenk V, Johansen TE, Vogel LK, Rushbrook JI, et al.
48
49 Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in
50
51 transfected CHO cells. *J Cell Physiol* 1997; 173:423-432.
52
53
54
55
- 56 7.- Werb Z, Chin JR. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann NY*
57
58 *Acad Sci* 1998; 857:110-118.
59
60
61
62
63
64
65

1
2 8.- Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, et al. Cystatin C
3
4 deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms J Clin Invest 1999; 104:
5
6 1191-1197.
7
8
9

10
11 9.- Cheng XW, Obata K, Kuzuya M. Elastolytic cathepsin induction/activation system
12
13 exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. Hypertension
14
15 2006; 48: 979-987.
16
17
18
19

20
21 10.- Patel PC, Ayers CR, Murphy SA, Peshock R, Khera A, de Lemos JA, et al.
22
23 Association of Cystatin C With Left Ventricular Structure and Function The Dallas
24
25 Heart Study. Circ Heart Fail 2009; 2: 98-104.
26
27
28
29

30
31 11.- McMurray MD, Trivax JE, McCullough PA. Serum Cystatin C renal function and left
32
33 ventricular remodeling. Circ Heart Fail 2009; 2: 86-89.
34
35
36
37

38
39 12.- Sarnak MJ, Katz R, Fried LF, Siscovich D, Kestenbaum B, Seliger S, et al;
40
41 Cardiovascular Health Study. Cystatin C and aging success. Arch Intern Med 2008;
42
43 168: 147-153.
44
45
46
47

48
49 13.- Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried LF, Seliger SL, Newman AB, et al. Cystatin C
50
51 and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. N Engl J Med
52
53 2005; 352:2049-2060.
54
55
56
57

58
59 14.- Sarnak MJ, Katz R, Stehman-Breen CO, Fried LF, Jenny NS, Psaty, et al;
60
61 Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Health Study. Cystatin C concentration
62
63 as a risk factor for heart failure in older adults. Ann Intern Med 2005; 142:497-505.
64
65

- 1
2 15.- Djoussé L, Kurth T, Gaziano JM. Cystatin C and risk of heart failure in the
3
4 Physicians' Health Study (PHS). Am Heart J 2008;155: 182-186.
5
6
7
8
9 16.- Moran A, Katz R, Smith NL, Fried LF, Sarnak MJ, Seliger SL, et al. Concentration
10 as a predictor of systolic and diastolic heart failure. J Card Fail 2008;14: 19-26.
11
12
13
14
15 17.- Deo R, Fyr CL, Fried LF, Newman AB, Harris TB, Angleman S, et al; Health ABC
16 study. Kidney dysfunction and fatal cardiovascular disease-an association
17 independent of atherosclerotic events: Results from the Health, Aging, and Body
18 Composition (Health ABC) study. Am Heart J 2008;155:62-68.
19
20
21
22
23
24
25
26 18.- Shlipak MG, Katz R, Fried LF, Jenny NS, Stehman-Breen CO, Newman AB, et al.
27 Cystatin-C and mortality in elderly persons with heart failure. J Am Coll Cardiol 2005;
28 45: 268-271.
29
30
31
32
33
34
35 19.- Pérez-Calvo J, Ruiz-Ruiz F, Francisco J Carrasco-Sánchez J, Morales-Rull JL,
36 Manzano-Fernández S, Galisteo-Almeda L, et al. Prognostic value of serum cystatin c
37 and N-terminal pro B-type natriuretic peptide in patients with acute heart failure.
38 Eur J Intern Med 2012; 23: 599-603.
39
40
41
42
43
44
45
46 20.- Zamora E, Lupón J, de Antonio M, Vila J, Peñafiel J, Galán A, et al. Long-term
47 prognostic value for patients with chronic heart failure of estimated glomerular
48 filtration rate calculated with the new CKD-EPI equations containing cystatin C. Clin
49 Chem 2014; 60: 481-489.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
21.- Carrasco-Sánchez FJ, Galisteo-Almeda L, Páez-Rubio I, Martínez-Marcos FJ,
Camacho-Vázquez C, Ruiz-Frutos C, et al. Prognostic value of cystatin C on admission
in heart failure with preserved ejection fraction. *J Card Fail* 2011; 17: 31-38.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
22.- Manzano-Fernández S, Flores-Blanco PJ, Pérez-Calvo JI, Ruiz-Ruiz FJ, Carrasco-
Sánchez FJ, Morales-Rull JL, et al. Comparison of Risk Prediction With the CKD-EPI
and MDRD Equations in Acute Decompensated Heart Failure. *J Card Fail* 2013; 19:
583-591.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
23.- Hillege HL, Girbes AR, de Kam PJ, Boomsma F, de Zeeuw D, Charlesworth A,
et al. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic
heart failure. *Circulation* 2000;102:203-210.

40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
24.- Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, et al; ESC
Committee for Practice Guideline (CPG). Executive summary of the guidelines on the
diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure
of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26:384-416.

25.- Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayes-Genis A, Ordonez-Llanos J,
Santalo-Bel M, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in
acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients:
the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* 2006; 27: 330-337.

26.- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al;
ESC Committee for Practice Guidelines. ESC guidelines for the diagnosis and
treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis
and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur J Heart Fail 2012;14: 803-869.

Erratum in Eur J Heart Fail 2013; 15: 361-362.

27.- Zamora E, Lupón J, de Antonio M, Vila J, Galán A, Gastelurrutia P, et al. Limited value of cystatin-C over estimated glomerular filtration rate for heart failure risk stratification. PLoS One 2012; 7: e51234.

28.- Stypmann J, Glaser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, et al. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:6234-6239.

29.- Ge J, Zhao G, Chen R, Li S, Wang S, Zhang X, et al. Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2006; 8: 284-289.

30.- Beiras-Fernandez A, Weis F, Rothkopf J, Kaczmarek I, Ledderose C, Dick A, et al. Local expression of myocardial galectin-3 does not correlate with its serum levels in patients undergoing heart transplantation. Ann Transplant 2013; 22;18:643-650.

31.- López B, González A, Querejeta R, Larman M, Díez J. Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. J Am Coll Cardiol 2006; 48: 89-96.

32.- Shirwany A, Weber KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. J Am Coll Cardiol 2006; 48: 97-98.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

33.- Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, et al. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* 2000;192: 789-799.

34.- Sam F, Siwik DA. Digesting the Remodeled Heart Role of Lysosomal Cysteine Proteases in Heart Failure. *Hypertension* 2006; 48: 830-831.

1
2 Leyendas

3
4 Figura 1

5
6 Tinción inmunohistoquímica de las muestras de tejido miocárdico (todas las imágenes
7
8 están a 20x)

9
10
11 Panel A

12 Hematoxilina de contraste y diluyente de anticuerpos (control)

13 Se observa miocitos cardiacos de estructura normal con los núcleos teñidos
14
15 débilmente ocupando una posición central dentro de la célula, con tinción de fondo
16
17 de hematoxilina. También se observa pigmento de lipofuscina a nivel de los polos del
18
19 núcleo(Ac 20X).

20
21
22 Panel B

23 Desmina en miocardio fetal: en los casos correspondientes a fetos la expresión de
24
25 desmina es mucho mas débil que en el corazón adulto o es negativa traduciendo
26
27 probablemente falta de desarrollo de las sarcómeras.

28
29
30 Panel C

31 Desmina en miocardio adulto: estriación transversal de todo el miocardio y las
32
33 bandas intercalares que destacan más oscuras.

34
35
36 Panel D

37 MMP9 en miocardio fetal: la inmunotinción citoplásmica para MMP9 es positiva en
38
39 células aisladas en el intersticio. El citoplasma de las células musculares es negativo.

40
41
42 Panel E

43 MMP9 en miocardio adulto: al igual que en el caso anterior inmunotinción
44
45 citoplásmica para MMP9 en células aisladas en el intersticio, mientras que las células
46
47 musculares son negativas.

48
49
50 Panel F:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

CisC en miocardio fetal: se aprecia una celularidad más abundante que en el corazón adulto con disposición menos ordenada de las células y una leve inmunotinción citoplásmica de los miocardiocitos para CisC. Existe alguna célula pequeña aislada en el intersticio que expresa cistatina en su citoplasma.

Panel G:

CisC en miocardio adulto: cardiomiocitos inmunoteñidos con expresión difusa de CisC en el citoplasma.

Tabla 1

Características generales de las muestras de miocardio

Muestras fetales	Muestras de adultos
Edad gestacional 20 semanas	Mujer de 50 años con corazón sano (control)
Edad gestacional 22 semanas	Varón de 71 años con corazón sano (control)
Edad gestacional 30 semanas	Varón de 84 años con corazón sano (control)
Edad gestacional 33 semanas	Varón de 53 años con hipertrofia del VI secundario a hipertensión arterial
	Varón de 80 años con shock cardiogénico tras un IAM

VI: ventrículo izquierdo; IAM: infarto agudo de miocardio

Tabla 2

Características basales de la cohorte clínica

n (%)	351
ICFEr	106 (30,19)
Edad (años)	78,41 (6,77)
Sexo masculino n° (%)	170 (48,4%)
IMC kg/m ²	29,86 (10,59)
Etiología- n° (%)	
Hipertensiva	157 (44,6)
Cardiopatía isquémica	80 (22,79)
Otras*	114
Clase funcional NYHA - n° (%)	
I	37 (10,54)
II	189 (53,85)
III	119 (33,90)
IV	6 (1,71)
Comorbilidad	
Hipertensión arterial - n° (%)	255 (72,6)
Fibrilación auricular	205 (58,4)
Diabetes mellitus - n° (%)	136 (38,7)
EPOC - n° (%)	71 (20,2)
Sodio mEq/L	141,7 (4,47)
Hemoglobina g/dL	12,12 (0,29)
FGe- ml/min/1,73m ² (MDRD-4)	52,16 (21,34)
Cistatina, mg/l	1,5 (0,55)

NT-proBNP, pg/mL	6183,21 (9574,91)
------------------	-------------------

* Algunos pacientes pueden tener varias etiologías simultáneas .

Valores expresados como media (\pm desviación estándar).

ICFe: insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida; IMC: índice de masa corporal; NYHA: *New York Heart Association*; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FGe: filtrado glomerular estimado; MDRD: *Modification Diet in Renal Disease* formula basada en 4 parámetros; NT-proBNP: fragmento aminoterminal del propéptido natriurético cerebral.

Tabla 3

Correlación entre las concentraciones de cistatina sérica y los parámetros ecocardiográficos

	Cohorte completa	Q1 ≤1,1 mg/dL	Q2 1,11-1,35 mg/dL	Q3 1,36-1,75 mg/dL	Q4 >1,75 mg/dL	p
FE del VI	51,7 (13,95)	50,55 (13,48)	52,65 (14,17)	49,07 (14,78)	54,77 (12,82)	0,075
Diámetro AI (mm)	47,74 (9,27)	48,36 (9,14)	47,95 (8,78)	47,38 (10,21)	47,31 (9)	0,9
VTDVI (ml)	55,25 (9,64)	54,43 (11)	56,36 (9,12)	56,56 (9,84)	53,61 (8,39)	0,204
VTSVI(ml)	38,51 (11,2)	38,8 (12,43)	39 (10,97)	39,45 (11,76)	36,9 (9,66)	0,57
Grosor tabique (mm)	10,52 (2,21)	10,18 (2,71)	10,66 (2,02)	10,56 (2,08)	10,68 (1,99)	0,539
Grosor pared posterior (mm)	10,42 (2,03)	10,47 (2,77)	10,38 (1,85)	10,49 (1,8)	10,35 (1,62)	0,971
Masa VI (g)	204,09 (82,6)	198,33 (91,28)	206,48 (82,76)	213,71 (86,05)	197,32 (70,76)	0,628
Índice de masa del VI (g/m ²)	115,5 (43)	114,2 (48,5)	115 (41,7)	121,7 (45,2)	111,2 (36,7)	0,56
“Concentricidad” ^{**} (g/ml)	3,66 (1,15)	3,64 (1,46)	3,67 (1,16)	3,72 (1,04)	3,63 (0,96)	0,97
Onda E	0,99 (0,36)	0,97 (0,34)	0,97 (0,26)	0,98 (0,43)	1,04 (0,36)	0,786
Onda A ^{**}	0,82 (0,33)	0,81 (0,28)	0,72 (0,27)	0,91 (0,38)	0,83 (0,33)	0,378
E/A ^{**}	1,25 (0,75)	1,37 (1,1)	1,28 (0,55)	1,03 (0,53)	1,37 (0,79)	0,342
PSAP (mmHg)	46,6 (16,44)	45,81 (13,51)	42,14 (14,51)	48,81 (21,27)	48,03 (15,71)	0,504

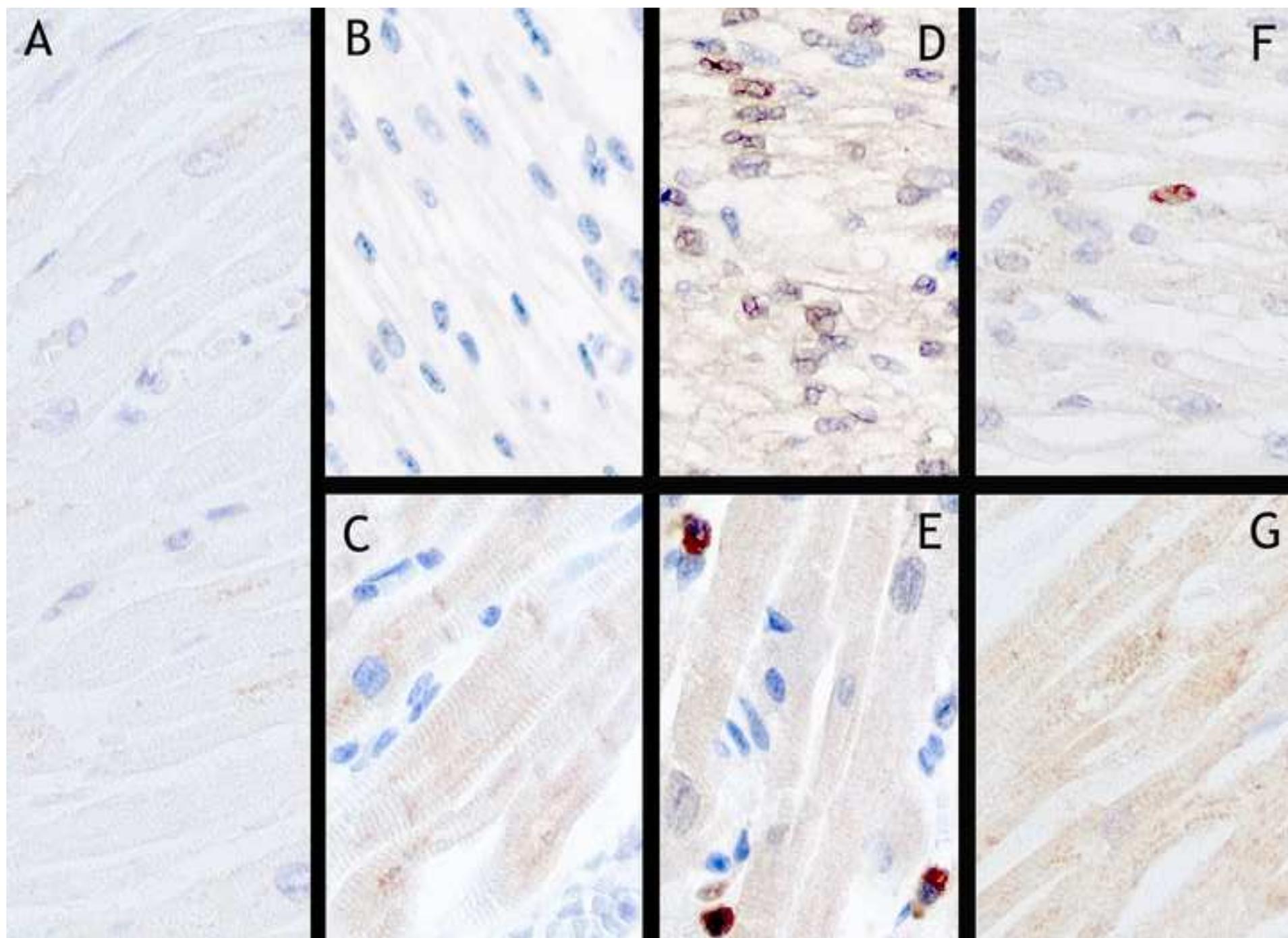
FE del VI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; AI: auricular izquierda;

VTDVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; VTSVI: volumen telesistólico del ventrículo izquierdo; PSAP: presión sistólica arterial pulmonar.

* “Concentricidad”: Masa del VI/ diámetro diastólico del VI

** Solo en pacientes en ritmo sinusal

Figura 1
[Click here to download high resolution image](#)



Autoevaluación

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Con relación a la cistatina C, señale la respuesta falsa:

- a) Se trata de una proteasa antagonista de proteasas ricas en cisteína
- b) Su acción se ejerce fundamentalmente a nivel lisosómico
- c) Se sintetiza como propéptido y se secreta junto con un péptido señal
- d) Los genes codificantes pertenecen a los denominados genes de mantenimiento
- e) Su secreción es estable, no se influye por la edad y el filtrado glomerular

Respuesta correcta: b

Aunque la cistatina C se almacena en los lisosomas, una vez secretada, ejerce sus acciones biológicas a nivel extracelular, fundamentalmente a nivel de fluidos corporales. El hecho de ser un producto de los genes de mantenimiento, cuya expresión es muy constante, le aporta ventajas para su empleo como marcador pronóstico en la clínica.

La tinción de cistatina C por inmunohistoquímica, en el miocardio ventricular de sujetos adultos (señale la afirmación correcta):

- a) Se localiza en el intersticio miocárdico
- b) Es fundamentalmente intracelular y perinuclear
- c) Varía en dependencia de la enfermedad de base. La hipertrofia del VI incrementa su expresión
- d) Su expresión es débil y uniforme en todo el miocardio
- e) Existen notables diferencias tintoriales con respecto al miocardio fetal

Respuesta correcta: d

1 La tinción de cistatina es débil y homogénea, no muestra diferencias significativas
2 entre el adulto y el feto y no se influye por la presencia de hipertrofia ventricular.
3
4
5

6 La concentración sérica de cistatina C es un factor pronóstico en la insuficiencia
7 cardiaca del adulto. Señale la afirmación que mejor define su capacidad pronóstica:
8
9

10 a) La estimación del filtrado glomerular empleando cistatina C en su cálculo mejora
11 la precisión en los pacientes con descensos de la función renal leve.
12
13

14 b) Las concentraciones séricas se correlacionan con la masa del ventrículo izquierdo
15
16

17 c) Las concentraciones séricas se correlacionan con el diámetro de la aurícula
18 izquierda
19
20

21 d) Las concentraciones séricas reflejan el balance entre proteasas y antiproteasas a
22 nivel ventricular
23
24

25 e) Las concentraciones séricas es un factor pronóstico independiente de la masa
26 ventricular y del filtrado glomerular
27
28
29
30

31 respuesta correcta: a
32
33

34 La cistatina C es especialmente precisa en la estimación del filtrado glomerular
35 cuando este se encuentra por encima de 50 ml/min, situación en que las
36 concentraciones de creatinina tienden a sobrestimar la tasa de filtrado.
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Qué propiedades de la cistatina C le confieren precisión a la hora de estimar el
46 filtrado glomerular:
47
48

49 a) Su peso molecular pequeño
50
51

52 b) Su carga eléctrica
53
54

55 c) La ausencia de reabsorción tubular
56
57

58 d) La estabilidad de su secreción por las células nucleadas
59
60

61 e) Todas las anteriores
62
63
64
65

Respuesta correcta: e

La cistatina C es una molécula pequeña, de carga negativa, que se filtra libremente en el glomérulo y se cataboliza en el túbulo contorneado proximal, por lo que no se reabsorbe. Además, al ser un producto de genes de mantenimiento, su tasa de síntesis y secreción permanece invariable, por lo que sus niveles plasmáticos son estables. Todo ello le confiere unas propiedades óptimas para estimar el filtrado glomerular.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65