



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Papel de los Biomarcadores en la
Miocardiopatía Hipertrófica**

D. Juan Antonio Vílchez Aguilera

2013

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Área de Bioquímica y Patología Molecular. Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN LA MIOCARDIOPATÍA
HIPERTRÓFICA**

Memoria para optar al grado de doctor
presentada por

Juan Antonio Vílchez Aguilera

Bajo la dirección de los Doctores:

Dr. Francisco Marín

Dra. Teresa Casas Pina

Dr. Pedro Martínez Hernández

Murcia, 2013



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. FRANCISCO MARÍN, profesor asociado de la Universidad del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA INTERNA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA”**, realizada por D. JUAN ANTONIO VÍLCHEZ AGUILERA, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de Mayo de 2013

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a vertical line.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dra. TERESA CASAS PINA, profesora colaboradora de la Universidad en el Área de BIOQUÍMICA Y PATOLOGÍA MOLECULAR en el Departamento de CIRUGÍA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTROFICA”**, realizada por D. JUAN ANTONIO VÍLCHEZ AGUILERA, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de Mayo de 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Teresa Pina', with a large, stylized initial 'P' above the name.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. PEDRO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, profesor asociado de la Universidad en el Área de BIOQUÍMICA Y PATOLOGÍA MOLECULAR en el Departamento de CIRUGÍA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA”**, realizada por D. JUAN ANTONIO VÍLCHEZ AGUILERA, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de Mayo de 2013

A handwritten signature in blue ink, reading "Juan Antonio Vilchez Aguilera".

*Los sueños son aspiraciones sin esperanza,
para que se hagan realidad cree en ti mismo.*

Lisa Lopez

TLC- Waterfalls-1994

A mis padres

*A mi tío Cayetano y a mi tía Encarna...
por muy poco no visteis el final de este proyecto*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis "Directores ", Pedro Martínez, Teresa Casas y Paco Marín, por la ayuda recibida en esta tesis y por permitirme llevar éste y otros proyectos hacía su meta particular. Gracias por confiar en mí y por vuestro tiempo y dedicación.

Dentro de los que integran mi entorno en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, tengo que agradecer a tanta gente que con sólo una simple pregunta de ¿cómo llevas la tesis? se interesaron por este proyecto, que no sabría por dónde empezar. Pero en especial agradecer a mis tutoras, Isabel Tovar y M^º Dolores Albaladejo, por tantos consejos bien recibidos, y a Paco Ruiz, porque fuiste parte del boceto de esta obra.

Gracias a todos los miembros de nuestro grupo de investigación, porque cada vez me siento más orgulloso de haber crecido juntos como grupo y de aprender de vosotros, trabajando codo con codo.

Gracias al resto de personas que han participado en este proyecto en alguna de sus fases, tanto del Hospital Virgen de la Arrixaca como del Hospital General Universitario de Alicante.

A mis amigos, que son mi familia en Murcia, gracias por acogerme, porque aún siendo un grupo cíclico, tenemos una base que nos une. Es un lujo conocer gente así, y compartir un camino que a muchos nos aleja de nuestra tierra natal.

Al resto de mis amigos, repartidos principalmente por Mallorca, Granada u otras latitudes, gracias por saber mantener esta amistad a lo largo de los años.

A mi familia gracias, porque aun habiendo vivido distanciados, siempre estáis ahí en todo momento.

A mis padres, gracias por creer en mí, haberme enseñado unos valores que me guían y apoyarme en todo lo que hago con fe y cariño.

Sencillamente, GRACIAS.

LISTADO DE ABREVIATURAS

- α -TM:** α -tropomiosina
- β -MHC:** β -miosina
- AI:** Aurícula izquierda
- AMP:** adenosín monofosfato
- ANP:** péptido atrial natriurético
- ATP:** adenosín trifosfato
- BNP:** péptido natriurético cerebral
- Ca²⁺:** calcio
- CRM:** cardi resonancia magnética
- DE:** disfunción endotelial
- DTI:** patrón de llenado en el Doppler tisular
- DTDVI:** diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo
- DTSVI:** diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo
- ECA:** enzima convertidora de la angiotensina
- ECG:** electrocardiograma
- ECLIA:** electroquimioluminiscencia
- EIA:** enzimo inmuno ensayo
- ELISA:** acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- FA:** fibrilación auricular
- FEVI:** fracción de eyección del VI
- FvW:** factor von Willebrand
- GDF-15:** factor de crecimiento de diferenciación-15
- GHL:** tripéptido glicil-histidil-lisina
- GTSVI:** gradiente de obstrucción en el tracto de salida
- HF:** fallo cardíaco
- HVI:** hipertrofia ventricular izquierda
- IC:** insuficiencia cardíaca
- IL-6:** interleuquina 6
- ICTP:** telopéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I
- MCH:** miocardiopatía hipertrófica
- METs:** capacidad funcional expresada en equivalentes metabólicos

MMP: metaloproteinasas

MS: muerte súbita

MyBP-C: proteína C de unión a la miosina

NT-proBNP: fracción amino terminal del Péptido Natriurético Cerebral

NYHA: New York Heart Association

PCR: proteína C-reactiva

PCRhs: proteína C-reactiva ultrasensible

PICP: propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I

PINP: propéptido aminoterminal del procolágeno de tipo I

PIIINP: propéptido N-terminal del procolágeno tipo III

RAAS: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

RTG: realce tardío con gadolinio

SAM: movimiento sistólico anterior de la válvula mitral

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TIMPs: inhibidores metaloproteinasas

TNF- α : factor de necrosis tumoral

TnI: troponina I

TnT: troponina T

TnThs: troponina T ultrasensible

TSVI: obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo

TVNS: taquicardia ventricular no sostenida

VAI: volumen auricular izquierdo

VI: ventrículo izquierdo

ABBREVIATION LIST

HCM: Hypertrophic cardiomyopathy

SCD: Sudden cardiac death

LVH: Left ventricle hypertrophy

LV: Left ventricle

ATP: Adenosine triphosphate

ECG: Electrocardiogram

LOVTG: Left ventricular outflow tract gradient >30 mmHg

NSVT: Non sustained ventricular tachycardia

LOVT: LV outflow tract obstruction

MRI: Magnetic resonance imaging

LGE: Gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance

AF: Atrial fibrillation

HF: Heart failure

BNP: B-type natriuretic peptide

NT-proBNP: N-terminal pro-BNP

NYHA: New York Heart Association

HsCRP: High sensitive C-reactive protein

vWF: von Willebrand factor

hsTnT: High sensitive troponin T

GDF-15: Growth differentiation factor-15

TGF- β : Transforming growth factor β

PICP: Carboxyterminal propeptide of procollagen type I

PINP: Amino-terminal propeptide of procollagen type I

ICTP: Procollagen carboxyterminal telopeptide type I

PIIINP: N-terminal propeptide of procollagen type III

MMP: Matrix metalloproteinase

MET: Metabolic equivalent

LAV: Left atrial volume

CLcr: Creatinine clearance

E.I.A: Enzyme immunoassay

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	23
1. LA MCH COMO ENFERMEDAD COMPLEJA	25
1.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD	25
1.2 RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	26
1.2.1 Relación genotipo-fenotipo: polimorfismos en MCH	29
1.3 HISTOLOGÍA DE LA MCH Y SIGNIFICADO CLÍNICO	31
1.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA MCH	35
1.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DE LA MCH:	40
1.6 EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD: CLINICA Y PRONÓSTICO EN LA MCH	46
2. DE LA FISIOPATOLOGÍA A LA CLÍNICA: ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA PATOLOGÍA.....	51
3. BIOMARCADORES EN MCH.....	53
3.1 BIOMARCADORES DE ESTRÉS PARIETAL: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	54
3.2 BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN	55
3.3 BIOMARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL	57
3.4 BIOMARCADORES DE NECROSIS EN MIOCITOS	60
3.5 FACTORES DE CRECIMIENTO	62
3.6 BIOMARCADORES DE FIBROSIS Y REMODELADO TISULAR. ANTECEDENTES Y RELACIÓN CON LA MCH:	63
Biomarcadores relacionados con la síntesis del colágeno.....	65
Biomarcadores relacionados con la degradación del colágeno	66
Biomarcadores del metabolismo del colágeno en las enfermedades cardíacas .	67
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO	73
2.2. OBJETIVOS	75
III. MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	79

3.2. PACIENTES Y GRUPO CONTROL.....	79
3.3. MÉTODO	80
3.3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA.....	80
3.3.2. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO: ECOCARDIOGRAFÍA DOPPLER.....	81
3.3.3. ERGOMETRÍA O PRUEBA DE ESFUERZO	81
3.3.4. REGISTRO DE ECG TIPO HOLTER.....	82
3.3.5. ESTUDIO DE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA CARDÍACA.....	82
3.3.6. MUESTRAS SANGUÍNEAS Y ENSAYOS DE LABORATORIO	83
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90
3.5 CONFIDENCIALIDAD DEL ESTUDIO	92
3.6 COMITÉ ÉTICO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	92
3.7 FINANCIACIÓN.....	92
IV. RESULTADOS	93
<i>Estrategia de análisis de resultados.....</i>	<i>95</i>
4.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	97
4.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y GRUPO CONTROL:.....	97
4.1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO CLASIFICADA SEGÚN LA ESCALA NYHA.....	99
4.2 EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE BIOMARCADORES EN MCH..	101
4.2.1 OBJETIVO 1: ESTUDIO DE CONCENTRACIONES DE LOS BIOMARCADORES ENTRE PACIENTES Y GRUPO CONTROL.....	101
4.2.2 OBJETIVO 2: ESTUDIO DE CONCENTRACIONES DE LOS BIOMARCADORES ENTRE PACIENTES DEL ESTUDIO CLASIFICADOS SEGÚN LA ESCALA NYHA	103
4.3 OBJETIVO 3: EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE BIOMARCADORES EN MCH Y SU ASOCIACIÓN A VARIABLES CLÍNICAS.....	105
4.3.1 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS PARIETAL: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS (NT-proBNP)	105

4.3.2 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN: PCRhs.....	110
4.3.3 BIOMARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL: FvW	115
4.3.4 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE NECROSIS EN MIOCITOS: TnThs.....	121
4.3.5 FACTORES DE CRECIMIENTO: GDF15.....	127
4.3.6 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE FIBROSIS Y REMODELADO TISULAR: PÉPTIDOS DEL COLÁGENO.....	135
4.4 ASOCIACIONES CON LOS FACTORES DE RIESGO DE MUERTE SÚBITA Y PEOR CAPACIDAD FUNCIONAL	147
V. DISCUSIÓN.....	155
5.1. BIOMARCADORES DE ESTRÉS PARIETAL: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS: NT- proBNP.....	157
5.2. BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN: PCRhs.....	162
5.3. BIOMARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL: FvW.....	164
5.4. BIOMARCADORES DE NECROSIS EN MIOCITOS: TNThs.....	166
5.5. FACTORES DE CRECIMIENTO: GDF15	169
5.6. BIOMARCADORES DE FIBROSIS Y REMODELADO TISULAR: PÉPTIDOS DEL COLÁGENO.....	173
5.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	180
VI. CONCLUSIONES.....	181
VII. ABSTRACT.....	185
VII. ANEXOS.....	217
VIII. BIBLIOGRAFÍA	225

I. INTRODUCCIÓN

1. LA MCH COMO ENFERMEDAD COMPLEJA.

1.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enfermedad primaria del miocardio causada por cambios genéticos en los genes que codifican las proteínas del sarcómero. Hasta el momento se han descrito más de 400 mutaciones en once genes localizados en los cromosomas 1, 11, 14 y 15 [1], incluyendo mutaciones en el gen de miosina y troponina, o relacionadas con ellas. Con una prevalencia estimada de 1/500 sujetos en población no seleccionada [2], se considera una enfermedad frecuente con una penetrancia variable y que suele seguir un patrón de herencia autosómico dominante [1].

La MCH presenta hipertrofia cardíaca, desorganización de los miocitos (“disarray”) e incremento de la matriz colágena intersticial [3], que contribuyen al desarrollo de un amplio espectro de anomalías funcionales, incluyendo isquemia miocárdica, disfunción sistólica, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias y muerte súbita (MS)[4].

Sin embargo, la MCH es una enfermedad que se caracteriza por la heterogeneidad en relación a los cambios morfológicos, los hallazgos funcionales y las manifestaciones clínicas. No todos los pacientes con MCH presentan el mismo fenotipo, encontrándose diferencias en cuanto al grado de hipertrofia, localización de ésta y riesgo de MS, de ahí que exista gran heterogeneidad genotipo-fenotipo en las mutaciones sarcoméricas estudiadas. El desarrollo de hipertrofia miocárdica suele coincidir con la fase de crecimiento, pudiendo observarse los grados más floridos en la adolescencia y juventud [5]. A pesar de ello, se han descrito formas de desarrollo tardío en las que el fenotipo característico se expresa en la edad adulta [6].

Tradicionalmente se le ha considerado como una de las causas fundamentales de MS en pacientes jóvenes y atletas [7]. De hecho la práctica deportiva aumenta el riesgo de MS en pacientes con MCH. Por lo tanto, la atención se ha centrado en el desarrollo de estrategias de cribado previo, siendo un factor determinante en todas las estrategias de prevención el coste-efectividad de las mismas [8;9].

1.2 RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.

La MCH es esencialmente una enfermedad monogénica. Se calcula que en más de un 60% de los casos, el trastorno tiene una segregación familiar [1]. Se conoce que esta patología engloba un grupo de enfermedades producidas por mutaciones en proteínas del sarcómero, cuya expresión fenotípica depende de múltiples factores, modificadores genéticos y ambientales [10].

De los genes donde se ha identificado mutaciones relacionadas con MCH, 8 de ellos afectan a proteínas del sarcómero: Cadena pesada de la β -miosina (MYH7, cromosoma 14q11), troponina T (TNNT2, cromosoma 1q3), α -tropomiosina (TPM1, cromosoma 15q2, proteína C de unión a la miosina (MyBPC3, cromosoma 11q11.2), troponina I (TNNI3, cromosoma 19p13.2-q13.2), cadenas esencial y reguladora de la miosina beta (MYL3 y MYL2, cromosomas 3p21.2-3p21.3 y 12q23-q24 y α -actina cardíaca (cromosoma 15q14)[11;12]. También se han descrito mutaciones en el gen de la titina [13] proteína relacionada con la α -actina, y en el gen de la PRKAG2 (subunidad reguladora γ 2 de la proteinquinasa activada por AMP [14], esta última asociada a fenómenos de preexcitación (Wolff-Parkinson-White) y alteraciones de la conducción (bloqueo auriculoventricular). Además se ha descrito la mutación en el gen de la proteína LIM del músculo en pacientes con MCH. Esta proteína actúa como promotora de la miogénesis y cofactor en la regulación de la expresión de genes musculares [15].

Se considera que las mutaciones en el gen de la cadena pesada de la β -miosina son responsables de más de un 40% de los casos de MCH familiar y que las mutaciones en la troponina T y proteína C de unión a la miosina, constituyen aproximadamente otro 40% de los casos. Por tanto, estos 3 genes son responsables de un 80-90% de los casos de MCH familiar [11;16] (Figura 1).

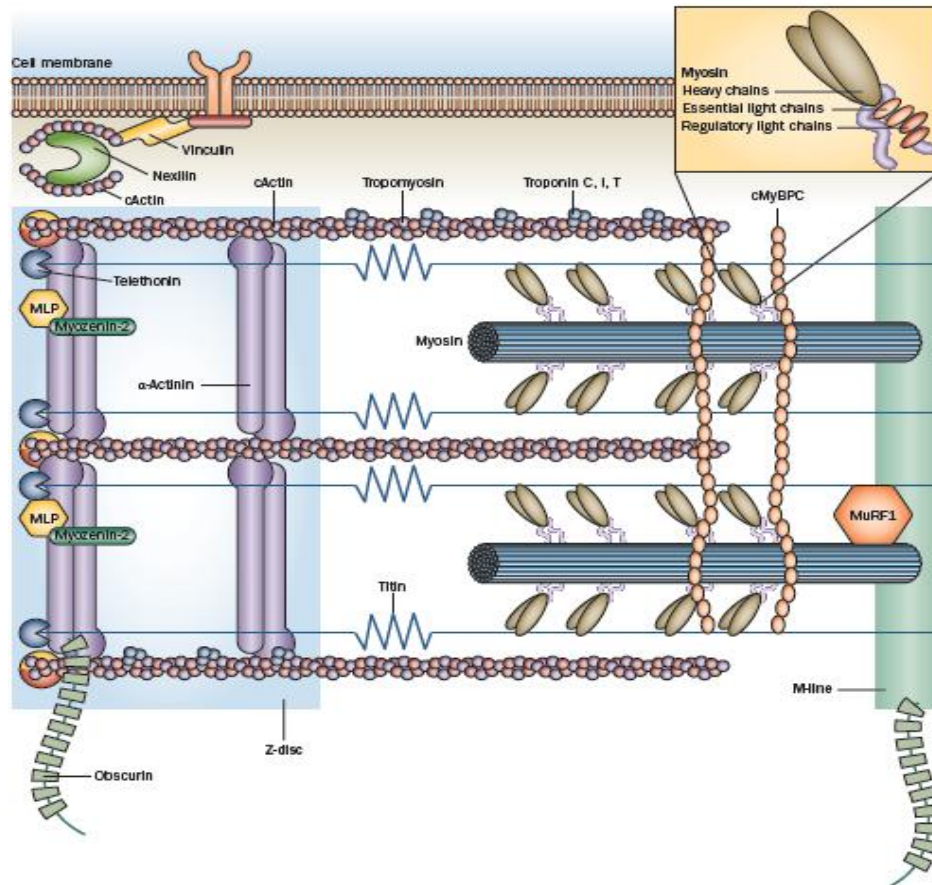


Figura 1. Proteínas del sarcómero y localización de las diferentes mutaciones descritas en la MCH. Adaptado de Frey N y cols. *Rev. Cardiol.* 2011.[17].

Por otro lado, se han identificado diferentes proteínas relacionadas con la enfermedad: cadena pesada de la β -miosina (β -MHC), cadenas ligera esencial y reguladora de la miosina (MLC-1 y MLC-2), troponina T (TnT), troponina I (TnI), α -tropomiosina (α -TM), proteína C de unión a la miosina (MyBP-C) y actina cardiaca [1;11;18] (Figura 1).

La miosina es el principal componente de los filamentos gruesos y el motor molecular que transforma la energía de la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) en movimiento de desplazamiento de los filamentos. Cada molécula está compuesta por dos cadenas pesadas, dos cadenas ligeras esenciales (MLC-1) y dos cadenas ligeras reguladoras (MLC-2). La forma más frecuente en corazones humanos es la isoforma β de la cadena pesada. La β -MHC es una proteína asimétrica, que consta de una cabeza globular, una zona “bisagra” y una “cola” [19]. En la cabeza, tiene lugar la hidrólisis del ATP y la unión con la actina. La mayoría de

las mutaciones de la β -MHC han sido descritas en la cabeza globular o en la zona bisagra. Las cadenas ligeras de la miosina se localizan en la zona de “bisagra” y su función parece estar relacionada con la modulación de la actividad ATPasa, además de ofrecer soporte estructural.

Las proteínas que componen el complejo de la troponina y la α -TM forman junto con la actina, el filamento fino del sarcómero. El complejo de la troponina, está ligado a la α -TM y cambios conformacionales relacionados con el calcio, permiten la interacción de la actina con la miosina. Dos moléculas de α -TM se unen en forma de α -hélice a lo largo del filamento de actina, actuando de puente entre esta molécula y el complejo troponina. La función exacta de la MyBP-C parece tener una misión estructural [20].

El estímulo que provoca el desarrollo de hipertrofia en pacientes con mutaciones en proteínas del sarcómero es desconocido. La hipocontractilidad del miocito parece ser la regla [21;22] y esta pérdida de función aparece previamente a los cambios estructurales propios de la enfermedad.

Se han descrito más de 50 mutaciones distintas del gen de la β -MHC como causantes de MCH. Se estima que alteraciones de esta proteína justifican el 30% de los casos de MCH [23]. En los casos esporádicos, parece ser la proteína más afectada. Desde el punto de vista clínico, el desarrollo de la enfermedad se produce en la adolescencia, salvo excepciones. La penetrancia es alta entre los afectados y la tasa de mortalidad varía ampliamente entre las mutaciones [24].

Unas doce mutaciones han sido descritas en el gen de la troponina T [25]. Supone aproximadamente el 15% de de los casos de MCH. Salvo raras excepciones, se caracteriza clínicamente por el desarrollo de hipertrofia ligera y un mal pronóstico. El riesgo de MS es similar al descrito en las mutaciones más severas de la β -MHC.

Las mutaciones de la proteína C de unión a la miosina supone entre un 15-25% de los casos de MCH [26] y presenta una penetrancia tardía de la enfermedad. Supone la primera causa de desarrollo de MCH por encima de los 50 años y una vez expresada la enfermedad, su severidad es similar al de las mutaciones de alto riesgo [26].

El resto de mutaciones en otras proteínas como α -Tropomiosina, Troponina I o en las cadenas ligeras de la miosina y actina suponen un bajo número de mutaciones y proporción de casos restante.

Además se ha intentado buscar más allá de solo causas genéticas localizadas en las proteínas sarcoméricas en MCH, debido al reconocimiento de que un 30-40% de los pacientes no tienen mutaciones del sarcómero [27;28].

1.2.1 Relación genotipo-fenotipo: polimorfismos en MCH.

Posiblemente, múltiples mecanismos estén implicados en la heterogeneidad de la expresión fenotípica de la MCH. Dentro de una misma familia, la enfermedad se expresa con gran variabilidad en los individuos afectados. Tanto factores genéticos como no genéticos influyen posiblemente en esta diversidad, hecho sustentado con resultados obtenidos en diferentes polimorfismos [10;29;30].

La heterogeneidad es la característica que define la expresión fenotípica de esta enfermedad. Surge así la necesidad de implicar factores ambientales y probablemente otros factores genéticos para explicar esta diversidad [11;31]. Uno de los ejemplos de la participación de un agente ambiental, es la observación de que, a pesar de que β -miosina se exprese de forma similar en ambos ventrículos, la MCH es una enfermedad fundamentalmente del ventrículo izquierdo y la hipertrofia probablemente ocurre como consecuencia de la mayor presión sistólica ventricular izquierda [31]. Por tanto, el estudio de polimorfismos en MCH podría aportar información sobre factores de modificación de la expresión fenotípica de la enfermedad.

Diversos trabajos han profundizado en este tema, en gran parte estudiando el Sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Además de las mutaciones en las proteínas sarcoméricas que modifican la función cardiaca del miocito asociadas con la hipertrofia, la desorganización de las fibras y la fibrosis intersticial, se han sugerido polimorfismos en el RAAS que representan una hipótesis atractiva como modificadores potenciales de enfermedad, ya que estas variantes genéticas alteran el "estado de activación" del RAAS, lo que conduce a una mayor hipertrofia del ventrículo izquierdo a través de diferentes vías [32]. En particular uno de los más

estudiados, es el gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (*polimorfismo DD-ECA*) que podría modificar el fenotipo de la enfermedad de manera gen-dependiente [29;33;34]. Así, pacientes con el genotipo DD tienen aumentado la concentración de ECA en tejido y además también tienen elevados los valores de angiotensina II, la cual está relacionada con el incremento de hipertrofia y fibrosis, así el *polimorfismo DD-ECA* está considerado como un modificador prohipertrófico en MCH [35;36]. Mientras el polimorfismo de delección/insercción (D/I) en la ECA ha sido asociado con varios desórdenes cardiovasculares, incluido la hipertrofia del ventrículo izquierdo, en hipertensión no tratada, complicaciones de aterosclerosis y también en MCH [35;36].

Otros elementos del sistema RAAS sugeridos como posibles moduladores de la gran variabilidad en la expresión morfofuncional de la enfermedad afectan al gen de la aldosterona sintasa, el del angiotensinógeno, y el del gen del receptor AT1 de la angiotensina [30;37;38].

Con respecto a la síntesis de *aldosterona*, existen datos que podrían relacionar la enfermedad con modificaciones genéticas, aunque hay estudios con resultados contradictorios [34;37], ya que se sugiere que la aldosterona actúa como un factor proinflamatorio, hipertrófico y profibrótico en el corazón [34;38]. El *polimorfismo -344C/T del gen CYP11B2 (aldosterona sintasa)* en el cromosoma 8q22 también se ha relacionado con el desarrollo de MCH [34].

Otro de los polimorfismos perteneciente al sistema RAAS es el intercambio de una metionina a treonina en el codon 235 del *gen del angiotensinógeno* (AGT) conocida como M235T (resultado de un intercambio T/C en exón 2), y que podría tener influencia en el remodelado cardiaco en pacientes con MCH, aunque no en todos los estudios se ven efectos del genotipo TT del gen del AGT con la hipertrofia ventricular [29].

Con respecto a los Receptores del RAAS el más estudiado ha sido el *Receptor AT1*: así un polimorfismo A/C en posición 1166 en el cromosoma 3q21 (AGTR1) se relaciona con el desarrollo de la hipertrofia [29;30;35].

1.3 HISTOLOGÍA DE LA MCH Y SIGNIFICADO CLÍNICO.

Macroscópicamente, la MCH se caracteriza por una hipertrofia ventricular en ausencia de aumento de la postcarga, que es usualmente asimétrica y afecta diferentes partes de los ventrículos, aunque normalmente predomina una hipertrofia del ventrículo izquierdo [31;39].

La hipertrofia severa del ventrículo izquierdo raramente se documenta en los primeros años de vida de los afectados, pero se pueden observar cambios en la morfología durante la adolescencia (12-15 años), en la que el grosor puede incrementarse dramáticamente (>100%) en pocos meses o años [40;41]. La progresión de la hipertrofia se asocia solo con leves aumentos en las dimensiones de la cavidad, siendo el resultado morfológico final un ventrículo izquierdo típicamente de cavidad pequeña e hipertrofia muy llamativa (Figura 2) [42].

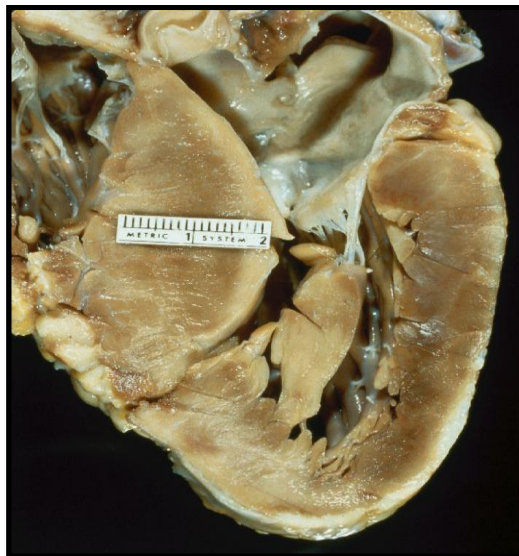


Figura 2. Pieza de necropsia de paciente con MCH. Adaptado de Miocardiopatía hipertrófica: www.lookfordiagnosis.com.

Por tanto, en la población general con MCH, la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) es considerablemente más severa en los pacientes más jóvenes que en los de mayor edad. Es más, hay una relación inversa evidente entre el grosor de la pared ventricular izquierda y la edad [42-44]. En realidad, los grados muy marcados de hipertrofia (>30mm), se han observado principalmente en

pacientes jóvenes (<40 años), mientras que a mayor edad (>55-60 años), por lo general, tienen grados más modestos de hipertrofia y en raras ocasiones, superan grosores de pared de 25mm. No se conoce exactamente el por qué de esta relación edad/hipertrofia, aunque bien podría explicarse con el mayor índice de muerte prematura en los pacientes jóvenes con HVI severa, o bien por un proceso de adelgazamiento parietal gradual, quizás producido por una fibrosis progresiva [42;45].

En diversas enfermedades cardíacas se ha demostrado la existencia de un proceso reparador del tejido dañado, conocido como “remodelado cardíaco”. Dicho “remodelado” da lugar a cambios en el grosor de la pared y tamaño de la cavidad. [46].

Se piensa que los cambios mayores en la morfología del ventrículo izquierdo son el resultado de un aumento en la masa de células musculares cardíacas, a través de un proceso de hipertrofia e incluso hiperplasia celular, así como un incremento del volumen de colágeno intersticial [47]. Por tanto microscópicamente, se considera la MCH como una enfermedad familiar caracterizada morfológicamente por hipertrofia inexplicada y por presentar desalineación de los miocitos “disarray” [48], fibrosis intersticial [49] y enfermedad de pequeño vaso intramiocárdico [50]. El término “disarray” o desalineamiento, describe la característica histológica propia de la MCH en la que se observan zonas de miocardio en la que los miocitos adyacentes se encuentran orientados entre sí de forma oblicua o perpendicular. (Figura 3).

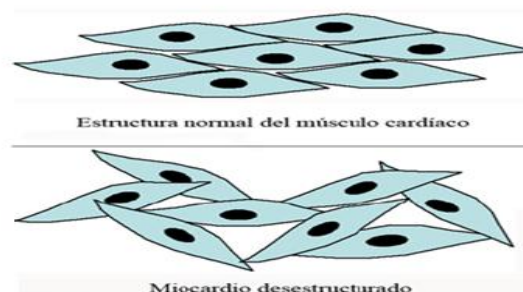


Figura 3. Desorganización de las miofibrillas cardíacas. Adaptado de Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy: The Facts. William McKenna. Cardiomyopathy Association, 2002.

El “disarray” de los miocitos es una característica de la MCH que aparentemente, precede a la hipertrofia y la fibrosis [39;46]. El alto grado de “disarray” observado en la MCH obstructiva es distintivo y envuelve grandes zonas de la pared del ventrículo izquierdo [51;52].

La fibrosis es un componente muy importante en la MCH, así los exámenes histológicos demuestran un incremento del tejido conectivo entre células individuales y grandes depósitos de colágeno y fibronectina [53]. De igual modo, la distribución y severidad de la fibrosis puede ser bastante variable, así por ejemplo, la fibrosis es mayor por debajo del endocardio y más prominente en el área del septo interventricular en comparación con las paredes de un ventrículo izquierdo normal [54] (Figura 4).

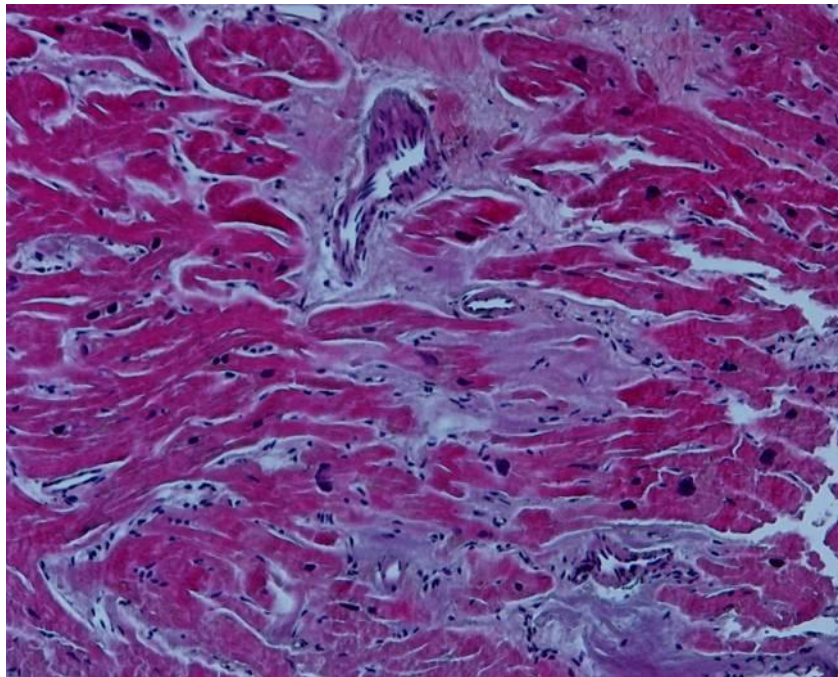


Figura 4. El aspecto histológico muestra desorganización, hipertrofia extrema y fibrosis intersticial características de la MCH, además de un incremento del grosor de la pared vascular de los vasos intramiocitarios. Adaptado de Orenes-Piñenroy cols. Med Chem. 2011 [55].

También se ha observado la presencia de anomalías en las arterias coronarias intramurales y en las arteriolas del subendocardio en las autopsias de sujetos con MCH. Las paredes de los vasos intramurales, especialmente en el septo ventricular, son más gruesas y el lumen frecuentemente más estrecho [54;56;57]. Existe por lo tanto, hipertrofia de la íntima y alteración estructural de las células del endotelio, ofreciendo un sustrato morfológico para el desorden funcional del

endotelio [58;59]. Estos vasos anormales aparecen dentro de las áreas de tejido fibrótico o muy estrechamente ligado a estas áreas.

Varnava y cols. [51] analizaron las características histológicas procedentes de necropsias o corazones explantados, cuantificando la presencia de “disarray”, fibrosis y enfermedad de pequeño vaso. Observaron que la variación del grado de “disarray” dentro del mismo corazón fue amplia y seguía una distribución parcheada de predominio en las zonas de hipertrofia, sobre todo en las formas de hipertrofia menor de 20mm. Además, la fibrosis se relacionó proporcionalmente con el grado de hipertrofia y con la dilatación del ventrículo izquierdo y se relacionó fibrosis a mayor edad y sexo masculino predominantemente. En cuanto a la enfermedad de pequeño vaso, no se relacionó con la edad ni sexo y los corazones con mayor hipertrofia presentaron cambios más extensos. Por tanto plantean que los pacientes con MCH en fase dilatada, presentan significativamente menos “disarray”, probablemente como resultado de la pérdida de miocitos y la sustitución por tejido fibrótico. Además en los pacientes estudiados con hipertrofia masiva se vio que tenían una edad inferior a 30 años, sugiriendo que la existencia de una HVI masiva es un factor de riesgo para la muerte prematura. Puesto que la fibrosis y no el “disarray” se asocia a hipertrofia en este trabajo, se concluye que tal vez la muerte esté en relación con la primera.

Por otro lado, la edad tuvo una relación inversa a la magnitud del “disarray” encontrado, sugiriendo un aumento del riesgo de MS en los pacientes con “disarray” extenso. La ausencia de asociación entre la magnitud de la hipertrofia y el “disarray” encontrado, no permite concluir que uno sea consecuencia de la existencia del otro, en contra de lo publicado en otros estudios [60].

Por tanto es importante destacar la gran heterogeneidad en la distribución de las alteraciones histológicas, no solo entre diferentes pacientes sino dentro del mismo corazón. Diferencias autocrinas locales a través de la modulación genética y producción de factores de crecimiento podrían explicar este fenómeno.

1.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA MCH.

Mientras que la etiología de la MCH ha sido ampliamente estudiada, su patogenia no se entiende completamente, ya que todo el conocimiento acumulado en gran parte se ha obtenido de modelos animales. De hecho, los defectos iniciales causados por las proteínas mutantes son diversos y se cree que existe un modo común de patogénesis y en última instancia convergen en deteriorar la función del miocito cardíaco [61].

En estudios funcionales *in vitro* se ha demostrado que en portadores de mutaciones relacionadas con MCH, la función del sarcómero se altera primero por la disminución de la actividad de filamento translocado o la fuerza, que conduce a una reducción de la producción de energía. Por otra parte, puede aumentar la tasa de motilidad *in vitro* de deslizamiento de los filamentos o la fuerza [62].

Los cambios moleculares subyacentes a estas observaciones parecen variar e incluyen una reducción de la cinética de entrecruzamiento [63], menor actividad ATPasa, sensibilidad alterada del calcio (Ca²⁺) [64-66], atrofia del miocito [66] y problemas del acoplamiento excitación-contracción [67]. Estos puntos en común y la diversidad de los mecanismos moleculares y celulares podrían estar implicados en la patogenia de los fenotipos finales de MCH vistos clínicamente [61].

Se desconoce aún cómo una mutación de una proteína sarcomérica y el defecto funcional observado están vinculados al desarrollo de las características microscópicas de MCH. Se han propuesto varias hipótesis [31;63;68] que sugieren el hecho de que mutaciones de la MCH inducen defectos funcionales en la contractilidad del miocito, así como producir disfunción sistólica y diastólica que inducen un aumento del estrés parietal, una reducción del volumen de eyección y, en consecuencia, una activación de factores tróficos y mitóticos de estrés (tales como ACE1, angiotensina II, IGF-1, TGF- β , TNF- α , IL-6 y endotelina) [31]. Estas moléculas promueven la entrada de Ca²⁺ en las células y la activación de vías de transcripción que conducen a los diversos fenotipos histológicos y estructurales de MCH incluyendo hipertrofia cardíaca, fibrosis intersticial y “disarray” del miocito [61]. Por tanto los primeros intentos para explicar la patogenia de MCH sugirieron que la incorporación de proteínas sarcoméricas mutantes deprimen la función

contráctil, y producen la activación posterior de respuestas neuroendocrinas y mecánicas que llevan a una hipertrofia compensatoria (Figura 5)[31;69].

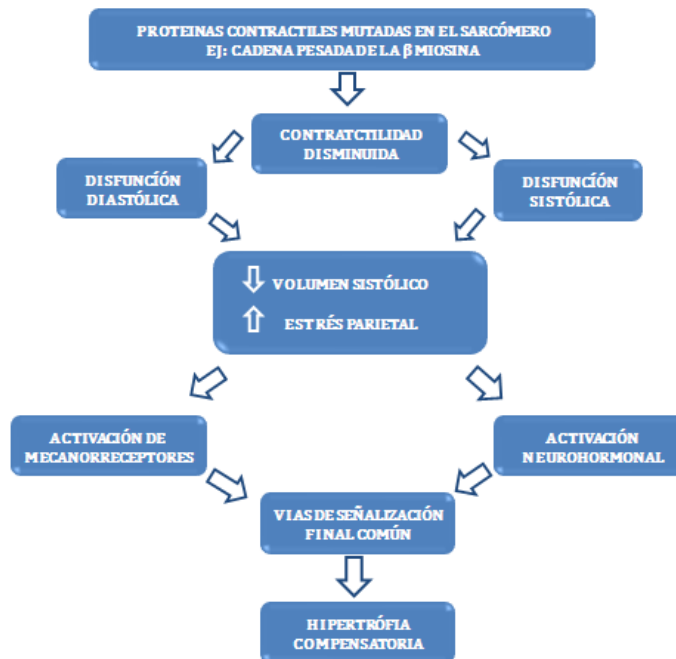


Figura 5. Modelo convencional mediante el cual mutaciones que conllevan hipocontractilidad podrían desencadenar una hipertrofia compensatoria en miocardiopatía hipertrófica (MCH). Adaptado de Ashrafian H. y cols., *Trends in Genetics*. 2003.

El problema de esta hipótesis recae en el hecho de que no todas las mutaciones producen hipocontractilidad, como las mutaciones de MCH en algunas proteínas reguladoras de filamentos delgados (por ejemplo, Troponina I y tropomiosina) que aumentan realmente la fuerza de contracción [70;71]. Por tanto, la disminución de la contractilidad *per se* no puede ser el único estímulo que derive en hipertrofia. En un modelo alternativo donde hay un aumento en la fuerza de la contracción, la hipertrofia inducida ocurre directamente como consecuencia de la hipercontractilidad [62].

Por otro lado, la hipertrofia de la MCH es característicamente asimétrica y tiende a ser mucho más grave que la hipertrofia concéntrica que aparece por el aumento de la carga en el corazón (por ejemplo, en la hipertensión). Corroborando los datos biofísicos e índices ecocardiográficos en portadores de la mutación que

todavía no tienen hipertrofia, revelan un engrosamiento más que una contractilidad disminuida, argumentando en contra de la hipótesis compensatoria [72]. Además se observa en MCH que normalmente sólo se vuelve aparente después de la pubertad y progresa lentamente, y con algunas mutaciones, la enfermedad sólo se manifiesta en edad adulta. Estos patrones no se explican fácilmente para hipertrofia compensatoria como cuando las proteínas mutantes están presentes desde el nacimiento [69].

El modelo final que puede explicar la hiper- e hipocontractilidad observados en ambos modelos anteriores es la hipótesis del "compromiso energético" [69] que propone para conciliar la falta de consistencia en las anomalías contráctiles en MCH, que la disfunción observada en MCH se debe al aumento de la demanda de energía debido a la ineficiente utilización de ATP en el sarcómero. El aumento de la demanda pone en peligro la capacidad de los cardiomiocitos para mantener los niveles de energía en compartimentos subcelulares responsables de la contracción y funciones hemostáticas críticas, tales como la reabsorción de calcio. Esta disfunción del miocito conlleva a hipertrofia. Por ejemplo, la miosin ATPasa utiliza al menos el 70% de la hidrólisis del ATP en el miocito cardíaco y perturba su propio motor o su regulación alterando la eficacia del uso de ATP por el sarcómero [68].

En los pacientes con MCH, hay una reducción de la fosfocreatina y la proporción de ATP, que es un indicador del estado energético del músculo cardíaco. Esa utilización ineficiente de ATP se traduce en la necesidad de producir más energía para la misma cantidad de fuerza. Por ejemplo, en un modelo murino de α -MHC403/+ de MCH, la demanda de más ATP para producir contracción del miocito lleva a un agotamiento de este, afectando a la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA) y conduciendo a la acumulación de calcio en el citosol (Figura 6) [67].

Diversos estudios fundamentan que como consecuencia de la disminución de ATP disponible para mantener la recaptación normal de calcio, se produce un aumento del Ca^{2+} citosólico, activando señales de transcripción dependientes de Ca^{2+} [la más importante parece ser calcineurina y los factores de transcripción

NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados) y MEF-2 (factor potenciador de miocito)] llevando a hipertrofia y fibrosis (Figura 6) [73-75].

Por tanto, la homeostasis del Ca^{2+} en el sarcómero es de gran importancia en la patogenia de MCH por asociarse a un aumento del calcio intracelular debido a:

- depleción energética (del ATP) en el miocito que conlleva una alteración del equilibrio entre el retículo sarcoplásmico y el citoplasma celular.
- proteínas sarcoméricas mutadas necesitan más ATP para producir la misma fuerza de contracción.

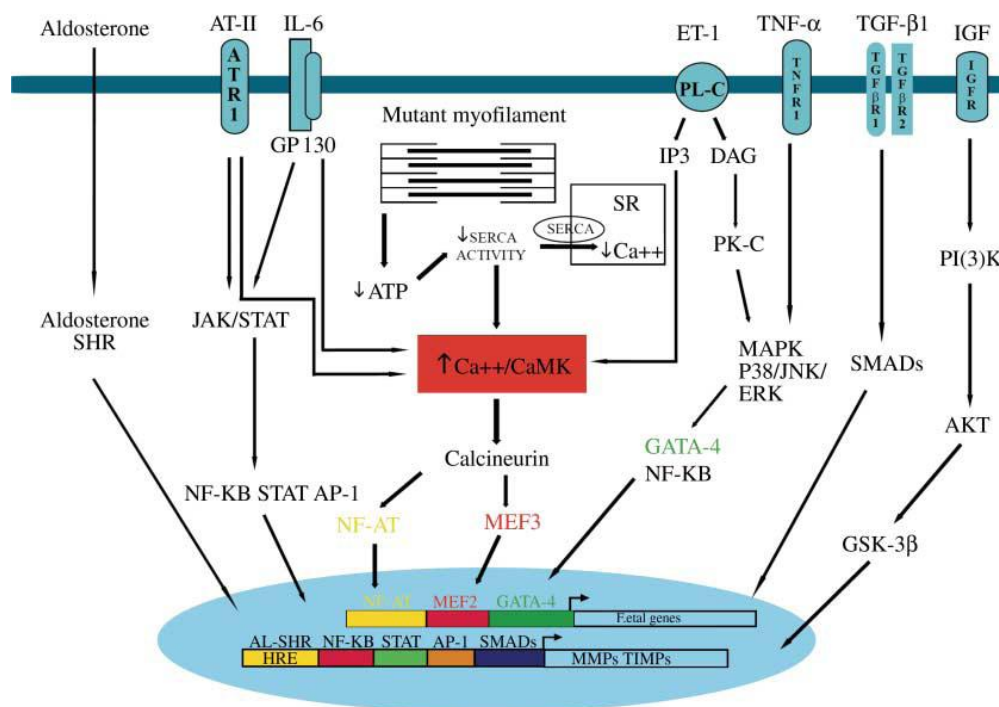


Figura 6. Esquema mostrando en resumen algunas de las vías de señalización conocidas en hipertrofia y fibrosis. El Calcio juega un papel central en la patogenia de la MCH. El aumento de Ca^{2+} intracelular podría ser debido a dos mecanismos diferentes. Por un lado, siguiendo la teoría del agotamiento de la energía, las proteínas mutantes sarcoméricas utilizarán más ATP para producir la misma fuerza de contracción. Por lo tanto, pondrá en peligro la recaptación de calcio por el transportador del SERCA (Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico) en el retículo endoplasmático y más calcio estará disponible dentro de las células. Por otro lado, la activación de varias clases de receptores diferentes conducen a un aumento de calcio intracelular; incluyendo angiotensina II, endotelina-1, TNF- α y IL-6 y sus vías de señalización: la cascada de la proteína quinasa (MAPK), proteína quinasa C (PKC) y la fosfatidil inositol quinasa. Este aumento de calcio intracelular modula la transcripción a través de la modificación de los factores nucleares de linfocitos T activados (NFAT), factor potenciador de miocito (MEF2) que inducirá la hipertrofia a través de la activación de isoformas fetales de proteínas. Las mismas moléculas anteriormente mencionados además de aldosterona y TGF- β activarán las vías que modulan la producción de factores de transcripción como Factor nuclear kappa B (NF-Kb), activador

de la proteína-1 (AP-1), señal de transductor y activador de la transcripción (STAT) que estará integrados y eventualmente impulsarán la transcripción de MMPs y TIMPs, implicados en la remodelación de la matriz extracelular, el SERCA, la bomba de calcio, calmodulina, etc. Adaptado de Cambroner y cols. Eur Heart J 2009 [61].

Para explicar la naturaleza asimétrica de la hipertrofia, que es uno de los rasgos más característicos de MCH, varios modelos teóricos asumen una tensión de la pared miocárdica uniforme, apoyando estudios que muestran mayores demandas de energía en el septo ventricular [76]. Un déficit severo de energía también pondrá en peligro la función de transportador de iones, necesaria para la actividad electrofisiológica normal. Esto proporcionaría una heterogeneidad de los potenciales de membrana y dejar al miocardio vulnerable a arritmias que conducen a muerte súbita en MCH. Además, la elevación citosólica del calcio es un potente estímulo para estas arritmias ventriculares. Por tanto, este compromiso energético sería más marcado en momentos de mayor carga de trabajo en el corazón y esto podría explicar el aumento del riesgo de MS observado durante el esfuerzo, especialmente en deportistas de competición [69].

Como los defectos de las proteínas contráctiles están presentes desde el nacimiento en pacientes con MCH, es difícil explicar porqué la hipertrofia generalmente no aparece hasta bien entrada la adolescencia o, en algunas mutaciones, hasta en una edad adulta tardía. Sin embargo, el rápido crecimiento que tiene lugar en la pubertad aumenta el tamaño cardíaco y las demandas metabólicas, mientras que los niveles de fosfocreatina y ATP miocárdicos declinan con la edad debido principalmente a la disfunción mitocondrial [77].

Por tanto, a nivel biofísico, las mutaciones de los miofilamentos (sarcómero) generalmente aumentan la sensibilidad al Ca^{2+} , la fuerza máxima de producción y la actividad ATPasa. Estos defectos, en última instancia, parecen converger en una deficiencia de energía y alteran el manejo del Ca^{2+} como principales rutas comunes hacia los rasgos anatómicos (hipertrofia, “disarray” y fibrosis) y características funcionales (señalización patológica y disfunción diastólica) característicos de la MCH [78].

1.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DE LA MCH:

La mayoría de los afectados son asintomáticos y el diagnóstico se produce de forma casual o tras un estudio familiar [79;80]. La sintomatología de esta enfermedad es variable y más frecuente, aunque no exclusiva, en las formas obstructivas [81]. A pesar de que la disnea, el angor o las palpitaciones condicionan la clase funcional de los afectados, excepto el síncope, ninguno de los síntomas ha mostrado ser predictor de la aparición de MS [82]. La MS es la primera causa de fallecimiento entre los pacientes afectados de esta enfermedad [83;84]. Un porcentaje menor de pacientes desarrolla disfunción y dilatación ventricular izquierda de la que se deriva la muerte o el trasplante por fallo cardíaco [45;85-87].

Hasta la introducción del ecocardiograma en la práctica clínica diaria, el diagnóstico de la MCH se basaba en la presencia de alteraciones electrocardiográficas asociadas a síntomas y/o antecedentes familiares. Los hallazgos electrocardiográficos típicos de la MCH son: ondas Q (denominadas de pseudonecrosis) en las derivaciones que enfrentan la cara inferior (II, III, AVF), hipertrofia ventricular y presencia de ondas T negativas. Con menor frecuencia aparecen bloqueos de rama, QT largo o pre-excitación (Figura 7). No es infrecuente que un electrocardiograma (ECG) patológico sea la primera manifestación de la enfermedad en los pacientes asintomáticos [18]. Estos hallazgos plantean el diagnóstico diferencial con la enfermedad coronaria aguda, infartos antiguos o hipertrofia de otro origen (estenosis aórtica, corazón de atleta...).

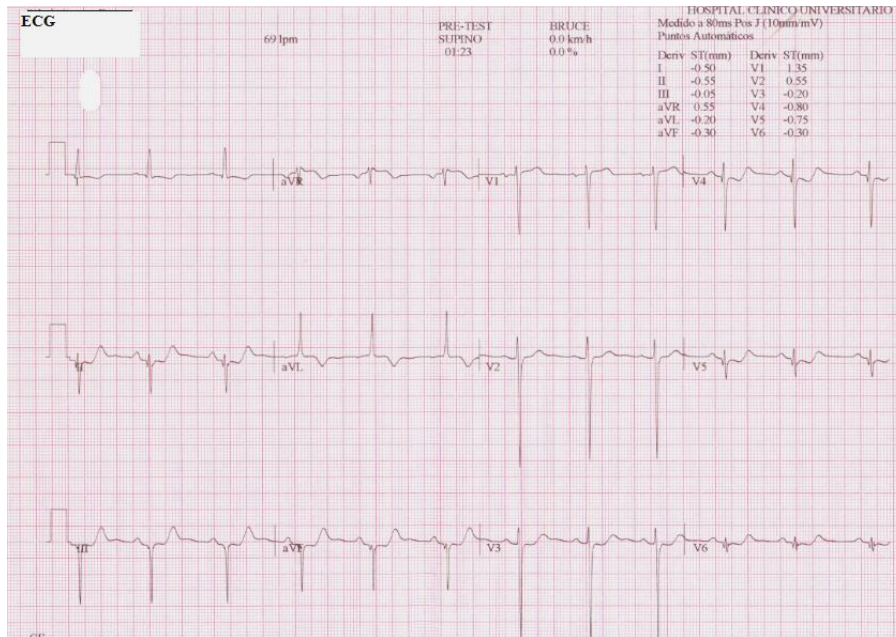


Figura 7. Electrocardiograma en MCH: Es característica la presencia de Ondas Q que simulan un infarto de miocardio antiguo que pueden estar presentes en cualquier derivación. ECG obtenido de pacientes del estudio en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Actualmente el diagnóstico de MCH se basa en la presencia de HVI, corregida por edad y masa corporal, en ausencia de otro proceso que lo justifique, o en la presencia de anomalías del ECG y alteraciones ecocardiográficas en familiares de primer grado de pacientes diagnosticados de MCH [80].

Igualmente, el ecocardiograma permite detectar otras dos alteraciones que característicamente están presentes en algunos pacientes afectados de MCH: el gradiente de obstrucción en el tracto de salida (GTSVI) y el movimiento sistólico anterior de la válvula mitral o SAM. Aunque tradicionalmente asociado a la MCH, hay que decir, no obstante, que el gradiente en el tracto de salida y el SAM no son exclusivos de esta patología [88], en la transposición de los grandes vasos [50] y en ocasiones en el prolapso de la válvula mitral [7]. El ecocardiograma permite además evaluar los beneficios del tratamiento médico, quirúrgico o percutáneo de la MCH, valorando los efectos que la terapia empleada ejerce sobre el gradiente dinámico.

La radiografía de tórax tiene poca utilidad en el diagnóstico de esta patología. No hay hallazgos específicos que apoyen el diagnóstico, por lo que resulta básica la realización de un ecocardiograma en estos pacientes.

Habitualmente, se suele apreciar hipertrofia ventricular en la ecografía cardíaca, siendo esta hipertrofia, la característica fundamental a nivel de diagnóstico, en la últimas décadas [89;90](Figura 8). No obstante, es la presencia de fibrosis y la desestructuración del miocardio el hallazgo definitorio de la enfermedad, incluso dentro de una misma familia. Así, podemos observar pacientes sin hipertrofia evidente o pacientes con hipertrofia en distintas localizaciones y magnitudes [51;89-91]. La distribución más típica es la de predominio de septal asimétrico, pero son también frecuentes las formas concéntricas y las apicales [92;93].

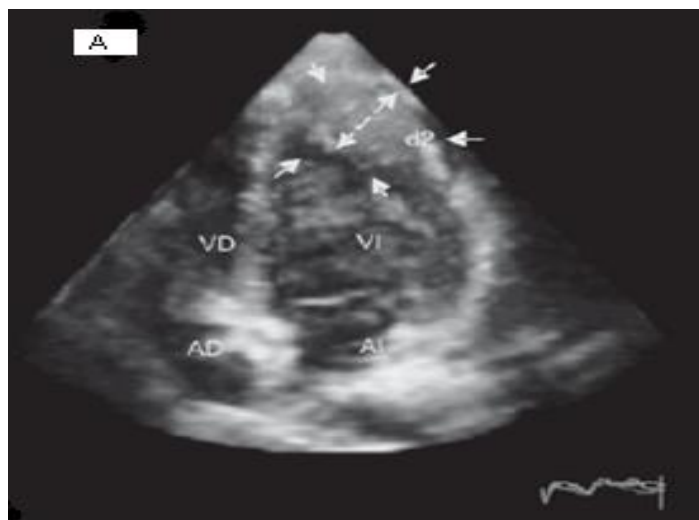


Figura 8 A) Ejemplo de ecocardiografías en pacientes con MHC. A) Hipertrofia desproporcionada del segmento apical. Adaptada de “Miocardiopatía hipertrófica apical con obstrucción medioventricular y necrosis apical”, Fernández, M. Revista Española de Cardiología Vol. 54. Núm. 04. Abril 2001.

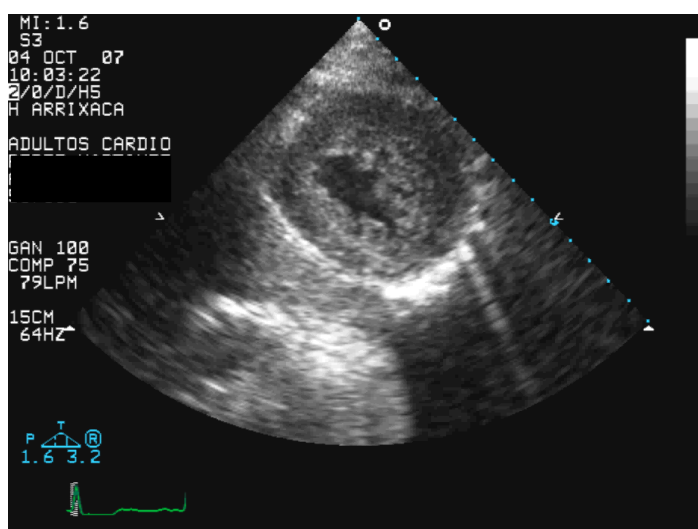


Figura 8 B) Estudio ecocardiográfico: imagen en el plano paraesternal corto del VI. Imagen obtenida de pacientes del estudio en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

A las técnicas ecocardiográficas tradicionales, se le ha sumado en los últimos años otras nuevas que han permitido afinar aun más este diagnóstico, como la Ecocardiografía Doppler. Los pacientes afectados de MCH con repercusión cardiaca presentan alteraciones en el patrón de llenado en el Doppler tisular (DTI) [94] y alteraciones en la señal de retrodispersión [95]. Además de los hallazgos descritos, la mayoría de los pacientes presentan alteraciones en el patrón de llenado mitral compatibles con anomalías de la función diastólica. Típicamente se aprecia una onda de llenado mitral precoz (onda E) disminuida, acompañada de una onda de contracción auricular aumentada (onda A) lo que causa una inversión del cociente E/A [79] (Figura 9). En un porcentaje importante (25%), es posible identificar gradiente sistólico dinámico en el tracto de salida del ventrículo izquierdo (GTSVI), afectación de la estructura valvular mitral o ambas alteraciones [87;96].

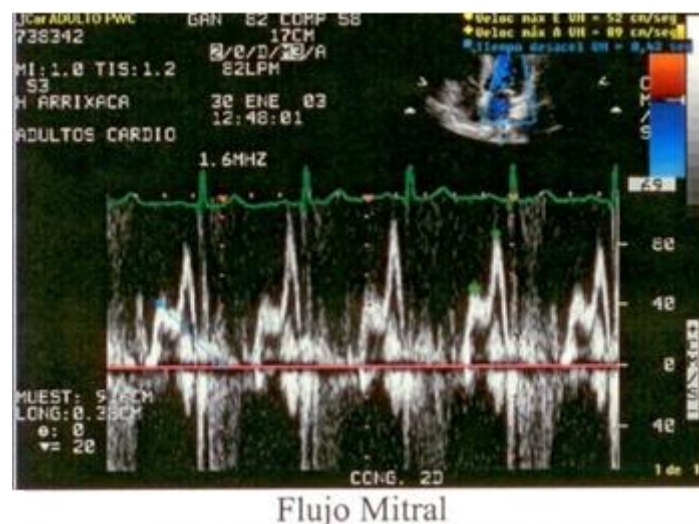


Figura 9. Ecocardiografía Doppler: Los pacientes afectados de MCH presentan alteraciones en el patrón de llenado en el Doppler tisular (DTI). Imagen obtenida de pacientes del estudio en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Otra prueba complementaria utilizada es el registro ECG tipo Hólder que permite la detección de bradiarritmias, en muchos casos asintomáticas. Además permite el hallazgo de taquiarritmias, la más frecuente la fibrilación auricular (FA), y la presencia de taquicardia ventricular no sostenida (TVNS), en una monitorización de 24 o 48 horas ya que constituye un factor de riesgo de muerte súbita en pacientes con MCH. Recientemente también se plantea la eficacia de la

monitorización prolongada con hólter de 7 o 14 días para la detección de TVNS y tipificar las características de la misma, observándose una mejora notable de la capacidad de detección de TVNS en pacientes con MCH. Esto podría ayudar a estratificar el riesgo de MS en esta población [97].

Una técnica recientemente introducida para el estudio de la MCH, es la cardiorresonancia magnética (CRM) [98]. Además de un detallado estudio morfofuncional, la administración intravenosa de gadolinio permite estudiar la presencia de áreas de realce tardío (RTG). Tras 10 minutos de su administración, el gadolinio permanece en la matriz extracelular y se acumula en áreas de fibrosis y, posiblemente en menor grado, en áreas con importante desestructuración [99]. Esto permite estudiar la fibrosis in vivo. Un estudio de Romero-Puche y cols. asoció el RTG y su cuantificación (porcentaje de tejido realzado) en pacientes con MCH a una peor capacidad de esfuerzo, estimada mediante ergometría sobre cinta sin fin [100] (Figura 10). Este estudio refuerza la tesis de que la fibrosis miocárdica determinada in vivo mediante RTG en CRM, participa en la limitación funcional de los pacientes con MCH de forma independiente de otros factores, como podrían ser el grosor parietal ventricular, el gradiente, el diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo (DTSVI) o la presencia de FA.

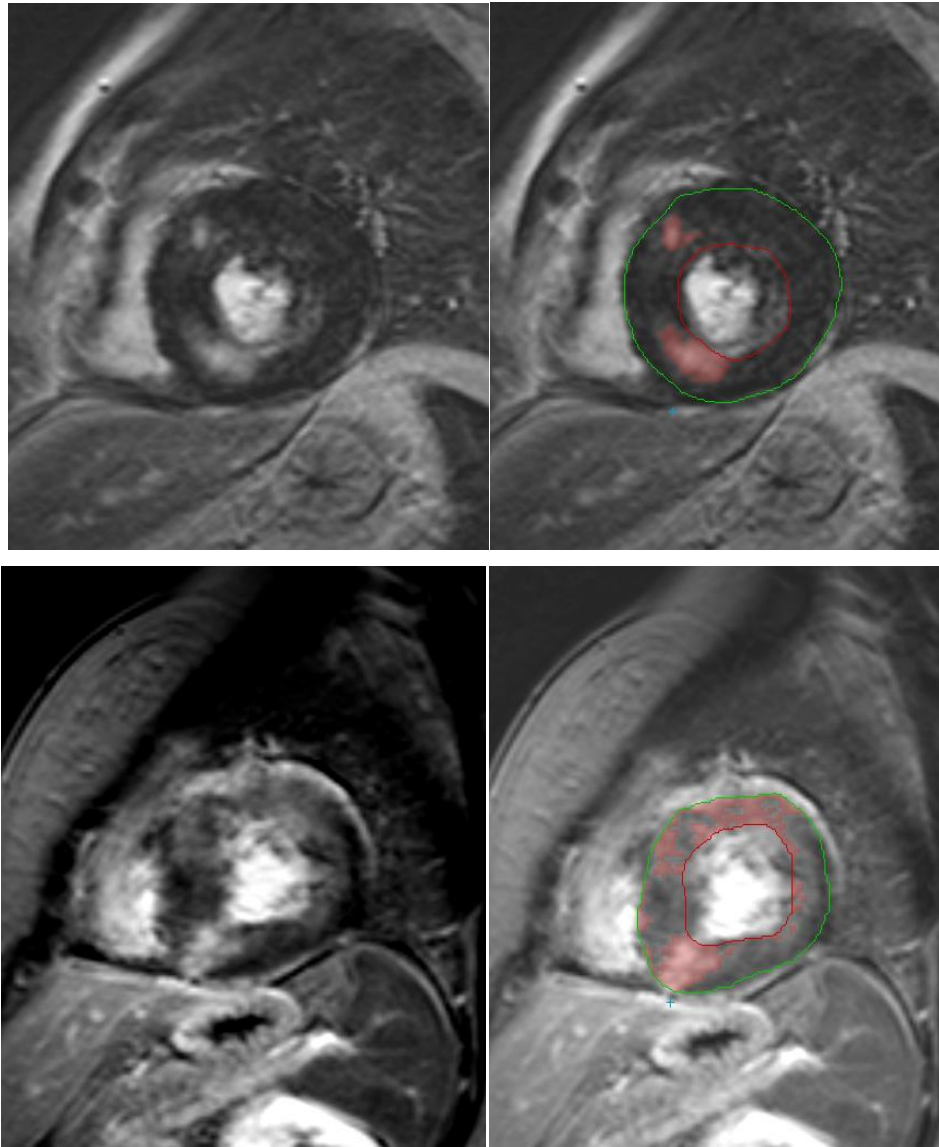


Figura 10. Imágenes del proceso de cuantificación del tejido afectado por realce tardío con gadolinio (RTG). A (izq): antes del procesado. B (derecha): las áreas que presentan una intensidad de señal dos desviaciones estándar por encima de los valores de señal en una muestra de tejido miocárdico sano son seleccionadas automáticamente (indicado en rosa). Obtenidas de pacientes del estudio en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca [101].

Como se puede observar, la clínica del paciente, el electrocardiograma y las técnicas de imagen son hasta el momento la base para establecer el diagnóstico de MCH.

1.6 EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD: CLÍNICA Y PRONÓSTICO EN LA MCH

El abanico clínico de la MCH es muy amplio. Algunos pacientes permanecen asintomáticos durante toda la vida, mientras que otros presentan síntomas severos y progresivos (16). En ocasiones la primera o única manifestación de la enfermedad es la MS.

Como se menciona anteriormente, la enfermedad se describe en la infancia de forma ocasional y es en la adolescencia cuando, coincidiendo con el desarrollo corporal, realmente emerge como patología. Aparece un cambio dramático entre los 12 y los 15 años que permite observar aumentos en grosor superior al 100% en pocos meses de seguimiento ecocardiográfico [40;41;102]. Suele ser una fase asintomática en la que el aumento de grosor no va acompañado de aumento de las dimensiones del VI, por lo que la cavidad se ve reducida y suele aparecer desarrollo de gradiente dinámico en el tracto de salida del VI, desplazamiento de la válvula mitral, contribuyendo todo ello a la aparición de obstrucción [103]. El hecho de que los cambios en la hipertrofia del VI ocurra en esta etapa de la vida, podría ser resultado de la actuación de importantes estímulos biológicos que inducen un incremento importante en la masa del miocito, posiblemente acompañado de hiperplasia y aumento en el colágeno intersticial [104].

En contra de lo descrito en la adolescencia, los cambios en la edad adulta de la morfología cardiaca del VI hipertrófico observados presentan paradójicamente una tendencia al adelgazamiento, dilatación y pérdida de función contráctil, con una incidencia del 10-15% [45;105]. Estos pacientes evolucionan con el patrón característico de la enfermedad, presentando hipertrofia asimétrica con volumen ventricular normal o reducido e hipercontractilidad, y evolucionan a una forma con grosor normal o ligeramente engrosado, una cavidad ventricular aumentada y disfunción sistólica ventricular izquierda [86]. La función ventricular izquierda disminuye de valores de fracción de eyección >70% hasta inferiores al 45%. Mientras tanto, se va desarrollando la hipertrofia ventricular que junto a las alteraciones hemodinámicas presentes desemboca en isquemia miocárdica, necrosis de los miocitos y aparición de áreas de fibrosis que posteriormente

llevarían a la fase de disfunción sistólica mencionada [85]. Esta sucesión de factores podemos verla resumido en la figura 11.

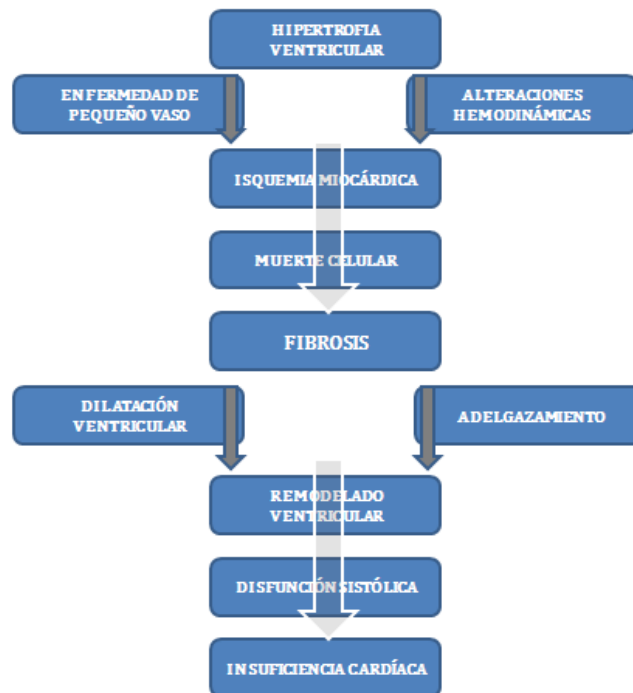


Figura 11. Hipótesis de la patogenia de la disfunción sistólica en la MCH. Adaptado de Maron BJ y cols. *Am. J. Card.* 1998 [85].

A la hora de valorar la evolución natural de la MCH, se ha producido tradicionalmente un importante sesgo. Las primeras series que valoraban la historia de la enfermedad se basaban en grupos de pacientes procedentes de centros hospitalarios de referencia. Generalmente eran pacientes muy sintomáticos, con hipertrofia marcada, antecedentes personales y familiares de MS [39;106]. En estos trabajos se comunicaban una alta incidencia de episodios de arritmias ventriculares y MS, con unas tasas de mortalidad que oscilaban entre el 2% y el 4% anual.

En los últimos años se han publicado los resultados de series en las que se ha seguido la evolución de pacientes incluidos en un ambiente no hospitalario, quedando de manifiesto la naturaleza más benigna de esta enfermedad, con una mortalidad en torno al 1% por año [39].

La evolución maligna de la MCH viene marcada por la incidencia de MS, y por la evolución hacia la insuficiencia cardiaca con su morbilidad y mortalidad

asociadas a ella asociada. Claramente la evolución de la enfermedad es diferente en pacientes asintomáticos en contra de aquellos que presentan síntomas. En estos pacientes asintomáticos la mortalidad es significativamente menor. La incidencia anual de MS es también significativamente menor [107], además dicha incidencia y mortalidad fue mayor en aquellos pacientes con taquicardias ventriculares en el registro Holter ambulatorio, con evidencia de isquemia en los estudios no invasivos, con incremento del intervalo QT corregido y con la presencia de los trayectos coronarios intramiocárdicos [39].

La constatación de episodios de MS en periodos de reposo ha conducido a la búsqueda de aquellos factores que permitan predecirla [108]. Las principales causas de MS se pueden ver en la figura 12.

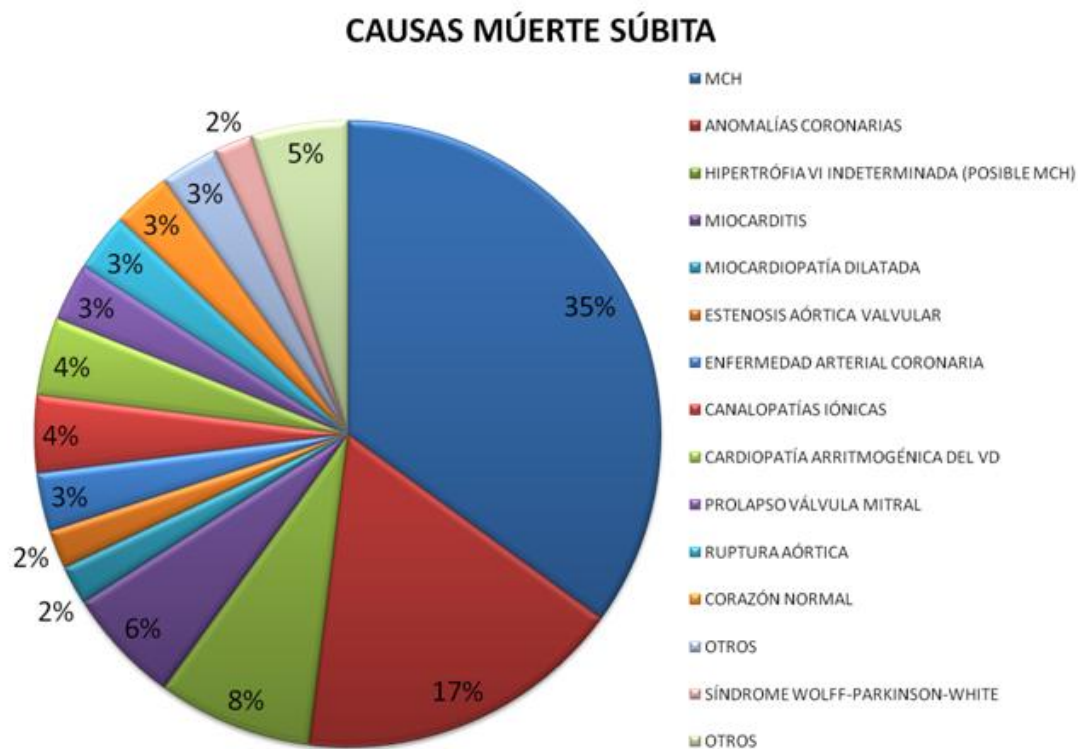


Figura 12. Causas de muerte súbita en atletas. Adaptado de Maron BJ y cols. Circ J. 2010.[109].

Existen múltiples aspectos controvertidos relacionados con el manejo clínico de esta enfermedad, siendo el principal la identificación y tratamiento de los pacientes con alto riesgo de MS. La mayoría de casos de MS se produce en la infancia y adolescencia, alcanzar una mayor edad no confiere inmunidad a una

muerte repentina. La MCH es la causa más común de muerte cardiovascular en los jóvenes, incluyendo atletas de competición [110].

Un hecho que dificulta la estratificación del riesgo de MS, es que una gran mayoría de pacientes con MCH (55%) presentan alguno de los factores de riesgo reconocidos a esta enfermedad y es extremadamente raro que estos sufran episodios de MS. Por tanto, el conjunto con mayor riesgo de MS parece comprender alrededor del 10 al 20% de la población con MCH [111].

Se han identificado múltiples predictores de riesgo de MS en la MCH, entre los que destacan: la presencia de historia familiar de MS, antecedentes de síncope recurrente en pacientes jóvenes, presencia de taquicardia ventricular no sostenida en el Holter, respuesta anormal de la tensión arterial en la prueba de esfuerzo, hipertrofia con grosor mayor de 30 mm y obstrucción dinámica con gradientes elevados (Figura 13). El principal problema del uso de estos factores de riesgo, es su bajo valor predictivo positivo [112].



Figura 13. Factores de riesgo de muerte súbita en MCH. Adaptado de Jacoby D y cols. *Genetics of inherited cardiomyopathy. Eur Heart J* 2012 Feb;33(3):296-304 [28].

La descripción del perfil de paciente de riesgo en MCH es probablemente incompleta, y ningún factor de riesgo único es capaz de constituir una estratificación de riesgo de MS en los pacientes.

Mientras que el riesgo absoluto de MS es bajo, sigue siendo una causa importante de muerte en los jóvenes [7]. Los niveles predictivos de padecer MS están establecidos mediante el número y la gravedad de los factores de riesgo que

presenten los pacientes [111]. La evaluación familiar en MCH puede servir para identificar a individuos afectados que, aunque estén asintomáticos, corren riesgo de MS.

En cuanto a la presencia de estos factores de riesgo en los pacientes con MCH, una minoría significativa (2-5%) puede desarrollar fallo cardíaco (HF) por una combinación de fallo de la bomba o una fisiología restrictiva, que puede complicarse aún más por arritmia auricular [79]. La disfunción sistólica del miocardio isquémico tiene lugar de forma rápida tras la reducción brusca o la interrupción del flujo coronario. El grado de reducción de la función sistólica del miocardio isquémico está en relación con la severidad y duración de la reducción del flujo coronario. Con grados leves de isquemia, la reducción de la función sistólica es leve y consecuencia de una función reducida en el subendocardio de la región isquémica. Con reducciones severas del flujo coronario e isquemia miocárdica transmural puede apreciarse, mediante ecocardiografía, una motilidad parietal aquinética o diquinética en la zona isquémica.

Otros factores que se observan en pacientes con MCH sería la presencia de obstrucción. Es valorada mediante el gradiente del tracto de salida ventricular izquierdo (GTSVI) y se ha visto presente en un 35% de pacientes en reposo, además de que puede desarrollarse durante el ejercicio en otra proporción importante de ellos [113]. Los mecanismos de obstrucción se refieren al espesor septal, dimensiones del TSVI y la anatomía de la válvula mitral. Ninguna de estas características tiene una correlación directa con la genética [114]. El grado de deterioro funcional se predice débilmente por la magnitud de la hipertrofia, la obstrucción ventricular u otros marcadores clásicos de severidad de la enfermedad. Además, la presencia de obstrucción del VI se ha visto asociada a peor capacidad funcional y MS, por lo que podría incluirse dentro de un perfil general de factores de riesgo de MS en MCH [115].

También pueden desarrollar FA, que es la arritmia sostenida más común en la MCH. En un 20-25% de los pacientes aparecen episodios paroxísticos o FA permanente, aumentando su incidencia con la edad y están vinculados a una dilatación de la aurícula izquierda [83;116]. La FA es razonablemente tolerada por un tercio de los pacientes y no es un factor independiente de MS [117]. Sin

embargo, la FA se asocia con episodios embólicos (incidencia de 1% anualmente, prevalencia de 6%) y conduce a muerte y discapacidad con mayor frecuencia en edad anciana, así como a una progresiva insuficiencia cardíaca, especialmente cuando la aparición de FA se produce antes de 50 años de edad y se asocia con obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo en reposo [117].

Otra consecuencia es la aparición de insuficiencia cardíaca (IC). Se presenta con síntomas como fatiga, disnea, ortopnea y disnea paroxística nocturna. Característicamente presenta contractilidad normal o supranormal del VI e independiente de si está presente obstrucción del tracto de salida [89;118;119].

Los síntomas de insuficiencia cardíaca relacionada con MCH generalmente no aparecen hasta la edad adulta pero pueden ocurrir a cualquier edad. En cuanto al desarrollo de disnea y peor capacidad funcional en pacientes con MCH, se valora mediante la escala de la New York Heart Association (NYHA) que comprende grados del I al IV. Los síntomas marcados de progresión de enfermedad (atendiendo a clases III y IV de la NYHA) son relativamente infrecuentes, aproximadamente en un 15-20% de la población no seleccionada [18;46].

Por tanto en MCH, se observa, una aparición de sintomatología de origen múltiple, como disfunción diastólica frecuentemente, pero en otros casos también aparece disfunción sistólica. Además es común que participe la obstrucción y la insuficiencia mitral por el SAM, y en otras ocasiones por la FA.

2. DE LA FISIOPATOLOGÍA A LA CLÍNICA: ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA PATOLOGÍA

En la MCH se ha demostrado un remodelado ventricular, con cambios en la matriz extracelular principalmente. Además se ha visto remodelado de la aurícula izquierda directamente relacionado con la aparición de FA [116;120]. Esta no es una estructura pasiva, sino que es una entidad dinámica con gran importancia en el proceso de remodelado que ocurre en diferentes enfermedades cardiovasculares [121]. Las alteraciones en la matriz extracelular podrían desempeñar un papel importante en la génesis de la disfunción diastólica en la MCH, y muy

probablemente en aquellos que desarrollan disfunción sistólica. El depósito de colágeno aumenta la rigidez de la cámara ventricular izquierda y compromete el llenado ventricular durante la diástole. Comparado con controles, el recambio de colágeno en MCH está aumentado, predominando la síntesis de colágeno tipo I y III sobre su degradación. Se asocian por tanto, cambios en la actividad de las metaloproteinasas (MMP), principales enzimas encargadas de la degradación de los componentes de la matriz y sus inhibidores (TIMPs) [122]. Se ve como la fibrosis, valorada mediante resonancia magnética, está relacionada con el remodelado ventricular, la hipertrofia, la aparición de taquicardia ventricular [101] y el deterioro en la clase funcional. Además los valores de MMP tipo 9 (MMP-9) están asociados de forma independiente con la fibrosis [123]. La cuestión aún no aclarada consiste en saber si, la alteración en la matriz intersticial ocurre sólo debido a la activación de fibroblastos en respuesta a factores humorales o mecánicos, sin que haya pérdida de cardiomiocitos o si, por el contrario, se asocia a la muerte celular, estimulando el crecimiento de la matriz extracelular.

Estas cuestiones corroboran una complejidad en el abordaje de esta patología y han llevado a profundizar la búsqueda de herramientas que aporten diferente información como son las técnicas inmunohistoquímicas. Estas técnicas ampliamente estudiadas en MCH [46;124], han permitido la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares ha permitido la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos.

De la valoración de los resultados procedentes de estas técnicas inmunohistoquímicas, puede darse una aproximación al estudio de los mismos determinantes antigénicos a nivel periférico, los conocidos como biomarcadores, que puedan aportar información de la patología de estudio, MCH en nuestro caso.

En la actualidad, aunque se ha realizado un esfuerzo en materia de estudios genotipo-fenotipo en miocardiopatías en general (con el objetivo de complementar algoritmos a utilizar en la práctica clínica, evaluación del diagnóstico y factores de

riesgo), los datos sobre mutaciones específicas no son suficientes como para obtener una completa guía clínica [28]. Por otro lado, el aspecto coste-efectivo de los estudios genéticos está siendo ampliamente discutido últimamente, con el fin de proponer un marco en la aproximación clínica al diagnóstico de miocardiopatías basado en el reconocimiento de los principales síntomas y selección de pruebas especializadas, incluido el análisis genético [125].

3. BIOMARCADORES EN MCH

La medición de biomarcadores plasmáticos ha ofrecido información interesante sobre la fisiopatología y la progresión de diferentes enfermedades y se ha planteado su utilización en la MCH. Los biomarcadores informan sobre diferentes procesos biológicos normales, mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades, y pueden ser extremadamente útiles a la hora de realizar un diagnóstico diferencial, una aproximación para el estudio del riesgo en la evolución clínica o incluso añadir un valor pronóstico a nuestra práctica clínica. Ha existido un gran interés en el estudio y valoración de la utilidad de los biomarcadores en las enfermedades cardiovasculares, siendo mayor su utilización en la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardiaca [126].

Es conocido el interés por el estudio y valoración de la utilidad de los biomarcadores en otras enfermedades cardiovasculares, como cardiopatía isquémica, síndrome coronario agudo o insuficiencia cardiaca, en las cuales la utilidad de los biomarcadores está presente en la práctica clínica. De igual modo, el estudio de nuevos biomarcadores puede complementar a otras herramientas utilizadas, como pueden ser las escalas de factores de riesgo cardiovascular, en la predicción de eventos cardiovasculares en patologías como la FA, síndrome coronario agudo o la propia MCH [61;127;128] .

3.1 BIOMARCADORES DE ESTRÉS PARIETAL: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

El péptido natriurético cerebral (BNP) es un péptido sintetizado predominantemente en el ventrículo izquierdo en respuesta a una elevada tensión de la pared. El BNP es sintetizado y almacenado como una pro-hormona denominada proBNP que, tras la estimulación de los cardiomiocitos (por ej, por dilatación miocárdica), se escinde por una proteasa en la **fracción amino terminal del Péptido Natriurético Cerebral (NT-proBNP)** y la hormona biológicamente activa BNP. Ambos péptidos son liberados a la circulación sanguínea y pueden así determinarse fácilmente [129]. Por tanto, el BNP es una hormona cardiaca secretada principalmente de los miocitos ventriculares en respuesta a la sobrecarga de volumen y de presión causando natriuresis, diuresis, vasodilatación y relajación del músculo liso [130] y está elevado en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria, FA, enfermedad vascular cardíaca y en hipertensión [131].

Las concentraciones plasmáticas de BNP correlacionan positivamente con las presiones de llenado cardiaco, por lo que se comporta como un excelente marcador de presencia de disfunción del ventrículo izquierdo y estrés anormal de las paredes del ventrículo izquierdo [132]. Los valores elevados de BNP o de NT-proBNP reflejan aumento del estrés parietal causado probablemente, por sobrecarga de volumen o presión y activación neurohumoral en cuadros como insuficiencia cardiaca o miocardiopatías. El péptido atrial (ANP) también ha sido estudiado y se ha visto elevado en pacientes con MCH, pero no correlaciona con los síntomas ni los índices ecocardiográficos de disfunción diastólica asociados a la enfermedad [133]. El más estudiado en la MCH ha sido el BNP, con valores incrementados significativamente en comparación con sujetos normales. Así, se ha visto que los valores de BNP correlacionan positivamente con los síntomas de insuficiencia cardiaca, gravedad de la hipertrofia, y signos ecocardiográficos del Doppler de disfunción diastólica del VI [134-136]. Además, correlaciona con la clasificación de la New York Heart Association (NYHA) sugiriendo peor capacidad funcional [131] y presencia de obstrucción ventricular [134]. Se ha observado también como BNP y ANP aparecen significativamente elevados en pacientes con

MCH que muestran evidencia de obstrucción, y además correlacionan positivamente con el gradiente de presión intraventricular izquierda (GTSVI).

Las concentraciones de NT-proBNP fueron posteriormente estudiadas en pacientes con MCH. Así, Thaman R. y cols [131] demostraron la existencia de una relación inversa entre el consumo máximo de oxígeno durante el ejercicio y los niveles de NT-proBNP, siendo así éste un biomarcador útil en la valoración de la gravedad de la enfermedad frente al resto de variables funcionales como clase funcional según NYHA, GTSVI o la fracción de acortamiento. Además los valores de NT-proBNP han sido asociados con un remodelado del VI, lo que sugiere que la NT-proBNP podría ser también utilizada para diagnosticar un remodelado desfavorable del VI en MCH [137].

Por otro lado, se ha explorado también el valor pronóstico de la concentración plasmática de NT-proBNP en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda descompensada donde se observan concentraciones elevadas de NT-proBNP asociadas a mayor riesgo de sufrir eventos clínicos adversos [138].

3.2 BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN

Las citoquinas son proteínas que regulan la actividad de los leucocitos. En la respuesta de fase aguda, citoquinas como la interleucina (IL-1 y IL-6) dirigen la producción de reactantes de fase aguda como la **proteína C-reactiva (PCR)**, que es la proteína de fase aguda clásica de una reacción inflamatoria. Se sintetiza en el hígado y se compone de cinco cadenas polipeptídicas idénticas en forma de un anillo de cinco eslabones con un peso molecular de 105.000 dalton. La PCR es el reactante más sensible de la fase aguda y su concentración aumenta muy rápidamente en procesos inflamatorios. La PCR en complejo activa el sistema del complemento comenzando en la fracción C1q, e inicia la opsonización y fagocitosis de las células penetradas, pero su tarea principal es la fijación y desintoxicación de sustancias endógenas tóxicas producidas por lesiones tisulares. La determinación de PCR sirve para reconocer procesos inflamatorios sistémicos (excepto inflamaciones tales como el lupus eritematoso sistémico y la colitis ulcerosa), para evaluar el éxito del tratamiento de infecciones bacterianas con antibióticos, para

diferenciar entre las formas activa e inactiva de enfermedades con infecciones concomitantes, para evaluar la actividad de enfermedades reumáticas y la eficacia del tratamiento antiinflamatorio o para el reconocimiento precoz de complicaciones postoperatorias, entre otras aplicaciones [139].

Los métodos de determinación tradicionales de PCR tienen un rango de medición de 1 a 260 mg/L y se utilizan cuando se desea analizar la PCR en procesos inflamatorios. Estos no sirven para evaluar riesgo cardíaco, dado que las concentraciones en estos casos son menores a 1 mg/L. Para la utilidad de la PCR como pronóstico de enfermedad cardiovascular, se requiere de los métodos llamados “ultrasensibles” o métodos “de alta sensibilidad” en donde se mide ***proteína C-reactiva ultrasensible (PcRhs)***. Estos métodos presentan una mejora del límite de detección; esto es, la concentración mínima que puede diferenciarse de cero.

La American Heart Association junto con el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) recomendaron la medición de PCR solo en pacientes que presentan un riesgo intermedio de padecer enfermedades cardiovasculares. Si bien la evidencia apunta a que la sola presencia de valores elevados de PCR aumentaría la probabilidad de enfermedades cardiovasculares, todavía está en discusión si es o no un factor de riesgo independiente [140;141]. Diferentes estudios demuestran que la determinación de PCR ultrasensible puede emplearse como marcador predictivo de riesgo de cardiopatía coronaria en personas aparentemente sanas y como indicador pronóstico de recidivas [141;142]. Además la determinación de PCR ultrasensible, ha sido empleada para la detección precoz de infecciones pediátricas y para evaluar el riesgo de enfermedades coronarias [141].

Los biomarcadores inflamatorios más estudiados en MCH han sido la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) [143;144]. Ambos pueden expresarse en el miocardio bajo diversas formas de estrés y son capaces de modular la función cardíaca por diversos mecanismos, incluyendo la inducción de apoptosis, miocardiopatía e hipertrofia del VI en miocitos cardíacos [144;145]. De hecho, la progresiva pérdida de miocitos cardíacos debido a apoptosis contribuiría al deterioro general de la función miocárdica [145].

Como marcador inflamatorio, la PCR convencional y ultrasensible, han sido estudiadas también en MCH, pero en menor medida que los biomarcadores de estrés parietal. Pocos estudios existen al respecto. Dimitrow y cols. [146] demostraron que la PCR convencional estaba más elevada en pacientes con MCH que en controles, mientras que Lamparter S. y cols estudiaron los valores de PCRhs en miocardiopatías, en su caso miocardiopatía dilatada idiopática en una cohorte amplia [147]. Los datos que obtuvieron mostraron una mayor proporción de pacientes (41%) con PCRhs altas en pacientes con clase funcional III frente a pacientes con mejor estado de clase funcional y valores más bajos de PCRhs. Además encontraron que la PCRhs y la FEVI se comportaban como predictores de muerte.

3.3 BIOMARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL

El endotelio participa de forma importante en la conservación de la homeostasis vascular mediante la secreción y liberación de diversas sustancias vasoactivas, moléculas de adhesión y una serie de sustancias biológicamente activas. Por este motivo, cuando existe una alteración en su estructura o función, el lecho vascular es incapaz de responder de forma fisiológica frente a los diferentes estímulos y condiciones que se producen en el organismo. La disfunción endotelial (DE) representa la pérdida de la capacidad del endotelio para modular el comportamiento fisiológico del lecho vascular. Además constituye un episodio temprano de la aterosclerosis que precede a la formación de la placa de ateroma. Estudios recientes indican que la DE en el árbol coronario es un marcador pronóstico [148].

El endotelio no es únicamente una barrera física que separa la sangre circulante de la pared vascular, sino que también actúa como la más extensa glándula endocrina y paracrina del cuerpo. Las células endoteliales, además de cumplir sus funciones de soporte de los vasos sanguíneos y de regulación del transporte de macromoléculas y otras sustancias entre el plasma y el intersticio, también producen una serie de moléculas biológicamente activas. Éstas son liberadas como respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos. Las células

endoteliales producen sustancias vasodilatadoras, como la prostaciclina y la bradicinina y también sustancias con actividad vasoconstrictora, como la endotelina-1. El endotelio modula asimismo la actividad vasomotora arterial mediante la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, ya que la ECA, que regula el paso hacia la angiotensina II, se expresa en la célula endotelial [149].

Otras funciones importantes del endotelio son intervenir en el proceso de angiogénesis mediante la formación de factores de crecimiento que estimulan la proliferación del músculo liso, regular la permeabilidad capilar, segregar sustancias causantes de la agregación y adhesión de las plaquetas y de la atracción de monocitos a la pared vascular, actuar como mediador de factores de coagulación y de factores fibrinolíticos y, finalmente, intervenir en el mecanismo de respuesta del sistema inmunológico. En suma, el endotelio desempeña un papel clave en el control del tono vascular, en la hemostasis local y en los procesos de proliferación celular en la pared de los vasos [148].

Está demostrado cómo los factores de riesgo coronario clásicos (dislipemia, hipertensión arterial, tabaquismo, diabetes, etc.), así como otros factores de riesgo implicados en la aterogénesis (homocisteína, radicales libres de oxígeno, infecciones crónicas, mecanismos inflamatorios y déficit estrogénico), son capaces de activar y/o lesionar las células endoteliales y alterar sus múltiples funciones. La DE resulta de la adhesión de plaquetas y monocitos a la pared vascular, liberación de factores de crecimiento con tendencia a la proliferación de células musculares lisas y perturbación del equilibrio trombotico-trombolítico; también da lugar a una regulación anormal del tono vascular. La DE representa la pérdida de la capacidad del endotelio para modular el tono vascular y para inhibir los procesos de agregación plaquetaria, adherencia de neutrófilos y de proliferación celular. Diversos estudios clínicos han probado que la DE, producida por los llamados factores de riesgo coronario, no sólo ocurre en los grandes vasos, como pueden ser las arterias coronarias epicárdicas, sino también en la microcirculación y en la circulación periférica [148].

Es conocido que en la MCH aparece disfunción microvascular con anomalías funcionales y morfológicas en las pequeñas arterias coronarias intramurales y la arteriola subendocárdica [150]. El sustrato morfológico de la disfunción

microvascular consiste en un engrosamiento de la pared arteriolar y su íntima con un estrechamiento consecuente de la luz, y una ultraestructura anormal de las células endoteliales. Por tanto, la disfunción microvascular podría tener extensión como marcador pronóstico en MCH [151]. El deterioro de la vasodilatación coronaria dependiente de endotelio ha sido demostrado en pacientes con MCH [152]. Estos pacientes tuvieron una respuesta vasoconstrictora anormal de la arteria coronaria a la acetilcolina o la prueba de estimulación con frío como pruebas que miden reactividad vasomotora dependiente del endotelio [150;153]. Por ello, fuerzas de compresión extravasculares pueden desempeñar un importante papel en la disfunción microvascular en la MCH [154] y sugiere que el endotelio en la MCH podría ser funcionalmente anormal.

En relación al papel de los biomarcadores en la DE se han estudiado algunos como el **Factor von Willebrand (FvW)** plasmático, que es una glicoproteína sintetizada por el endotelio y que ha emergido como un posible marcador de actividad de la célula endotelial ya que su síntesis sólo ocurre en el endotelio vascular, en los megacariocitos y en las plaquetas, permaneciendo unido a la superficie de estas últimas, después de liberarse desde los gránulos [155].

Varias publicaciones asocian concentraciones elevadas de FvW con un incremento del riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, trombosis o isquemia [155]. De igual modo también se han relacionado biomarcadores como la E-selectina y la trombomodulina con capacidad de valorar la DE [156;157] Por tanto, observamos como el FvW plasmático se puede valorar como un marcador establecido de daño/disfunción endotelial [158;159], y ha sido estudiado en MCH. Dimitrow *y cols.* [160] demostraron como la trombomodulina soluble (sTM), el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y la dimetilarginina simétrica (SDAM) están elevados en la MCH en comparación con individuos sanos, lo que indica que la disfunción endotelial podría observarse con biomarcadores en sangre periférica. Sin embargo, los dos estudios previos que evaluaban los niveles de FvW entre pacientes con MCH y controles emparejados por edad y sexo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas [160;161]. Pero, por el contrario, si evaluamos la presencia de DE mediante biomarcadores, también

permitiría observar a través de ellos la frecuente disfunción microvascular existente en MCH.

3.4 BIOMARCADORES DE NECROSIS EN MIOCITOS

Las troponinas son marcadores bioquímicos que pueden ser utilizadas para la detección de daño celular. Las subunidades T, C e I de la troponina son proteínas del aparato contráctil que se presentan en diversas isoformas, dependiendo del músculo específico del que provengan. El marcador clásico de daño miocárdico que se utiliza ampliamente en el diagnóstico del infarto de miocardio, es la **troponina T cardíaca (TnT)**, por su especificidad de tejido, ya que se diferencia claramente en su peso molecular de la troponina T del músculo esquelético, y porque aumenta a las 3-4 horas del infarto y permanece elevada en sangre hasta dos semanas tras el mismo [162].

Las Troponinas I y T son biomarcadores muy sensibles y específicos de lesión de miocitos cardíacos, y han demostrado ser predictores independientes de pronóstico en síndromes coronarios agudos. Además sus valores para diagnóstico y pronóstico en los síndromes coronarios agudos están bien establecidos [163].

El estado hemodinámico (agudo o estable) de los pacientes en el momento de la determinación de TnT añade una dificultad para la evaluación de este biomarcador en otras cardiopatías diferentes a los síndromes coronarios agudos [164]. En pacientes con insuficiencia cardíaca aguda descompensada, un resultado positivo de TnT cardíaca se asocia con mayor mortalidad hospitalaria, independiente de otras variables predictoras [165]. En pacientes ambulatorios con insuficiencia cardíaca crónica estable de etiología no isquémica, la detección de TnT, incluso a niveles bajos, significa un mayor riesgo de eventos cardíacos adversos, lo que parece ser independiente de otras variables clínicas, analíticas y del ECG [166]. Omland y cols. [167] describieron un ligero incremento de los niveles circulantes de TnT en pacientes estables con enfermedad de las arterias coronarias mediante métodos ultrasensibles (**TnThs**). Dicho estudio representó el primero que informó de la elevación de la TnThs en pacientes con enfermedad

coronaria estable y su asociación con la incidencia de muerte cardiovascular y la insuficiencia cardíaca.

A pesar de ser un marcador muy sensible y específico de necrosis de los cardiomiocitos, y que pudiera tener también una utilidad en el pronóstico de estos pacientes, no se utiliza de rutina en el diagnóstico o seguimiento de pacientes con MCH, otras miocardiopatías o insuficiencia cardíaca. Esto es debido a los bajos valores del biomarcador en estos pacientes, inferiores en la mayoría de los casos al nivel de detección, que comprometen la sensibilidad de los métodos de determinación establecidos. Estos estudios mencionados se basan en métodos de determinación clásica TnT, y revelan fuertes discrepancias entre el número de pacientes con TnT positivas, probablemente debido a la heterogeneidad en límite de detección de la técnica utilizada (dependiendo del fabricante y la generación del ensayo) y el punto de corte establecido. Las técnicas ultrasensibles o de alta sensibilidad, han demostrado que mejoran el diagnóstico de síndromes coronarios agudos.

Sato y cols. [168] observaron concentraciones elevadas de TnT en pacientes con MCH y controles, correlacionando las diferencias con hallazgos ecocardiográficos. Se asociaron mayores concentraciones de TnT con un acortamiento fraccional significativamente inferior y con un aumento del grosor del tabique interventricular. Dichos autores sugieren que una elevación en la concentración de TnT en MCH puede ser indicador de lesión subclínica miocitaria y progresión a MCH dilatada. Pop y cols. demostraron que la mayor liberación de TnT puede estar presente en pacientes con MCH y con historia de haber practicado ejercicio intenso [169].

El mecanismo de lesión de los miocitos en MCH es desconocido. Los valores anormales de TnT pueden estar causados por isquemia miocárdica relativa debido al desequilibrio entre un corazón hipertrófico y un insuficiente suministro de sangre al tener los vasos coronarios dañados. Por tanto, observar concentraciones elevadas de TnT podría deberse a un daño en curso del miocardio o a una liberación de componentes miofibrilares, lo que podría reflejar la pérdida de cardiomiocitos viables, característica común en la insuficiencia cardíaca progresiva [170]. La otra posibilidad es que las anomalías de los miocitos vengan

condicionadas por mutación génica y causen daño miocitario. Por tanto la determinación de troponinas podría ser útil en la evaluación de los pacientes con mayor riesgo para desarrollar fase dilatada de la MCH y valorar los efectos del tratamiento farmacológico en la evolución de MCH, pero son necesarios más estudios [61].

3.5 FACTORES DE CRECIMIENTO

Cualquier variable que estimule al ventrículo izquierdo a bombear con más fuerza o más frecuencia por un tiempo prolongado, producirá hipertrofia del músculo cardíaco del ventrículo izquierdo. Es decir, aumenta la masa muscular pero no el número de miocitos.

La masa muscular puede aumentar por un incremento de la síntesis de proteínas, dentro del sarcolema, así como en el intersticio que rodea la musculatura cardíaca, como el colágeno. La estimulación para ese efecto sintético de proteínas adicionales proviene de la liberación de factores de crecimiento celular como angiotensina II, el factor de crecimiento insulínico y otros [89].

El factor de crecimiento de diferenciación-15 (GDF-15) es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Está comprobada la existencia de dos patrones morfológicos distintos de fibrosis basados en el alineamiento entre sí de fibras de colágeno finas y gruesas con el músculo cardíaco. La alteración más conocida es la fibrosis perivascular alrededor de los vasos intramiocárdicos. Una segunda forma es la fibrosis de reemplazo, consistente en el depósito excesivo de colágeno fibrilar entre los haces musculares. Además en el intersticio también encontramos glucosa, proteoglicanos y moléculas autoagregantes que intervienen cuando hay daño tisular; incluyen la familia de polipéptidos de TGF- β y metaloproteinasas (MMP). Así, la aparición de fibrosis no significa necesariamente que sea reparativa siguiendo a la necrosis miocítica, y más aún, puede ser reactiva y productiva en ausencia de pérdidas de miocitos [75]. La Angiotensina II estimula la síntesis de TGF- β por los fibroblastos cardiacos y aumenta la expresión de trombospondín-1 (activador del TGF- β). El TGF- β modula el fenotipo fibroblástico y así promueve la síntesis de colágeno, incrementando a

su vez la síntesis de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) induciendo fibrosis [171].

La familia de proteínas del TGF- β puede subdividirse en dos grupos principales: el TGF- β /Activina y la proteína morfogenética del hueso y ramas del GDF, basado en su similitud de secuencia [172]. Estas citoquinas están implicadas en una amplia variedad de diferenciación de los tejidos y los procesos de proliferación [173]. Diversos estudios clínicos han demostrado que las enfermedades cardiovasculares como isquemia, inflamación o lesión, elevan la expresión de GDF-15 en el corazón [174]. Estas situaciones patológicas podrían indicar que este factor actúa como una señal de tensión para los cardiomiocitos.

Varios estudios clínicos han evidenciado relación entre GDF-15 y trastornos vasculares, asociando el aumento de los niveles de GDF-15 a un peor pronóstico en el síndrome coronario agudo [175;176] y recientemente a insuficiencia cardíaca [177]. Estas observaciones sugieren que la elevación de los niveles de GDF-15 podrían identificar pacientes de alto riesgo en un amplio espectro de las enfermedades cardiovasculares [178] y que es posible que tenga un papel regulador en el proceso de hipertrofia cardíaca [179]. Así, en la evolución de la MCH, el miocardio sufre una remodelación heterogénea que incluye crecimiento de la matriz extracelular y además pérdida activa de los miocitos, con una regulación por parte de los factores de crecimiento.

3.6 BIOMARCADORES DE FIBROSIS Y REMODELADO TISULAR. ANTECEDENTES Y RELACIÓN CON LA MCH:

El estudio de biomarcadores de fibrosis y remodelado tisular a través de los péptidos derivados del colágeno ha sido clásicamente utilizado en patologías óseas, al formar parte el colágeno de la matriz ósea, pero también ha sido estudiado en profundidad en el remodelado cardíaco, fundamentalmente en la cardiopatía hipertensiva [180-182].

Conviene recordar que dos tercios de la población celular del corazón normal está compuesta por células no musculares, en su mayoría fibroblastos [183]. En

respuesta a diversos tipos de estrés, estas células presentan una modificación fenotípica, con expresión de marcadores característicos de la célula muscular lisa, por lo que se les denomina miofibroblastos, que producen y liberan sustancias como factores de crecimiento, citocinas, proteínas de la matriz extracelular y proteasas [184]. Tanto los fibroblastos como los miofibroblastos desempeñan un papel importante en la regulación de la síntesis y degradación de proteínas de la matriz extracelular, cuya composición y cantidad es el resultado de un estrecho balance entre la síntesis de colágeno (y otras proteínas en menor medida) y la actividad de metaloproteinasas e inhibidores tisulares de metaloproteinasas [185]. El fallo de este equilibrio puede conducir a cambios fibróticos que, junto con la hipertrofia cardíaca, la proliferación fibroblástica y la muerte celular, constituyen el fenómeno del remodelado tisular o “turnover” [186].

La matriz de colágeno es una estructura metabólicamente activa, ya que el equilibrio entre la síntesis y la degradación de colágeno determina su propio “turnover”, que se estima entre 80 a 120 días [187]. El colágeno, la molécula de triple hélice que forma la estructura fibrosa de todos los tejidos conectivos, se sintetiza como procolágeno, una molécula precursora más grande. El procolágeno consta de colágeno maduro con péptidos de extensión en las terminaciones amínica y carboxílica. Estos péptidos o propéptidos, son separados de la molécula de colágeno en crecimiento. La liberación de estos péptidos en la circulación proporciona una representación de la producción de colágeno (Figura 14).

La búsqueda de biomarcadores del metabolismo del colágeno ha proporcionado un amplio número de moléculas candidatas que pueden clasificarse en 2 categorías: los biomarcadores relacionados con la síntesis de moléculas que forman las nuevas fibras de colágeno y los biomarcadores relacionados con la degradación de las moléculas que integran las fibras maduras de colágeno [187].

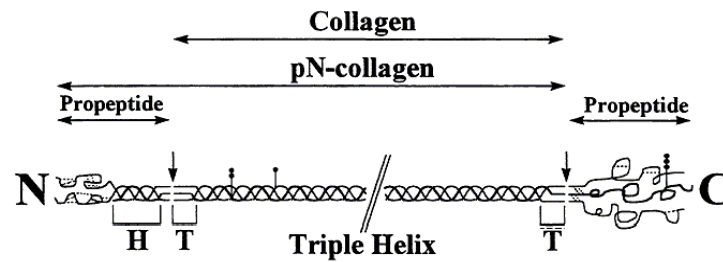


Figura 14. Degradación de la hélice de colágeno. Adaptado de "Principles of Molecular Cardiology". edited by Marschall S. Runge, and Cam Patterson, 2005.

Biomarcadores relacionados con la síntesis del colágeno

Una vez que los tipos de procolágeno I y III se sintetizan y secretan por los fibroblastos y los miofibroblastos como un precursor de procolágeno de triple hélice que contiene propéptidos terminales, los propéptidos son escindidos en bloque por proteinasas específicas de procolágeno, permitiendo la integración de la molécula de colágeno resultante en el crecimiento de fibrillas. Los propéptidos resultantes alcanzan el torrente sanguíneo y pueden detectarse al escindirse en cada molécula de colágeno. Así, la cantidad de propéptidos cuantificada en circulación es proporcional a la cantidad de colágeno formado y pueden calificarse como índices de la síntesis de colágeno. Esto se corrobora para el **propéptido carboxiterminal del procolágeno de tipo I (PICP)** y probablemente para el **propéptido aminoterminal del procolágeno de tipo I (PINP)** (Figura 15). De hecho existe una relación estequiométrica 1:1 entre el número de moléculas de colágeno tipo I producidas y las moléculas de PICP liberadas.

Las concentraciones de PICP son indicativas de la producción de colágeno in vivo, por tanto vinculados al crecimiento y formación colágeno tipo I. El colágeno tipo I constituye el 90% de la matriz orgánica, pero además está presente en tejido conectivo laxo junto con otros tipos de colágeno como el tipo III, V y VI. De igual forma, el PINP también se considera un indicador específico de la deposición de colágeno tipo I.

El colágeno tipo III deriva de una proteína mayor, el procolágeno tipo III, con dos extensiones finales en ambos lados de la molécula. Alguno de los propéptidos aminoterminales (**PIINP: propéptido N-terminal del procolágeno tipo III**) se

liberan durante la síntesis y deposición del colágeno tipo III, y otros quedan retenidos en las moléculas, formando parte de las fibras de colágeno. Este antígeno, cuando se encuentra en suero, puede derivar de la síntesis del nuevo colágeno tipo III o de la degradación de las fibras de colágeno tipo III existentes como tejido conectivo. Los propéptidos carboxi-terminal y amino-terminal de colágeno tipo III (PIIINP y PIIICP, respectivamente) no son completamente escindidos durante la conversión de procolágeno tipo III en colágeno tipo III, que queda en cierta medida en la fibra final y por tanto liberados durante la degradación de la fibra [187].

Biomarcadores relacionados con la degradación del colágeno

Las metaloproteinasas de la matriz intersticial (MMP) inician la digestión del colágeno por hidrólisis del enlace peptídico tras un residuo de glicina. El **telopéptido carboxiterminal procolágeno tipo I (ICTP)** resultante es liberado por la acción de la MMP-1 (Figura 15). Existe una relación estequiométrica entre el número de moléculas de colágeno tipo I degradadas y las moléculas ICTP liberadas. Así, la cantidad de ICTP que alcanza la circulación sería proporcional a la cantidad de colágeno fibrilar degradado [187]. Se podría asociar este péptido como marcador de degradación o lisis de colágeno [188].

Los péptidos fragmentados finales matriciales liberados por la acción de estas enzimas tienen actividades biológicas en la regulación del metabolismo del colágeno y la angiogénesis. Por ejemplo, el tripéptido glicil-histidil-lisina (GHL) derivado de colágeno de tipo I estimula la síntesis de colágeno nuevo por fibroblastos [187].

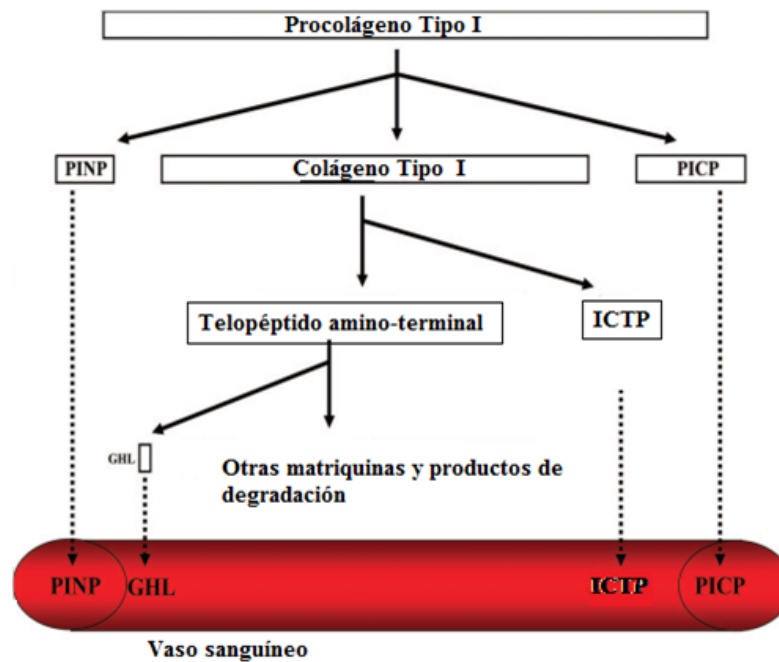


Figura 15. Péptidos liberados durante la síntesis y la degradación extracelular de colágeno de tipo I que llegan al torrente sanguíneo desde el intersticio del tejido. Adaptado de López y cols. *Circulation* 2010 [187].

Biomarcadores del metabolismo del colágeno en las enfermedades cardíacas

Alteraciones del metabolismo de colágeno pueden conducir a anomalías en la arquitectura y la composición (es decir, el remodelado) de la matriz de colágeno que, a su vez, dará lugar a alteraciones de la morfología y función del VI. En algunos casos, el aumento de la síntesis de colágeno sobre la degradación conduce a una acumulación de fibras de colágeno. Esto incluye patrones distintivos de fibrosis reactiva y reparativa del miocardio, cada uno de los cuales alterará la rigidez miocárdica diastólica y facilita la hipertrofia ventricular y la disfunción diastólica [187]. Estas alteraciones de la matriz de colágeno presentes son de dos tipos: a) fibrosis difusa secundaria a la acumulación exagerada de fibras en el intersticio y en el espacio perivascular, porque en esa localización su síntesis predomina sobre su degradación, y b) disrupción excesiva de la red de colágeno

que rodea a cada cardiomiocito (endomisio) y a grupos de cardiomiocitos (perimisio) porque la degradación de fibras predomina sobre la síntesis en el entorno cardiomiocitario [189].

Por otra parte, el predominio de la degradación sobre la síntesis conduce a la desorganización y la pérdida de colágeno miocárdico y/o la disminución de la resistencia a la tracción matriz que puede ser responsable de la dilatación ventricular y la disfunción sistólica.

Se ha propuesto que las alteraciones antes mencionadas de la matriz de colágeno están presentes en cuatro tipos principales de enfermedades cardíacas: cardiopatía isquémica, enfermedad cardíaca asociada con sobrecarga de presión, enfermedad cardíaca asociada con sobrecarga de volumen y cardiomiopatías.

Este conjunto de péptidos ha sido estudiado también en pacientes con hipertensión [190], asociados a una mayor fibrosis y con acumulación de colágeno tipo I y III, confirmado mediante el estudio de corazones explantados o biopsias endomiocárdicas en modelos animales. Además encuentran valores de PICP y de ICTP que correlacionan con cantidad de fibrosis más severa y asociada con peor pronóstico en pacientes con insuficiencia cardíaca. Otros autores [191] encontraron cómo las concentraciones de PICP correlacionaban con el contenido de colágeno miocárdico medido en biopsias cardíacas en pacientes con hipertrofia secundaria.

Podemos encontrar altas concentraciones de PIIINP en enfermedades malignas fibroproliferativas, hematológicas y endocrinológicas [192]. Así cambios en PIIINP no son específicos de una enfermedad en particular pero reflejan un metabolismo alterado del colágeno tipo III asociado con la clínica.

También se ha visto concentraciones séricas de PIIINP elevadas en patologías como fibrosis hepática o cirrosis, y como reflejo de un proceso de reparación y formación después de un infarto de miocardio. También se ha demostrado correlación con el tamaño del infarto, disfunción ventricular izquierda y la presencia de oclusión coronaria cardíaca [193].

Así, la apoptosis de miocitos, la disfunción microvascular coronaria, y el turnover de fibroblastos y colágeno también juegan un papel importante en el

remodelado cardiaco. Se lleva a cabo una continua remodelación de la matriz extracelular en la MCH, que conlleva un aumento de la fibrosis intersticial debido a la mayor cantidad depositada de colágeno de tipo I/III. La presencia en el miocardio de áreas de realce tardío con gadolinio evaluado por CRM refleja un aumento de colágeno miocárdico. Además, anteriormente se ha demostrado una importante asociación de diversas variables clínicas y factores de riesgo con realce tardío de gadolinio en los pacientes con MCH [100;194].

Por tanto, de acuerdo con los estudios publicados [194;195], la evaluación de los péptidos del colágeno como posibles biomarcadores representativos de un turnover en la MCH, puede informar de la patogenia de la MCH y el remodelado miocárdico.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

La MCH aparece con múltiples manifestaciones clínicas no específicas y con frecuencia se asocia a una presentación clínica con uno o más factores de riesgo presentes. La MCH se apoya en tres pilares básicos: la anamnesis, evaluación clínica y pruebas complementarias de imagen. Sin embargo, con estas herramientas, la información obtenida desde el punto de vista fisiopatológico es insuficiente, y aún más la valoración pronóstica.

Desafortunadamente el estudio de biomarcadores en la MCH ha sido poco desarrollado. Sería interesante plantear si el estudio de las concentraciones de varios biomarcadores en suero o plasma y su relación con las diferentes vías patológicas implicadas en la MCH, podría aportar información relevante.

El presente trabajo pretende estudiar biomarcadores relacionados con la patología cardíaca que ayuden a complementar la evaluación clínica de los pacientes con MCH, y correlacionarlos con las distintas variables clínicas de la enfermedad. Para ello se tuvieron en cuenta todas las pruebas derivadas de su paso por la consulta monográfica de MCH en los Servicios de Cardiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia y en del Hospital General Universitario de Alicante.

Actualmente no existe ningún biomarcador que pueda predecir de forma rápida y fiable un posible desarrollo de MCH precoz o que se utilicen en clínica para complementar el manejo, tratamiento y pronóstico adecuado en pacientes afectados de MCH.

Por tanto, partiendo de estas premisas, se sugiere una investigación que estudie la determinación de diversos biomarcadores relacionados con las vías implicadas en la MCH y con los factores de riesgo de MCH en un grupo de estudio y un grupo control, seleccionados ambos en las consultas de los hospitales mencionados.

Así se decidió evaluar la utilidad clínica de los siguientes biomarcadores relacionados con el estrés parietal, inflamación, daño endotelial, necrosis, fibrosis y remodelado tisular en pacientes con MCH:

- 1. NT-proBNP como biomarcador de estrés parietal.
- 2. PCRhs como biomarcador de inflamación.
- 3. FvW como biomarcador de daño o disfunción endotelial.
- 4. TnThs como biomarcador de necrosis miocárdica.
- 5. GDF-15 como biomarcador asociado a fibrosis y severidad de la enfermedad.
- 6. Péptidos de formación y degradación del colágeno como biomarcadores de fibrosis y remodelado tisular.

Para poder trabajar estas cuestiones, se profundizará en varios aspectos, relacionando los biomarcadores analizados con la clase funcional de los pacientes, los factores de riesgo implicados en la MCH y el resto de pruebas de diagnóstico complementarias realizadas a los pacientes.

Por tanto, la evaluación del comportamiento de los diferentes biomarcadores, podría mostrar diferencias en los pacientes con MCH, frente a controles sanos, y además comprobar si estos niveles están relacionados con las diferentes variables asociadas con la remodelación ventricular en la MCH y severidad de la enfermedad. En este contexto se explorará la posible asociación con diversas variables: clínicas (edad, género, hipertensión, MS familiar, síncope recurrente, angina de pecho, presencia de FA, y clase funcional (estimada según la escala NYHA). Asociación con variables ecocardiográficas (obstrucción del tracto de salida del VI, grosor de la pared del VI, dilatación auricular izquierda, y los índices de función diastólica) y otras técnicas de valoración de la estructura y funcionalidad cardiaca (respuesta de la presión arterial anormal al ejercicio, TVNS registrada en el Holter, o realce tardío de gadolinio evaluado por CRM).

Con todo ello, con el estudio de estos biomarcadores se plantea una posibilidad de mejora en la caracterización fisiopatológica de la MCH.

2.2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

- 1. Comparar los valores de los diferentes biomarcadores (estrés parietal, inflamación, daño endotelial, necrosis, fibrosis y remodelado tisular) entre pacientes con MCH y un grupo control de similares características.
- 2. Examinar el comportamiento de las concentraciones de los diferentes biomarcadores clasificando el grupo de pacientes según su capacidad funcional, atendiendo a los grupos de la escala NYHA.
- 3. Estudiar la asociación de cada biomarcador a las diferentes variables clínicas, asociación con las características demográficas y con las diferentes pruebas complementarias que estiman la severidad de la enfermedad.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se ha realizado un estudio observacional transversal incluyendo pacientes estables con MCH que asisten a consulta monográfica de dicha enfermedad para el seguimiento de rutina en dos Hospitales españoles (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia y el Hospital General Universitario de Alicante). Las muestras fueron procesadas en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, con la estrecha colaboración del grupo de investigación *Trombosis arterial y remodelado vascular, intersticial y miocárdico (grupo nº15 FFIS)* y en colaboración también con el Servicio de Cardiología de dicho hospital, donde se compararon las características clínicas del grupo de pacientes seleccionados y controles.

3.2. PACIENTES Y GRUPO CONTROL

Se incluyeron 124 pacientes estables con MCH entre los dos Hospitales (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia y el Hospital General Universitario de Alicante).

De los pacientes seleccionados, 91 (73%) eran varones, con una edad de $47.7 \pm 14,2$ años. Los criterios para el diagnóstico de MCH fueron la presencia de un grosor de la pared del ventrículo izquierdo de al menos 15 mm, sin ninguna otra causa que podría llevar a la hipertrofia ventricular. Además, en el caso de familiares de primer grado de las personas afectadas, se propusieron los mismos criterios.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: pacientes con neoplasia concomitante, infecciones, enfermedades del tejido conectivo, hipertensión arterial secundaria o refractaria con la necesidad de dos o más fármacos, cardiopatía isquémica demostrada, tratamiento anticoagulante, insuficiencia renal, insuficiencia hepática o enfermedades inflamatorias.

Se realizó una historia completa y un examen clínico, incluyendo electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones, ecocardiograma, prueba de esfuerzo

limitada a los síntomas, ergometría convencional y Holter-ECG de 24 horas, además de CRM con contraste con gadolinio.

Los pacientes con MCH se compararon con 78 sujetos control de similar edad y sexo. Los controles fueron seleccionados entre los trabajadores de los dos hospitales, utilizando los mismos criterios de exclusión usados para los pacientes, además de una historia clínica y exploración física completa, para descartar que fueran cardiópatas.

3.3. MÉTODO

3.3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA

Se realizó una valoración clínica completa en cada caso. Se hizo especial énfasis en la disnea (clase NYHA), la angina, el síncope y la fibrilación auricular u otras alteraciones del ritmo. En todos los pacientes, se realizó un estudio de estratificación del riesgo de MS, valorando los siguientes factores: *a)* antecedentes familiares de MS; *b)* síncope recurrente de origen no explicado o MS reanimada; *c)* respuesta presora anormal en la ergometría, y *d)* taquicardia ventricular no sostenida (TVNS) en una monitorización de Holter-24 horas y un grosor máximo de la pared del ventrículo izquierdo ≥ 30 mm en el ecocardiograma o un gradiente del tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI) > 30 mmHg en reposo.

Se definió como factores de riesgo asociados a peor capacidad funcional y estado más severo de la MCH las siguientes comorbilidades: presencia de grosor severo del VI observado por CRM, hipertensión previa, historia de FA, Disnea $> II$ y Disnea II-IV (disnea grave según la NYHA), aparición de disfunción sistólica, presencia de obstrucción, evaluada por GTSVI > 30 mmHG. Por último, presencia de fibrosis observada por RTG en la CRM.

3.3.2. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO: ECOCARDIOGRAFÍA DOPPLER

El estudio ecocardiográfico se realizó con un equipo Sonos 5500 (Phillips, Eindhoven, Países Bajos). Los estudios se realizaron en reposo, y las imágenes fueron almacenadas en soporte informático para posteriores revisiones. Se realizaron mediciones del grosor parietal en el eje corto a nivel de la válvula mitral y de músculos papilares. Se buscó el mayor grosor de la pared del ventrículo izquierdo. La fracción de eyección se calculó con el método de Simpson con promediado en los planos de dos y cuatro cámaras. La función diastólica se determinó mediante Doppler pulsado del flujo de entrada en la válvula mitral, así como mediante los picos de velocidad diastólica del anillo mitral y flujo de venas pulmonares. Se determinó la presencia de gradiente en TSVI mediante Doppler color y Doppler continuo, considerando significativo un valor > 30 mmHg.

En el estudio ecocardiográfico, se midieron los siguientes parámetros: el tamaño de la cavidad del VI, grosor de la pared del septo interventricular y posterior, máximo grosor del VI, y la fracción de eyección medidas de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía [196]. Se definió como disfunción sistólica al valor de la fracción de eyección por debajo del punto de corte del 50%. El volumen auricular izquierdo (VAI) se midió a partir de 2 vistas ortogonales. El VAI se ajustó por la superficie corporal indexada. El gradiente del tracto de salida del VI (GTSVI) se calculó a partir de onda Doppler continua utilizando la ecuación simplificada de Bernoulli.

3.3.3. ERGOMETRÍA O PRUEBA DE ESFUERZO

Se utilizó un ergómetro con tapiz rodante (Marquette Electronics Inc., Milwaukee, Estados Unidos). La ergometría limitada por síntomas fue realizada mediante el protocolo de Bruce y en casos de dificultad para la deambulaci3n, mediante el protocolo modificado de Bruce. Así como, se determinó la presi3n arterial por esfigoman3metro, en reposo y cada minuto durante el ejercicio y los 5 min siguientes. Una respuesta presora anormal fue considerada, cuando la

presión arterial no llegaba a superar en 20 mmHg la presión en reposo o cuando la presión arterial descendía durante el esfuerzo más de 20 mmHg respecto al pico alcanzado. El ejercicio máximo se continuó hasta el agotamiento del paciente. Se estimó indirectamente el consumo de oxígeno en equivalentes metabólicos (MET) según las fórmulas habituales integradas en el *software* del equipo.

3.3.4. REGISTRO DE ECG TIPO HOLTER

Un Holter puede valorar arritmias y una posible taquicardia ventricular no sostenida (TVNS). Por medio de este dispositivo se recoge ininterrumpidamente el registro eléctrico ambulatorio del corazón durante 24 o 48 horas. Todos los pacientes fueron sometidos a 24 horas de monitorización ambulatoria del ECG en el desempeño de las actividades diarias normales, con el sistema Holter que graba en dos canales. Se definió la TVNS como una racha de tres o más latidos ventriculares consecutivos a una tasa de 120 latidos/min, con una duración <30 segundos.

3.3.5. ESTUDIO DE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA CARDÍACA.

La resonancia cardíaca magnética (CRM) se realizó en un scanner 1,5 T y software de cardiología (versión 9.1, Intera, Philips Medical Systems, Best, Holanda). Se utilizaron imágenes paralelas (SENCE). La imagen de Resonancia Magnética se obtuvo en el eje corto del corazón, eje largo vertical y horizontal. A los sujetos se les administró un bolo de inyección periférica de gadolinio-DTPA (0.2 mmol/kg) y diez minutos después de la inyección, se tomaron secuencias ecográficas de gradiente, con inversión-recuperación en cortes múltiples para valorar la presencia de fibrosis miocárdica. Las imágenes con gadolinio se adquirieron en la orientación del eje corto del VI. Las imágenes obtenidas fueron analizadas por un solo experto en MRI de una manera ciega, sin información acerca de los resultados o la evolución clínica de los pacientes incluidos. Además, se analizaron los datos utilizando el software validado (Mass Suite 6.1, MEDIS Médico Imaging Systems, Leiden, Países Bajos). Se describió la presencia o ausencia de

fibrosis. Se realizó asimismo la cuantificación digital del porcentaje de miocardio que presentaba captación tardía de gadolinio; para tal fin, las áreas con captación positiva quedaron definidas por una intensidad de la señal dos desviaciones estándar por encima del valor promedio de la señal en una muestra de tejido miocárdico sano distante (Figura 16). Todos los estudios de RTG en los pacientes se analizaron por un mismo observador experimentado.

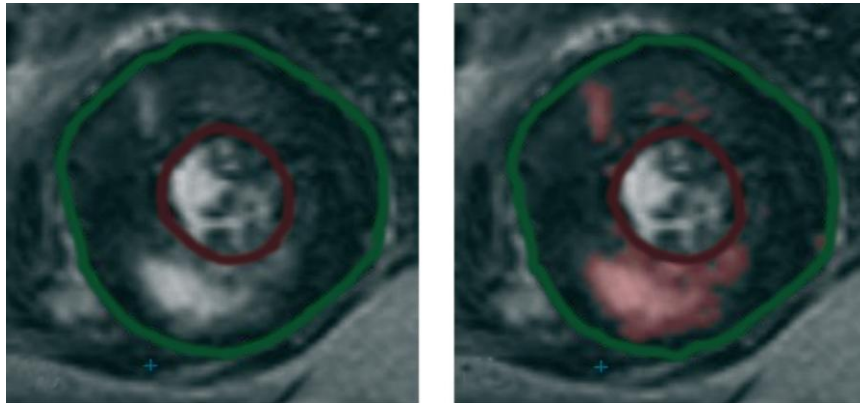


Figura 16. Proceso de cuantificación del tejido afectado por realce tardío con gadolinio. A: antes del procesado. B: las áreas que presentan una intensidad de señal dos desviaciones estándar por encima de los valores de señal en una muestra de tejido miocárdico sano son seleccionadas automáticamente (indicado en rosa). Adaptado de Romero-Puche A. y cols, Rev Esp Cardiol 2008 [100].

3.3.6. MUESTRAS SANGUÍNEAS Y ENSAYOS DE LABORATORIO

Se extrajeron muestras de sangre de los pacientes tras 12 h de ayuno, en reposo, de la vena antecubital. En todos los casos se realizó una analítica de rutina completa y se obtuvo muestra de plasma citratado y suero tras centrifugación a 3500 rpm, durante 15 minutos. Las muestras se almacenaron a -80°C en ambos hospitales, hasta un análisis posterior.

En el análisis de muestras biológicas se calculó el aclaramiento de creatinina según la fórmula de aclaramiento de creatinina: $\text{ACr (ml/min)} = \frac{\text{creatinina en orina (mg/dl)} \times \text{Volumen de orina (ml)}}{\text{creatinina en suero (mg/dl)} \times 1440} \times \text{Superficie corporal}$.

Se determinaron las concentraciones en plasma y suero de marcadores relacionados con la fibrosis (péptidos derivados del colágeno), daño endotelial

(FvW) y el factor de crecimiento de diferenciación-15 (GDF-15), mediante técnicas de enzimoimmunoensayo (E.I.A) de tipo manual. También se midieron los marcadores de estrés miocárdico (NT-proBNP) e inflamación (proteína C reactiva ultrasensible (PCR hs)) y TnT cardiaca ultrasensible (TnT_{hs}) en analizadores automatizados *Cobas 6000 Roche Diagnostics*® (Mannheim, Alemania).

a) Enzimoimmunoensayo tipo ELISA manual para la determinación de FvW, PICP e ICTP y GDF-15.

La técnica ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida (microplacas) mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción y cuyo producto, puede ser medido espectrofotométricamente. Se utilizó el lector de placas de ELISA μ Quant (Bio-tek instruments Inc.) con el programa de interpretación de datos informático KCjunior.

La técnica de ELISA consta de las siguientes fases:

A. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (ej: peroxidasa, fosfatasa alcalina)

B. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos de microplacas.

C. Formación de una o más capas de inmunocomplejos: si el antígeno está unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado hablaríamos de un ELISA directo. Si se emplea un anticuerpo primario anti-antígeno y uno secundario anti-primario marcado, hablaríamos de un ELISA indirecto.

Sin embargo, cuando tenemos un ELISA tipo 'sándwich', el ensayo consiste en una captura de antígeno y posterior detección mediante inmunocomplejos. En este tipo de ELISA se recubren los pocillos con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de dicho anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Tras un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues

cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca.

D. Revelado de la reacción enzimática: después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría.

b) Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de *PIINP*.

Técnica E.I.A. en la que el Ag es marcado con un trazador isotópico (NAN3 en este caso) y la detección de los inmunocomplejos se hace por contador gamma (γ).

c) Electroquimioluminiscencia (ECLIA) en autoanalizadores Hitachi/Cobas Roche Diagnostics® para la determinación de *NT-proBNP*, *TnT hs* y *PINP*.

ECLIA combina la reacción convencional Ag-Ac sobre la superficie de una micropartícula magnética con la reacción electroquímica sobre la superficie de un electrodo para generar luminiscencia. Es un método basado en la interacción entre un quelato de rutenio y tripropilamina (TPA) sobre la superficie de un electrodo de platino. El quelato de rutenio produce sales altamente estables que pueden acoplarse fácilmente a muchas especies biológicas. Para desencadenar la reacción ECLIA sólo se requiere una simple excitación eléctrica. Las reacciones quimioluminiscentes que llevan a la emisión de luz a partir del marcador de rutenio son activadas eléctricamente, por aplicación de un voltaje a la mezcla de reacción. El producto final de la reacción se forma en la misma fase de medida. La emisión de luz se mide con un fotomultiplicador situado por encima de la célula de excitación.

d) Inmunoturbidimetría para la determinación de *PCRhs*.

Son métodos basados en reacciones inmunológicas y que además poseen una gran similitud técnica con la espectrofotometría de absorción molecular.

Consisten, en concreto, en la valoración de la disminución de la potencia

radiante, de una emisión policromática, al atravesar una solución de partículas (complejos antígeno-anticuerpo solos o inmunocomplejos unidos a micropartículas), medida en la misma dirección en que es emitida. Dicha disminución es debida a procesos de absorción, dispersión y reflexión.

Los biomarcadores estudiados en este proyecto, se determinaron mediante los siguientes kits comerciales:

-NT-proBNP: test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de NT-proBNP en suero y plasma humanos. Es un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) tipo sándwich, para su uso en los analizadores automáticos Cobas/Hitachi de Roche Diagnostics®. Las muestras se procesaron en suero sin dilución previa.

-PCR ultrasensible (PCRhs): test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de PCRhs en suero y plasma humanos. Test inmunoturbidimétrico potenciado por partículas. La PCR humana se aglutina con las partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR monoclonales. El precipitado se determina por turbidimetría en los analizadores automáticos Cobas/Hitachi de Roche Diagnostics®. Las muestras se procesaron en suero sin dilución previa.

-Troponina T ultrasensible (TnT_{hs}): test inmunológico “in vitro” para la determinación cuantitativa de TnT_{hs} en suero y plasma humanos. Es un inmunoensayo altamente sensible de electroquimioluminiscencia (ECLIA) tipo sándwich, para su uso en los analizadores automáticos Cobas 6000 de Roche Diagnostics®. Las muestras se procesaron en suero sin dilución previa.

Los estudios realizados con el test Elecsys Troponin T_{hs} en 533 voluntarios sanos, proporcionaron un límite superior de referencia (percentil 99) para la troponina T de 14 ng/L (pg/mL), mientras que el intervalo de confianza del 95 % se situó entre 12,7-24,9 ng/L (pg/mL). En el test Elecsys Troponin T_{hs}, la menor concentración medida con un CV inferior o equivalente al 10 % (LdC) fue 13 ng/L (pg/mL) [197].

-Factor von Willebrand (FvW): el kit *Zymutest® Aniara Diagnostica Mason, Ohio USA*, un enzimoimmunoensayo manual para la medida de FvW en plasma humano que proporciona un método cuantitativo para determinar los niveles de FvW. Es un enzimoimmunoensayo en placa de microtitulación que utiliza un anticuerpo anti-FvW policlonal recubierto sobre la placa, un antisuero anti-FvW de conejo, un conjugado de fosfatasa alcalina y un sustrato peroxidasa para la cuantificación de FvW. Las muestras se diluyeron previamente 1/100 con el diluyente proporcionado.

-PICP: el kit *Metra®CICP EIA de QUIDEL (San Diego, USA)* proporciona un método cuantitativo para determinar los niveles de PICP (propéptido C-terminal del colágeno tipo I) en suero. Es un enzimoimmunoensayo tipo sándwich en placa de microtitulación que utiliza un anticuerpo anti-PICP monoclonal recubierto sobre la placa, un antisuero anti-PICP de conejo, un conjugado de fosfatasa alcalina anti-conejo de cabra y un sustrato pNPP para la cuantificación del PICP en suero humano. Las muestras se diluyen previamente en una proporción 1/12 con tampón de ensayo.

-PINP: test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa total en suero y plasma humanos. Es un inmunoensayo ECLIA de electroquimioluminiscencia concebido para su uso en inmunoanalizadores tipo *Cobas de Roche Diagnostics®*. Las muestras se procesaron en suero sin dilución previa.

-PIINP: el kit *Orion Diagnostica® EIA (Espoo, Finland)*, está basado en la técnica de radioinmunoensayo competitivo. Así una concentración conocida de PIINP y una concentración no conocida de PIINP en la muestra compiten por un número limitado de sitios de unión de alta sensibilidad con el anticuerpo. Un anticuerpo secundario, dirigido contra el primario que reviste los pocillos, se une al complejo antígeno-anticuerpo, que permite la separación conveniente del antígeno unido y libre. Después de la separación del antígeno libre, la

concentración de PIIINP marcado en tubo de muestra es inversamente proporcional a la concentración de PIIINP en la muestra. La cantidad de ICTP fijado se mide por la incubación con un sustrato que produce un producto final coloreado. Las muestras se procesaron en suero sin dilución previa.

-ICTP: el kit *Orion Diagnostica® EIA (Espoo, Finland)*, está basado en la técnica de inmunoensayo competitivo. Una concentración conocida de ICTP marcado con peroxidasa y una concentración de ICTP no marcado en la muestra compiten por un número limitado de sitios de unión de alta sensibilidad con el anticuerpo. Un anticuerpo secundario, contrario al primario y fijado a las celdas, se une al complejo antígeno-anticuerpo. Después del lavado del antígeno libre, la concentración de ICTP marcado en las celdas es inversamente proporcional a la concentración de ICTP en la muestra. La concentración de ICTP marcado se mide por incubación con un sustrato que produce un producto de coloración final. Las muestras se procesaron en suero sin dilución previa.

-GDF-15: los valores plasmáticos de GDF-15 se midieron mediante un ELISA comercial (*Biovendor®, Modrice, República Checa*) tipo sándwich. El anticuerpo anti-humano GDF-15 está reforzado con biotina y fijado a la placa. Se añade un conjugado de estreptavidina-HRP y después de la incubación el conjugado remanente reacciona con el sustrato TMB añadido. Se mide la absorbancia por espectrofotometría a 450 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de GDF-15. Las muestras de plasma se diluyeron previamente a 1/5.

En todas las técnicas empleadas también se incluyeron controles internos con concentraciones conocidas.

Las características de los ensayos y los valores de referencia para la población adulta se muestran en la Tabla 1.

III. Material y Métodos

	<i>NT-proBNP</i> (pg/mL)	<i>PCRhs</i> (mg/dL)	<i>TnT</i> (pg/mL)	<i>FvW</i> (UI/mL ó %)	<i>PICP</i> (ng/mL)	<i>PINP</i> (ng/mL)	<i>PIINP</i> (µg/L)	<i>ICTP</i> (µg/L)	<i>GDF-15</i> (pg/mL)
Estabilidad: T ^a ≤ 20°C	>3 meses	>3 meses	>3 meses	>3 meses	>3 meses	>3 meses	>3 meses	>3 meses	>3 meses
Muestras válidas	Suero o Plasma (EDTA, heparina de litio)	Suero o Plasma (EDTA, heparina de litio)	Suero o Plasma (EDTA, heparina de litio)	Plasma (EDTA, citrato)	Suero	Suero o Plasma (EDTA, heparina de litio)	Suero o Plasma (EDTA, heparina de litio)	Suero o plasma (EDTA)	Plasma y suero
Sensibilidad funcional	5	0,007	3	5	0,2	5	0,3	0,3	22
Rango de medida	5-35000	0,007-2	3-10000	0-150	0,2-100	5-1200	1-50	1-50	20-4480
CV intraensayo (%)	1,5	1,6	1,4	3-8	6,6	2,9	3,0	11,3	6,3
CV interensayo (%)	2,7	8,4	2,2	5-10	5	3,8	6,5	6,4	8,5

Tabla 1. Características de los ensayos de los distintos biomarcadores.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron las distintas variables de estudio mediante el cálculo de estadísticos descriptivos básicos. Respecto a las variables cualitativas, tanto las categóricas como las ordinales, fueron descritas sus frecuencias absolutas y porcentajes de cada una de las categorías.

Las variables cuantitativas continuas, fueron descritas con el valor de media, mediana, desviación estándar, error típico de la media, rango intercuartílico, máximo y mínimo, y frecuencias, con un intervalo de confianza al 95% cuando se trataba de un parámetro cuantitativo.

La distribución normal de las variables se comprobó mediante la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. Las variables de distribución normal se expresan como media \pm desviación estándar. Las variables que no siguieron una distribución normal se expresan como mediana y percentil 25 y 75. Para el análisis estadístico de ciertos biomarcadores que no siguieron distribución normal, se realizó una transformación logarítmica neperiana (\ln), pero para mayor claridad se muestran sus concentraciones como mediana y percentil 25 y 75. Las variables cualitativas se expresan como porcentajes.

En el objetivo número 1, las comparaciones entre grupos y control se analizaron mediante el test de la t de Student para variables continuas con distribución normal. Por otro lado, se aplicó el test U de Mann-Whitney para variables que no siguieron distribución normal.

En el objetivo 2, las diferencias entre más de dos grupos (clasificación en subgrupos según NYHA) se realizaron mediante test de ANOVA o Kruskal-Wallis, según indicara la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Para el objetivo 3, tanto para las comparaciones entre dos grupos a estudio como los niveles de cada biomarcador en función de las características clínicas y demográficas se realizaron mediante el test t Student, o mediante el test U-Mann-Whitney si las variables no seguían una distribución normal.

Las correlaciones entre variables continuas se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según siguieran o no, una distribución normal.

El análisis de regresión logística binaria se llevó a cabo también con la presencia/ausencia de elevación de los niveles de los distintos biomarcadores como variable dependiente (eligiendo un punto de corte apropiado en el caso de la TnT_{hs}) y diversos factores clínicos y biológicos como covariables. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis multivariado de regresión lineal se realizó para identificar los factores asociados a los niveles de los diferentes biomarcadores. Las variables con $p < 0,15$ en el análisis univariado se incluyeron en el modelo de regresión multivariado.

Para explorar la relación entre los distintos biomarcadores estudiados y su asociación con los factores de riesgo o comorbilidades relacionados con MS en MCH o peor capacidad funcional, se creó una nueva variable denominada “Factores de riesgo de muerte súbita”. En ella se incluyó a aquellos pacientes que no presentaban ningún factor de riesgo asociado a MS (Grupo 1), pacientes con uno o dos factores de riesgo (Grupo 2) y pacientes que presentaban tres o más (Grupo 3). Con esta estrategia se planteó observar el comportamiento de las concentraciones de los biomarcadores estudiados en función de ésta nueva variable creada.

Según la nueva variable creada, se evaluó el comportamiento de la concentración plasmática de cada biomarcador en cada subgrupo de la variable, según presentara factores de riesgo asociados. Se observó su significación estadística total y entre subgrupos. Para ello se aplicó el test de ANOVA de comparación de más de dos grupos y la prueba de Tukey de significación estadística a aquellos biomarcadores que siguieron una distribución normal. Para el resto de biomarcadores que no siguieron una distribución normal se aplicó el test de Kruskal Wallis.

Se realizó el análisis de datos con el paquete estadístico SPSS versión 15.0, (Chicago, Illinois, USA).

3.5 CONFIDENCIALIDAD DEL ESTUDIO

La inclusión en este estudio no ha supuesto riesgo alguno para los pacientes. Sólo han tenido acceso a los datos clínicos, los facultativos del Servicio de Análisis Clínicos y Cardiología y del grupo de investigación *Trombosis arterial y remodelado vascular, intersticial y miocárdico* que han participado en este ensayo, asegurando la confidencialidad de los mismos, estableciendo el protocolo pertinente para ello.

3.6 COMITÉ ÉTICO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Todos los pacientes y controles dieron su consentimiento firmado para la participación (Ver anexo I). El Comité Ético de Investigación de los dos centros autorizó el estudio (Ver anexo II).

3.7 FINANCIACIÓN

Esta investigación ha contado con el apoyo de un proyecto FIS PS09/00721 financiado por el Instituto de Salud Carlos III, y en parte por fondos FEDER y por Roche Diagnostics.

Juan Antonio Vélchez Aguilera disfruta de un contrato "Río Hortega" en investigación-formación financiado por el Instituto de Salud Carlos III, destinado a profesionales sanitarios que han finalizado la formación especializada.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Estrategia de análisis de resultados

El análisis de resultados se planteó en dos fases diferentes.

En una primera se realizó un estudio transversal descriptivo, comparativo, de las variables del estudio y su distribución en función del grupo de pacientes y el grupo control participantes en el mismo.

En una segunda fase, se estableció una estrategia con finalidad analítica, con el objetivo de determinar, con técnicas estadísticas multivariantes adecuadas, qué factores de riesgo se asocian en ambos grupos y cuales se asocian a las diferentes variables clínicas evaluadas, identificando la magnitud de asociación y las diferencias que existen entre los grupos, en función de los valores que presentan las variables.

Para llevar a cabo un adecuado análisis estadístico de la población de estudio, se aplicó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, siendo únicamente dos las variables que seguían una distribución normal: FvW y PICP (Tabla 2). Para el estudio de dichos biomarcadores se aplicaron test paramétricos, mientras que al resto de biomarcadores se optó por seguir tests no paramétricos.

Papel de los biomarcadores en la miocardiopatía hipertrófica

<i>Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra</i>										
	<i>GDF-15</i>	<i>FvW</i>	<i>NT-proBNP</i>	<i>PCRhs</i>	<i>TnT_{hs}</i>	<i>PICP</i>	<i>PINP</i>	<i>ICTP</i>	<i>ratio PICP/ICTP</i>	<i>PIIINP</i>
<i>N</i>	102	124	95	95	95	95	95	95	95	95
<i>Z de Kolmogorov-Smirnov</i>	1,821	1,175	1,455	3,827	3,232	1,219	1,562	1,384	3,562	1,774
<i>Sig. asintót. (bilateral)</i>	0,003	0,126	0,029	<0,001	<0,001	0,102	0,015	0,043	<0,001	0,004

Tabla 2. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de los marcadores bioquímicos.

4.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO

4.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y GRUPO CONTROL:

Las características clínicas de los pacientes y controles del estudio se resumen en la Tabla 3. Se incluyeron 124 pacientes estables con MCH que asisten a consulta monográfica de dicha enfermedad para el seguimiento de rutina, en dos hospitales españoles (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia y el Hospital General Universitario de Alicante). Los pacientes con MCH se compararon con 78 sujetos control de similar edad y sexo.

De los pacientes seleccionados, 91 (73%) eran varones con una edad de $47,7 \pm 14,2$ años. Sesenta y ocho pacientes (54,8%) presentaron deterioro de su clase funcional (NYHA \geq II), y seis pacientes presentaban disfunción sistólica (6,3%). Cincuenta y siete (46%) presentaron angina de pecho y ochenta y cuatro pacientes (67%) mostraron realce tardío con Gadolinio (RTG) evaluado por CRM.

VARIABLES CLÍNICAS	PACIENTES (n: 124)	CONTROLES SANOS (n: 78)	VALOR DE p
Sexo masculino	91 (73%)	32 (68,9)	0,387
Edad (años)	47,7 ± 14,2	47,8 ± 9,9	0,771
NYHA I	56 (45,1%)		
NYHA II	48 (38,7%)		
NYHA III	20 (16,1%)		
Hipertensión	36 (37,8%)	8 (17,8)	0,266
Antecedentes familiares de muerte súbita	23 (24,2%)	-	
Angina	57 (46%)	-	
Síncope recurrente	22 (23,1%)	-	
Fibrilación auricular (FA)	22 (23,1%)	-	
DATOS DEL ECOCARDIOGRAMA DOPPLER			
Diámetro de la aurícula izquierda (mm)	43,5 ± 6,8	-	
VAI (mm³/m² superficie corporal)	35,8 ± 15,8	-	
Máximo grosor de pared del VI (≥30 mm)	5 (5,3%)	-	
Máximo grosor de pared del VI (mm)	20,5 ± 5,1	-	
DTDVI (mm)	43,8 ± 6,8	-	
DTSVI (mm)	24,9 ± 6,5	-	
Disfunción sistólica ventricular	6 (6,3%)	-	
FEVI %	67,3±10,5	-	
Cociente E/A (llenado mitral)	1,30 (0,86-1,57)	-	
GTSVI > 30 mmHg	43 (45,2%)	-	
DATOS DE LA ERGOMETRÍA			
Respuesta tensional anormal	30 (35,3%)	-	
METs	9,4 ± 3,3	-	
TVNS en HOLTER-ECG	27 (28,4%)	-	
RTG	69 (72,6%)	-	

Tabla 3. Características basales de la población de estudio con MCH y sujetos control. Los datos expresan n (%), media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico).

NYHA: Clase funcional según la New York Heart Association.

FA: Hace referencia a pacientes con fibrilación auricular crónica o con algún episodio previo de fibrilación auricular, independientemente del ritmo actual.

Cociente E/A: relación de las ondas tempranas y tardías de Doppler espectral de llenado ventricular.

GTSVI: Gradiente del tracto sistólico de salida del VI.

METs: Capacidad funcional expresada en equivalentes metabólicos.

FEVI: Fracción de eyección del VI.

DTDVI: Diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.

DTSVI: Diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo.

RTG: Realce tardío con gadolinio.

TVNS: Taquicardia ventricular no sostenida.

VAI: Volumen auricular indexado por superficie corporal.

4.1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO CLASIFICADA SEGÚN LA ESCALA NYHA

Debido al marcado interés de estudiar la relación existente entre pacientes con MCH y la severidad de la propia enfermedad en nuestra población, decidimos evaluar los diferentes aspectos clínicos de la cohorte de estudio, subclasificando en tres subgrupos según la clase funcional (NYHA). Esta clasificación permite identificar una relación entre las diferentes variables clínicas observadas y la gravedad de la enfermedad, asociada a peor estado de capacidad funcional según los tres grupos de la NYHA (Tabla 4).

Encontramos diferencias significativas en los grupos funcionales con respecto a las características basales, como la edad, el sexo masculino, historia de síncope previo ($p < 0,001$, $p = 0,002$ y $p = 0,034$, respectivamente), peor capacidad de respuesta al ejercicio ($p < 0,001$), obstrucción ($p < 0,001$), grosor máximo del VI ($p = 0,002$) y como era de esperar la presencia de disnea ($p < 0,001$). Marcadores de la disfunción diastólica como el VAI o el diámetro de la AI se mostraron asociados al estado funcional ($p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente). Además observamos un progresivo deterioro de la función renal a través de una disminución del aclaramiento de creatinina (ml/min) a medida que encontrábamos una peor capacidad funcional ($p = 0,007$).

	<i>NYHA I</i>	<i>NYHA II</i>	<i>NYHA III</i>	<i>Valor de p</i>
VARIABLES CLÍNICAS				
<i>Edad</i>	40,1 ± 14,6	53,1 ± 14,7	56,1 ± 12,1	<0,001
<i>Sexo masculino</i>	86,5%	68,3%	48,1%	0,002
<i>HTA</i>	23,1%	36,8%	41,7%	0,101
<i>MS familiar</i>	19,6%	22,6%	20,8%	0,950
<i>Historia de síncope</i>	5,9%	25,4%	36,1%	0,034
<i>Disnea</i>	5,1%	100%	100%	<0,001
<i>Historia de FA</i>	12,6%	23,7%	29,9%	0,095
DATOS DEL ECOCARDIOGRAMA DOPPLER				
<i>Diámetro AI (mm)</i>	40,2 ± 7,1	44,2 ± 6,7	45,5 ± 5,2	0,001
<i>VAI (mm³/m² superficie corporal)</i>	48,9 (40,3-60,5)	67,9 (55,1-83,7)	48,8 (37,9-54,3)	<0,001
<i>MGVI ≥ 30mm</i>	9,8%	5,1%	0%	0,002
<i>MGVI (mm)</i>	17,0 (17,1-21,3)	20,5 (19,9-23,5)	23,0 (20,1-25,4)	0,219
<i>DTDVI (mm)</i>	44,8 ± 5,7	43,6 ± 6,1	42,3 ± 9,3	0,250
<i>DTSVI (mm)</i>	25,3 ± 5,2	24,7 ± 6,3	23,3 ± 9,7	0,530
<i>Disfunción sistólica</i>	9,8%	3,3%	4,0%	0,322
<i>FEVI %</i>	66,2 ± 9,6	66,4 ± 11,2	71,9 ± 13,4	0,184
<i>Cociente E/A</i>	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,7	1,8 ± 1,3	0,460
<i>Gradiente TSVI >30 mm Hg</i>	15,7%	38,3%	72,1%	<0,001
DATOS DE LA ERGOMETRÍA				
<i>Respuesta tensional anormal</i>	33,3%	42,6%	52,2%	0,315
<i>METs</i>	11,5 ± 3,1	8,5 ± 2,7	6,7 ± 2,3	<0,001
<i>TVNS</i>	20,8%	31,7%	37,5%	0,274
<i>RTG</i>	62,7%	71,9%	85,1%	0,150
<i>Aclaramiento de creatinina ml/min</i>	133,1 ± 45,8	129,5 ± 47,8	84,9 ± 33,3	0,007

Tabla 4. Características basales de la población de estudio con MCH, clasificando dicha población según los tres grupos de la NYHA. Los datos expresan n (%), media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). Comparación mediante test de ANOVA o Kruskal-Wallis. Ver abreviaturas en la tabla 3.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE BIOMARCADORES EN MCH

4.2.1 OBJETIVO 1: ESTUDIO DE CONCENTRACIONES DE LOS BIOMARCADORES ENTRE PACIENTES Y GRUPO CONTROL

La comparación de las concentraciones de los diferentes marcadores asociados a estrés parietal, inflamación, daño miocárdico o disfunción endotelial estudiados entre la cohorte con MCH y el grupo control arrojó los siguientes resultados: se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de NT-proBNP, FvW y TnT_{hs} ($p < 0,001$ en todos ellos). Mientras que no se encontraron diferencias entre los valores de PCR_{hs} y GDF-15 ($p = 0,211$ y $p = 0,101$ respectivamente) (Tabla 5).

	Pacientes (n:124)	Controles (n: 78)	Valor de p
NT-pro BNP (pg/ml)	228,0 (117,0-500,0)	27,8 (12,7-76,4)	<0,001
PCR ultrasensible (mg/dl)	0,150 (0,080-0,240)	0,100 (0,007-0,230)	0,211
Factor Von Willebrand * (UI/mL ó %)	139,6 ± 64,8	105,0 ± 51,0	<0,001
Troponina T ultrasensible (pg/ml)	12 (7-18)	3 (3-4) (n: 45)	<0,001
GDF-15 (pg/ml)	2642 (2130-3471) (n: 102)	3043 (2314-4604)	0,101

Tabla 5. Relación de concentraciones de biomarcadores estudiados entre grupo de pacientes y grupo control y su correspondiente significación estadística (p). Test de comparación de medias T de Student para FvW y test de U de Mann-Whitney para el resto.

Por otro lado, la comparación de medias del grupo de péptidos relacionados con el remodelado cardíaco se muestra en la Tabla 6. De las concentraciones de los diferentes péptidos del colágeno tipo I y III entre los sujetos de estudio y sujetos control, podemos observar como el PINP, no presenta significación estadística. De

igual modo PICP y PIIINP, aún mostrando concentraciones de cierta tendencia a ser mayores en los pacientes, no presentan significación estadística que demuestre una formación aumentada de estos péptidos del colágeno tipo I o III en nuestra población.

En cuanto al ICTP como marcador de degradación de colágeno tipo I, sí se observó significación estadística ($p=0,041$). Se encontró una concentración aumentada en los pacientes de 2,35 (1,15-3,94) $\mu\text{g/L}$ frente a 1,78 (1,27-2,78) $\mu\text{g/L}$, en los controles. De igual modo en la ratio resultante entre PICP e ICTP también se observaron diferencias significativas ($p=0,026$), 48,02 (31,0-96,3) ng/ml , frente a 46,8 (32,2-70,0) ng/ml .

	Pacientes (n=95)	Controles (n=78)	Valor de p
PICP* (ng/ml)	124,5 \pm 55,3	110,2 \pm 43,2	0,145
PINP (ng/ml)	27,30 (24,40-38,60)	33,20 (26,50-39,60)	0,937
ICTP ($\mu\text{g/L}$)	2,35 (1,15-3,94)	1,78 (1,27-2,78)	0,041
PIIINP ($\mu\text{g/L}$)	3,67 (2,83-4,55)	3,41 (2,81-4,19)	0,129
Ratio PICP/ICTP	48,0 (31,0-96,3)	46,8 (32,2-70,0)	0,026

Tabla 6. Relación de concentraciones de los diferentes péptidos entre grupo de pacientes y grupo control y su correspondiente significación estadística (p). Para el análisis de PINP, PIIINP y ratio PICP/ICTP que no siguen distribución normal, se realizó una transformación logarítmica neperiana. Test de comparación de medias T de Student para PICP y test de U de Mann-Whitney para el resto.

4.2.2 OBJETIVO 2: ESTUDIO DE CONCENTRACIONES DE LOS BIOMARCADORES ENTRE PACIENTES DEL ESTUDIO CLASIFICADOS SEGÚN LA ESCALA NYHA

De igual modo, debido al interés del estudio de biomarcadores en relación con la severidad visto en otras enfermedades cardiovasculares, se decidió explorar también la asociación del grupo de biomarcadores evaluados en la cohorte de estudio, en función de la capacidad funcional. Se compararon por tanto, las concentraciones en los tres subgrupos clasificados según la clase funcional (NYHA) con el fin de identificar una relación entre estos datos y una posible gravedad de la enfermedad, asociada a peor estado de capacidad funcional según la NYHA (Tabla 7).

Se encontraron diferencias significativas en el aumento de los valores de algunos biomarcadores estudiados en función del subgrupo de peor capacidad funcional. Así, se apreció como los valores de NT-proBNP se comportan de diferente forma en los tres grupos de NYHA ($p=0,005$) y las concentraciones de GDF-15 aumentaban a peor estado de capacidad funcional ($p=0,006$), ambos marcadores asociados previamente a severidad de otras enfermedades cardiovasculares. De igual modo, las concentraciones de TnT_{hs} y PCR_{hs} mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p=0,042$ y $p=0,045$ respectivamente) (Tabla 7).

BIOMARCADORES SEGÚN ESCALA NYHA	NYHA I	NYHA II	NYHA III	Valor de p
NT-proBNp (pg/ml)	238 (77-529)	199 (133-378)	533 (196-744)	0,005
PCRhs (mg/dl)	0,125 (0,007-0,230)	0,180 (0,110-0,295)	0,150 (0,100-0,600)	0,045
FvW (UI/ml)	131,4 ± 61,6	132,5 ± 60,1	168,3 ± 65,8	0,062
TnThs (pg/ml)	10 (5-16)	12 (7-17)	19 (11-29)	0,042
GDF-15 (pg/ml)	2878 (2290-3927)	3275 (2756-3203)	4159 (3634-7242)	0,006
PICP (ng/ml)	130,2 ± 69,2	114,2 ± 35,6	129,4 ± 47,6	0,308
PINP (ng/ml)	26,8 (23,5-39,67)	30,8 (24,9-42,1)	26,5 (23,7-40,7)	0,731
ICTP (µg/L)	2,4 (1,1-4,1)	2,1 (1,1-3,8)	2,1 (1,3-3,6)	0,795
PIIINP (µg/L)	3,6 (2,7-4,5)	3,7 (2,8-4,5)	3,8 (3,4-6,1)	0,315
Ratio PICP/ICTP	47,7 (30,1-89,5)	45,3 (25,9-109,3)	50,6 (43,4-88,7)	0,617

Tabla 7. Características de los biomarcadores en la población de estudio con MCH, clasificando dicha población según los tres grupos de la NYHA. Los datos expresan n (%), media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico. Comparación mediante test de ANOVA o Kruskal-Wallis..

4.3 OBJETIVO 3: EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE BIOMARCADORES EN MCH Y SU ASOCIACIÓN A VARIABLES CLÍNICAS

4.3.1 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS PARIETAL: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS (NT-proBNP)

Los pacientes con MCH mostraron niveles altos de NT-proBNP (pg/ml) en comparación con los controles sanos (228 (117-500) vs 27 (12-76), $p < 0,001$).

Las características clínicas y su asociación con los niveles de NT-proBNP en pacientes con MCH se resumen en la Tabla 8, en la que se muestra como se encuentran asociados los niveles séricos del biomarcador con las diferentes variables clínicas estudiadas en nuestra población de pacientes y que suponen una severidad de la propia MCH.

Se encontró aumento de la concentración de NT-proBNP (pg/ml) en pacientes con MCH y que presentaban historia de MS familiar (294 (137-524) vs 100 (18-235) pg/ml, $p < 0,001$), en pacientes con presencia de fibrosis marcada mediante RTG (272 (153-523) vs 117 (33-398) pg/ml, $p = 0,003$) y en aquellos pacientes que presentan una clase funcional con Disnea severa: NYHA \geq III, (498 (218-752) vs 106 (19-276) pg/ml, $p < 0,001$). (Figuras 17 A-C)

<i>Condición</i>	NT-proBNP (pg/ml) (n=95)		<i>Valor de p</i>
	<i>Si</i>	<i>No</i>	
<i>Género Masculino</i>	229 (114-481)	227 (137-607)	0,442
<i>Disnea ≥II</i>	227 (141-478)	224 (77-519)	0,328
<i>Disnea severa ≥III</i>	498 (218-752)	106 (19-276)	<0,001
<i>HTA</i>	214 (137-326)	252 (116-513)	0,378
<i>MS familiar</i>	294 (137-524)	100 (18-235)	<0,001
<i>Historia de síncope recurrente</i>	171 (122-365)	235 (116-513)	0,553
<i>Historia de FA</i>	310 (167-503)	221 (116-505)	0,481
<i>Máximo grosor de pared del VI (≥30 mm)</i>	230 (132-562)	227 (117-491)	0,561
<i>GTSVI > 30mm Hg</i>	224 (105-513)	227 (139-502)	0,644
<i>Disfunción sistólica</i>	463 (129-537)	223 (117-494)	0,491
<i>Respuesta tensional anormal</i>	333 (132-562)	227 (134-471)	0,301
<i>TVNS</i>	257 (167-533)	215 (105-507)	0,185
<i>RTG</i>	272 (153-523)	117 (337-398)	0,003
<i>Grupo sanguíneo O (sí) ó AB (no)</i>	328 (133-561)	237 (159-480)	0,542

Tabla 8. Diferencias en los valores de NT-proBNP asociados a las variables clínicas.

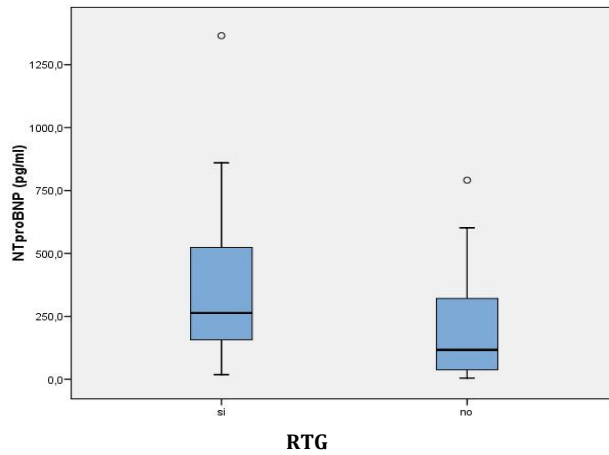


Figura 17A) Concentración de NT-proBNP en pacientes con MCH que presentan fibrosis miocárdica evaluada por RTG, frente a pacientes con MCH que no la presentan ($p=0,003$).

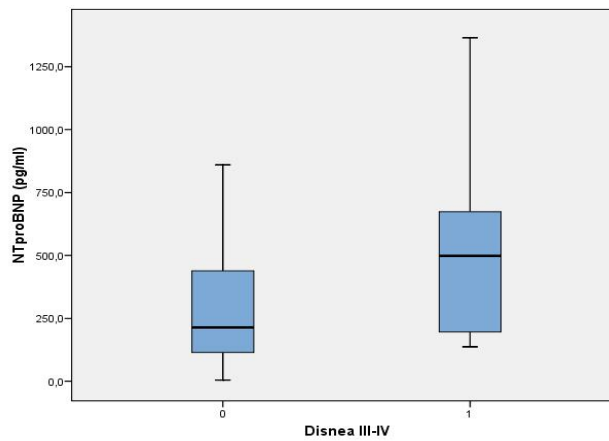


Figura 17B) Concentración de NT-proBNP en pacientes con MCH que presentan peor clase funcional (Disnea III-IV) (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0) ($p<0,001$).

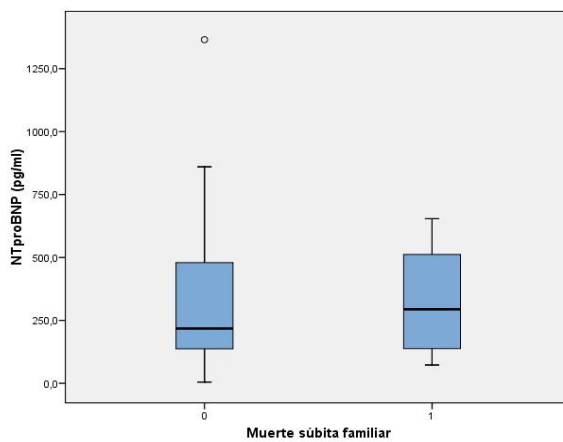


Figura 17C) Concentración de NT-proBNP en pacientes con MCH que presentan historia de muerte súbita familiar (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0), ($p<0,001$).

Se evaluó la concentración sérica del NT-proBNP en MCH y las posibles correlaciones con datos ecocardiográficos y variables clínicas. Para ello mediante correlaciones bivariadas aplicando el método de Spearman, se observó si las concentraciones séricas de dicho biomarcador correlacionaban con alguna de las variables clínicas y datos ecocardiográficos obtenidos del ecocardiograma Doppler, el Holter-ECG para la TVNS, el porcentaje de fibrosis por RTG y la ergometría evaluada por los METs. (Tabla 9).

No se encontró asociación significativa del NT-proBNP con la obstrucción del tracto sistólico de salida del VI. Tampoco se encontró correlación con el DTDVI, la FEVI o signos de disfunción sistólica (Figuras 18 A-B). Sí mostraron correlaciones significativas, el porcentaje de fibrosis evaluado por RTG ($r: 0,263, p=0,018$) y el valor del volumen auricular indexado ($r: 0,336, p=0,008$).

<i>NT-proBNP</i>	<i>Valor de r</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Edad</i>	0,10	0,296
<i>Diámetro Aurícula Izquierda</i>	0,15	0,147
<i>VAI</i>	0,33	0,008
<i>DTDVI</i>	0,08	0,417
<i>Máximo grosor de pared del VI</i>	0,19	0,061
<i>FEVI</i>	0,04	0,651
<i>GTSVI</i>	0,04	0,652
<i>Cociente E/A</i>	0,13	0,173
<i>METs</i>	0,18	0,090
<i>% de fibrosis (RTG)</i>	0,26	0,018
<i>Aclaramiento de creatinina(ml/min)</i>	-0,13	0,272

Tabla 9. Correlaciones bivariadas de la NT-proBNP (Correlaciones de Spearman).

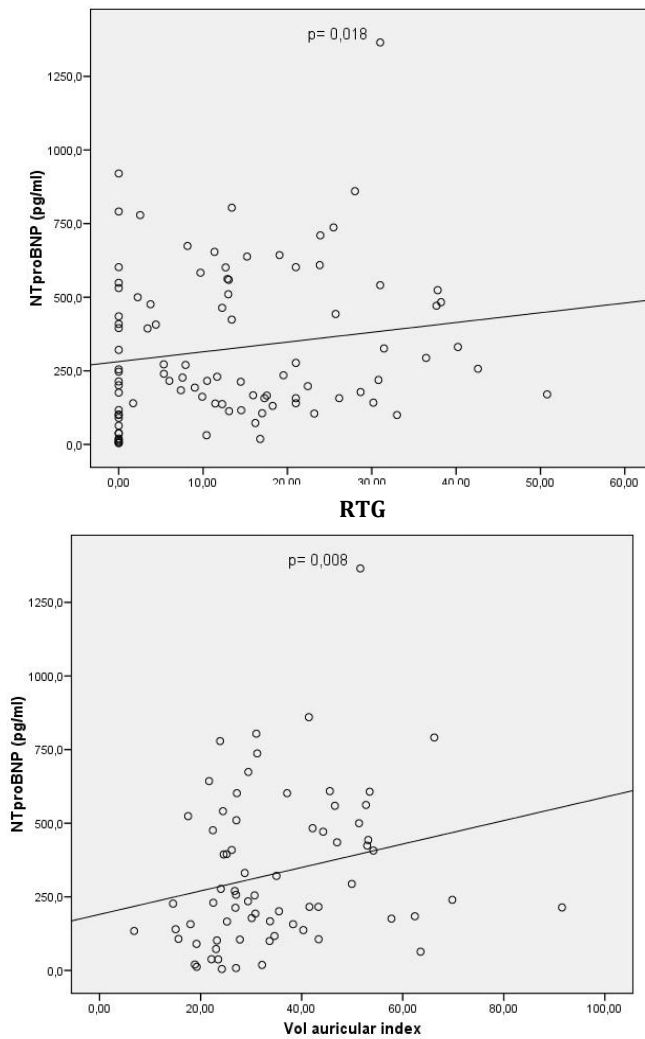


Figura 18 A-B) Gráficos de dispersión que muestran la distribución del NT-proBNP correlacionando significativamente con variables clínicas evaluadas: fibrosis evaluada mediante RTG y el VAI.

Analizando los datos de las concentraciones de NT-proBNP (pg/ml) según la capacidad funcional, se pudo ver como existía diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos de la NYHA asociados a peor capacidad funcional. Las medianas y percentil 25 y 75 fueron de: 238 (77-529) pg/ml para grupo NYHA I (1), 199 (133-378) pg/ml para NYHA II (2) y 533 (196-744) pg/ml para NYHA III (3) con un valor de $p=0,005$. (Figura 19).

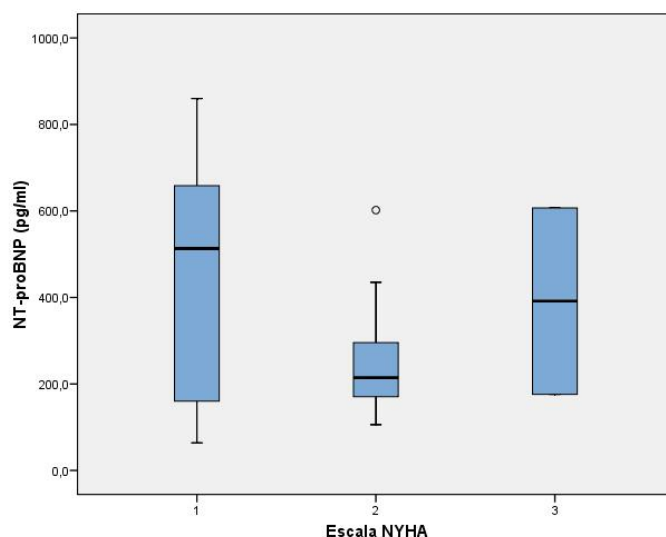


Figura 19. Comparación de los valores de NT-proBNP en función de tres subgrupos de los pacientes con MCH clasificados según la escala NYHA. Comparación mediante test de Kruskal-Wallis ($p=0,005$).

Para el análisis de regresión lineal multivariado, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a valores de NT-proBNP ($r^2= 0,06$; $p=0,032$), sólo un 6% de la variabilidad del biomarcador se explica con el modelo. Así, solo se observó como variable predictora independiente, la presencia de fibrosis ($\beta= 0,28$; $p=0,032$) y con respecto a la disnea severa \geq III ($\beta= 1,01$; $p=0,067$), se observó una clara tendencia.

4.3.2 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN: PCRhs

La evaluación de la concentración de PCRhs como marcador de inflamación en los pacientes con MCH no mostró diferencias significativas en su comparación entre pacientes y controles sanos. La PCRhs, en un rango de medición hasta 0.015 mg/dl, no evidenció asociación con las principales variables estudiadas en MCH (Tabla 10).

<i>Condición</i>	PCRhs (mg/dl) (n= 95)		<i>Valor de p</i>
	<i>Si</i>	<i>No</i>	
<i>Género Masculino</i>	0,14 (0,08-0,24)	0,15 (0,08-0,28)	0,442
<i>Disnea ≥II</i>	0,15 (0,10-0,30)	0,13 (0,07-0,23)	0,097
<i>Disnea severa ≥III</i>	0,12 (0,08-0,30)	0,15 (0,08-0,24)	0,639
<i>HTA</i>	0,18 (0,10-0,32)	0,11 (0,07-0,21)	0,002
<i>Historia de síncope recurrente</i>	0,13 (0,11-0,31)	0,15 (0,08-0,24)	0,661
<i>MS familiar</i>	0,23 (0,16-0,31)	0,13 (0,07-0,24)	0,956
<i>Historial de FA</i>	0,23 (0,16-0,31)	0,13 (0,07-0,24)	0,005
<i>Máximo grosor de pared del VI(≥30 mm)</i>	0,07 (0,03-0,23)	0,15 (0,08-0,25)	0,125
<i>GTSVI > 30mm Hg</i>	0,15 (0,10-0,31)	0,15 (0,07-0,21)	0,088
<i>Disfunción sistólica</i>	0,24 (0,05-0,89)	0,14 (0,08-0,24)	0,472
<i>Respuesta tensional anormal</i>	0,14 (0,09-0,24)	0,15 (0,07-0,28)	0,985
<i>TVNS</i>	0,16 (0,09-0,30)	0,14 (0,08-0,24)	0,380
<i>RTG</i>	0,15 (0,08-0,24)	0,13 (0,08-0,27)	0,732
<i>Grupo sanguíneo O (sí) ó AB (no)</i>	0,15 (0,10-0,24)	0,15 (0,10-0,30)	0,680

Tabla 10. Diferencias en los valores de PCRhs asociados a las variables clínicas.

Sí se observó un aumento significativo de la concentración de PCRhs (mg/dl) en pacientes con MCH y que presentaban hipertensión arterial (0,18 (0,10-0,32) vs 0,11 (0,07-0,21) mg/dl, p=0,002), y en pacientes con historial de episodios de FA (0,23 (0,16-0,31) vs 0,13 (0,07-0,24) mg/dl, p=0,005 (Figuras 20 A-B).

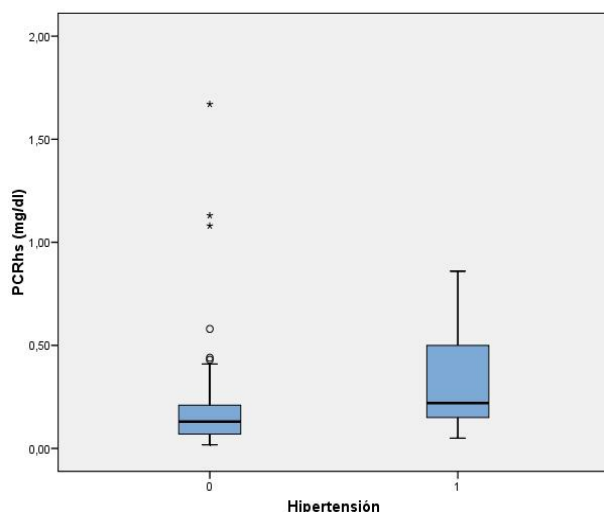


Figura 20A) Concentración de PCRhs en pacientes con MCH que presentan asociada HTA (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0), ($p=0,002$).

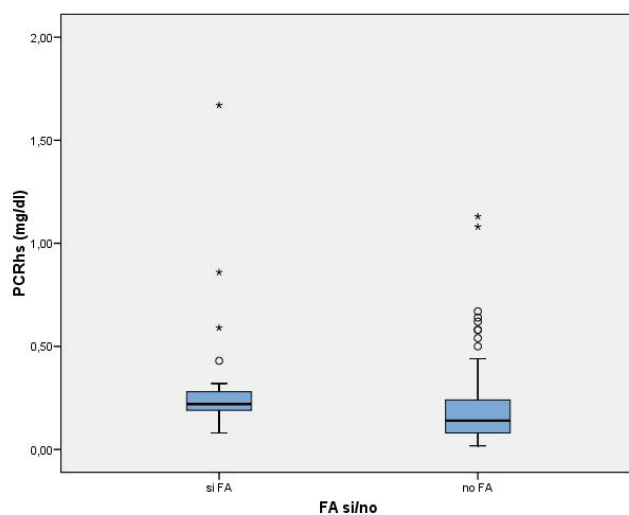


Figura 20B) Concentración de PCRhs en pacientes con MCH que presentan historial de fibrilación auricular, frente a pacientes con MCH que no la presentan, ($p=0,005$).

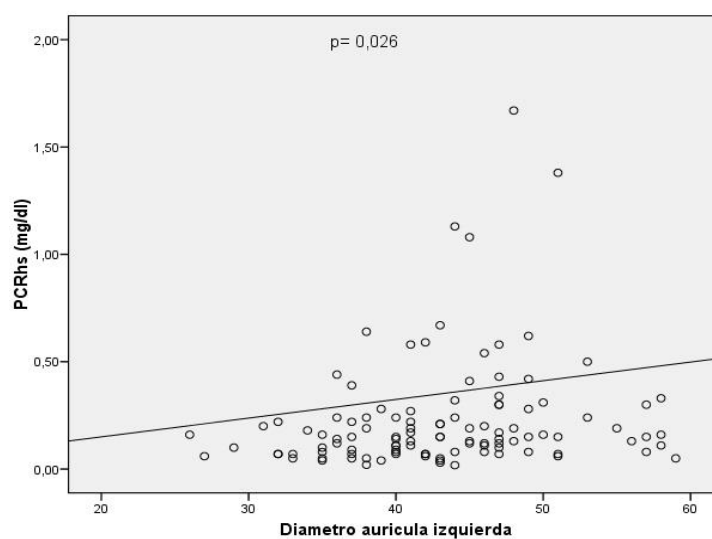
Mediante correlaciones bivariadas, se trató de comprobar si la concentración sérica de PCRhs correlacionaba con algunas de las variables clínicas y datos ecocardiográficos obtenidos del estudio Doppler, el Holter-ECG para la TVNS, el porcentaje de fibrosis por RTG y los METs realizados en la ergometría (Tabla 11).

Sólo se encontró correlación significativa con los datos de la ergometría ($r: -0,382, p<0,001$) y el Diámetro de la aurícula izquierda ($r: 0,233, p=0,026$) (Figura 21 A-B). No se encontró asociaciones de los péptidos con una obstrucción del tracto sistólico de salida del VI. Tampoco se observó correlación con el DTDVI,

la FEVI o el porcentaje de fibrosis evaluado por RTG. Tampoco aparecen correlaciones con el valor del volumen auricular indexado o que muestra signos de disfunción sistólica.

<i>PCRhs</i>	<i>Valor de r</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Edad</i>	0,14	0,169
<i>Diámetro Aurícula Izquierda</i>	0,23	0,026
<i>VAI</i>	0,12	0,347
<i>DTDVI</i>	-0,10	0,303
<i>Máximo grosor de pared del VI</i>	0,05	0,594
<i>FEVI</i>	0,01	0,948
<i>GTSVI</i>	0,14	0,170
<i>METs</i>	-0,38	<0,001
<i>% de fibrosis (RTG)</i>	-0,15	0,179
<i>NT-proBNP</i>	-0,16	0,072
<i>Aclaramiento de creatinina (ml/min)</i>	-0,13	0,243

Tabla 11. Correlaciones bivariadas de la NT-proBNP (Correlaciones de Spearman).



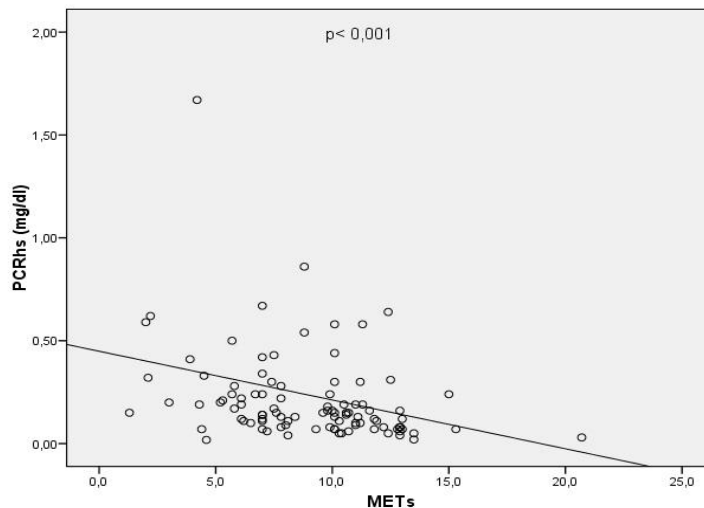


Figura 21A-B). Gráficos de dispersión que muestra la distribución de la PCRhs correlacionando significativamente con variables clínicas evaluadas.

Analizando los datos de las concentraciones de PCRhs (mg/dl) según la capacidad funcional, se observó como existe diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos de la NYHA asociados a peor capacidad funcional. Las medianas y percentil 25 y 75 fueron de: 0,125 (0,007-0,230) mg/dl para grupo NYHA I (1), 0,180 (0,110-0,295) mg/dl para NYHA II (2) y 0,150 (0,100-0,600) mg/dl para NYHA III (3), con un valor de $p=0,045$. (Figura 22).

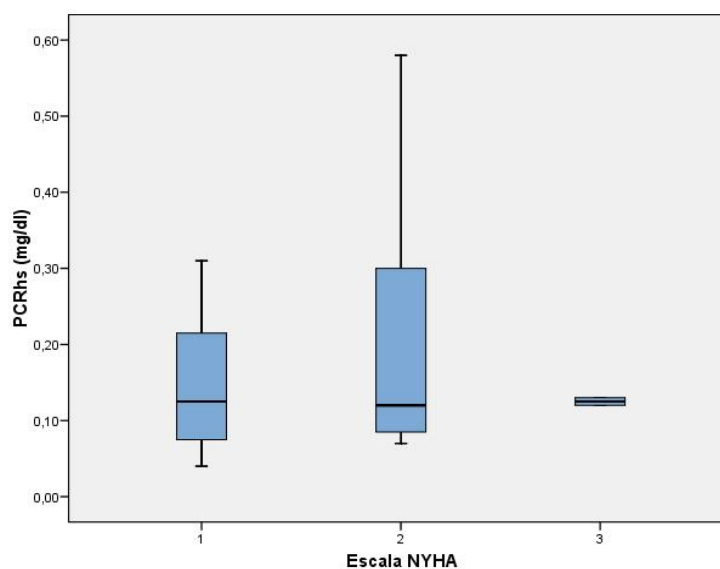


Figura 22. Comparación de los valores de PCRhs en función de tres subgrupos de los pacientes con MCH clasificados según la escala NYHA. Comparación mediante test de Kruskal-Wallis ($p=0,045$).

4.3.3 BIOMARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL: FvW

Los pacientes con MCH mostraron niveles altos de FvW en comparación con los controles sanos ($139,6 \pm 64,8$ UI/mL vs $105,0 \pm 51,0$ UI/mL, $p < 0,001$) (Tabla 5). En el conjunto de la población del estudio (controles y pacientes con MCH), hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de FvW entre el grupo ABO 0 y grupo no 0 ($116,2 \pm 58,6$ UI/mL vs $137,3 \pm 58,4$, $p = 0,022$) pero tras ajustar por el grupo ABO la distribución entre controles y pacientes con MCH se mantuvo similar ($p = 0,411$).

Las características clínicas y su asociación con los niveles de FvW en pacientes con MCH se resumen en la Tabla 12. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de FvW (UI/ml) en función de la severidad de los tres grupos de la NYHA: NYHA I ($131,4 \pm 61,6$) UI/ml, NYHA II ($132,5 \pm 60,1$) UI/ml y NYHA III ($168,3 \pm 65,8$) UI/ml, $p = 0,062$ (Tabla 7). Sí en cambio, se encontró un aumento de la concentración del FvW en pacientes con MCH y que presentaban clase funcional severa Grado III/IV frente al resto: ($168,4 \pm 65,9$ UI/ml vs $132,4 \pm 60,7$ UI/ml, $p = 0,020$), FA ($175,8 \pm 69,4$ UI/ml vs $133,0 \pm 59,0$ UI/ml, $p = 0,005$), hipertensión ($161,4 \pm 60,8$ UI/ml vs $128,9 \pm 60,5$ UI/ml, $p = 0,010$), obstrucción significativa del VI ($153,9 \pm 67,9$ UI/mL vs $128,2 \pm 57,4$ UI/ml, $p = 0,046$), el grupo sanguíneo diferente al 0 ($152,9 \pm 61,7$ UI/ml vs $126,2 \pm 64$ UI/ml, $p = 0,035$) y taquicardia ventricular no sostenida ($159,3 \pm 59,1$ UI/mL vs $133,0 \pm 63,0$ UI/ml, $p = 0,049$) (Figuras 23 A-E). No se observaron diferencias significativas entre los pacientes que sufrieron casos de angina de pecho o sin ella ($143,5 \pm 64,2$ UI/ml vs $134,3 \pm 63,5$ UI/ml, $p = 0,466$). La fibrilación auricular no parece ser la única variable responsable de las diferencias entre los pacientes con MCH y controles sanos, porque cuando se compararon los pacientes con MCH en ritmo sinusal con los controles sanos, las diferencias entre los niveles plasmáticos de FvW son aún significativas ($133,0 \pm 59,0$ UI/ml vs $105,1 \pm 51,2$, $p = 0,005$) (Figura 24). Estas diferencias no existen entre los pacientes con MCH en ritmo sinusal y los controles ($133,0 \pm 59,0$ UI/ml vs $121,5 \pm 36,6$, $p = 0,270$).

<i>Condición</i>	FvW UI/ml (n= 124)		<i>Valor de p</i>
	<i>Si</i>	<i>No</i>	
<i>Género masculino</i>	141,9 ± 60,5	132,2 ± 70,3	0,467
<i>Clase según NYHA ≥ III/IV</i>	168,4 ± 65,9	132,4 ± 60,7	0,020
<i>HTA</i>	161,4 ± 60,8	128,9 ± 60,5	0,010
<i>Angina</i>	143,5 ± 64,2	134,3 ± 63,5	0,466
<i>Historia de síncope</i>	139,5 ± 56,6	139,1 ± 63,4	0,979
<i>Historial de FA</i>	175,8 ± 69,4	133,0 ± 59,0	0,005
<i>Máximo grosor de pared del VI (≥ 30 mm)</i>	105,1 ± 42,6	141,9 ± 64,0	0,169
<i>GTSVI > 30mm Hg</i>	153,9 ± 67,9	128,2 ± 57,4	0,046
<i>Disfunción sistólica</i>	144,6 ± 78,4	139,6 ± 62,8	0,841
<i>Respuesta tensional anormal al ejercicio</i>	143,2 ± 61,1	135,5 ± 64,4	0,567
<i>TVNS en Holter</i>	159,3 ± 59,1	133,0 ± 63,0	0,049
<i>RTG</i>	138,7 ± 68,1	144,8 ± 56,1	0,652
<i>Grupo sanguíneo O (sí) ó AB (no)</i>	126,2 ± 64,0	152,9 ± 61,7	0,035

Tabla 12. Diferencias en los valores de FvW asociados a las variables clínicas.

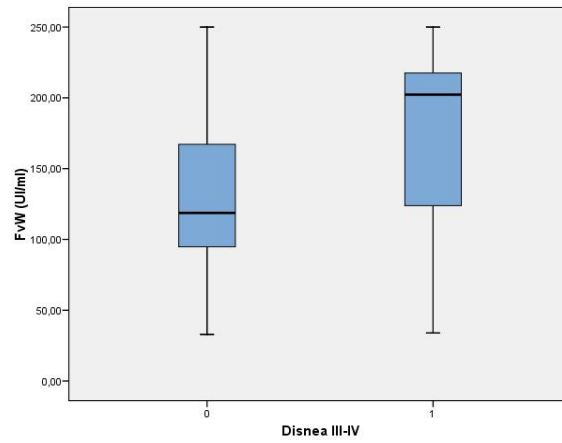


Figura 23 A) Concentración de FvW en pacientes con MCH que presentan asociada peor clase funcional (Disnea III-IV) (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0) ($p=0,020$).

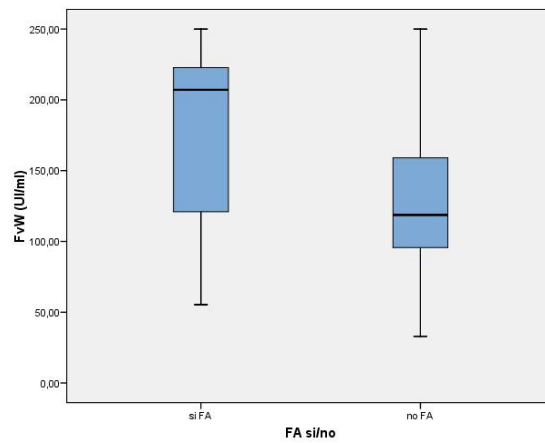


Figura 23 B) Concentración de FvW en pacientes con MCH que presentan antecedentes de fibrilación auricular, frente a pacientes con MCH que no la presentan, ($p=0,005$).

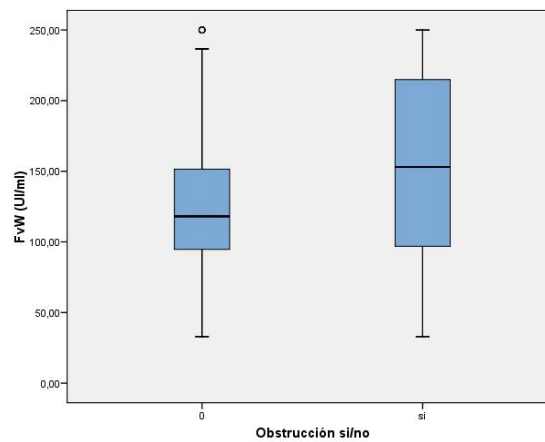


Figura 23 C) Concentración de FvW en pacientes con MCH que presentan obstrucción en el tracto sistólico de salida del VI > 30 mm Hg (GTSVI), frente a pacientes con MCH que no la presentan, ($p=0,046$).

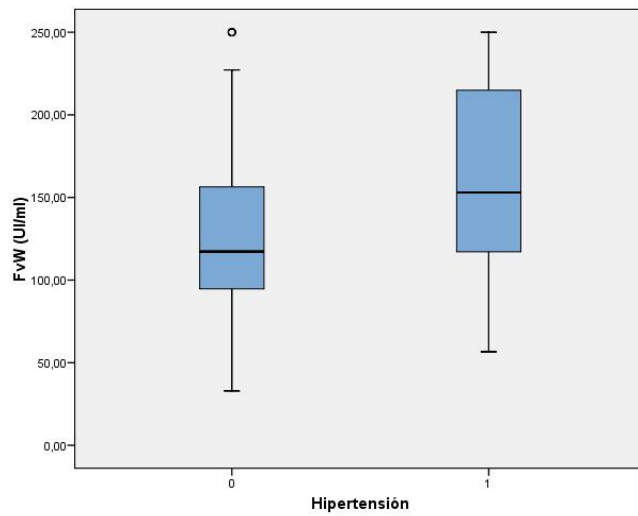


Figura 23 D) Concentración de FvW en pacientes con MCH que presentan HTA (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0), ($p=0,010$).

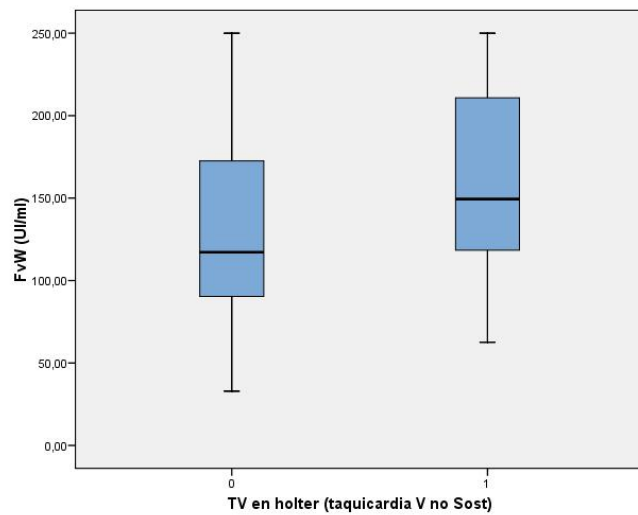


Figura 23 E) Concentración de FvW en pacientes con MCH que presentan TVNS evaluada en el Holter, frente a pacientes con MCH que no la presentan, ($p=0,049$).

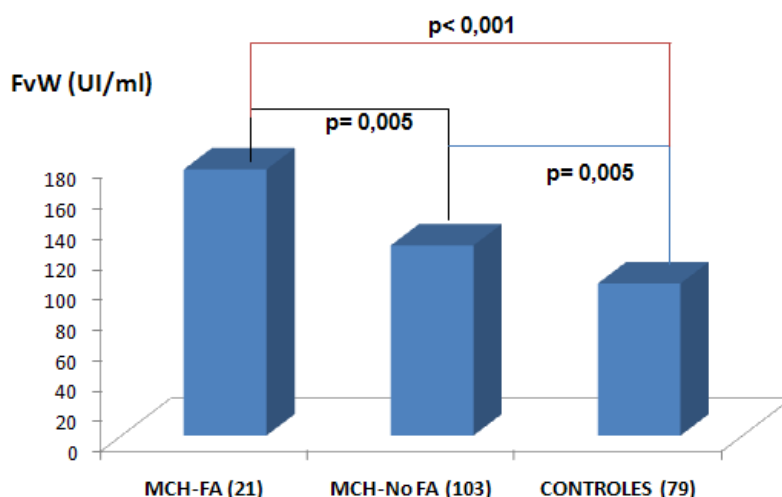


Figura 24. Comparación de la concentración de FvW con dos subgrupos de pacientes con MCH diferentes según presencia de FA y los controles.

Las altas concentraciones plasmáticas de FvW presentaron correlación significativa con la edad ($r: 0,26$, $p=0,006$) y con el GTSVI ($r: 0,22$, $p=0,021$) (Tabla 13) (Figuras 25 A-B).

	<i>Valor de r</i>	<i>Valor de p</i>
Edad	0,26	0,006
Diámetro Aurícula Izquierda	0,01	0,943
VAI	0,01	0,968
DTDVI	0,11	0,267
DTSVI	0,03	0,730
Máximo grosor de pared del VI	-0,03	0,761
FEVI	0,55	0,570
GTSVI	0,22	0,021
Cociente E/A	0,05	0,618
METs	-0,11	0,280
% de fibrosis (RTG)	-0,01	0,976
NTproBNP	0,02	0,700
Aclaramiento de creatinina (ml/min)	0,21	0,059

Tabla 13. Correlaciones bivariadas del FvW (Correlaciones de Pearson).

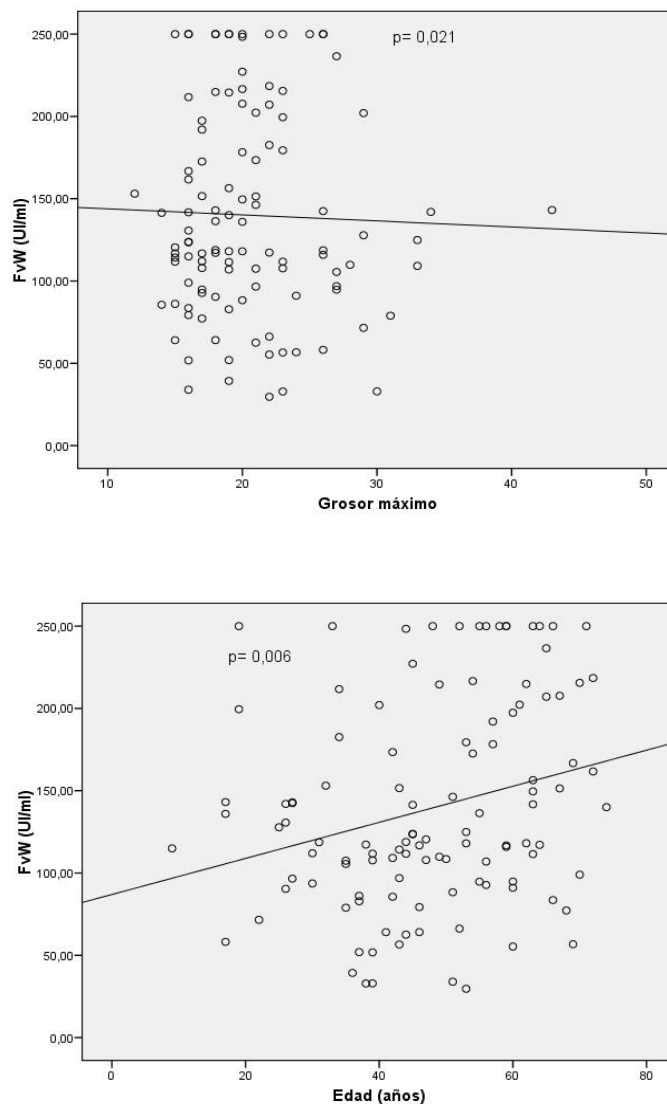


Figura 25 A-B) Gráficos de dispersión que muestra la distribución del FvW correlacionando significativamente con variables clínicas evaluadas.

En el análisis de regresión lineal multivariado, ajustando por edad, clase funcional severa, hipertensión arterial, fibrilación auricular, obstrucción, grupo sanguíneo ABO y taquicardia ventricular no sostenida, la concentración de FvW se asoció con el modelo propuesto (r^2 : 0,18, $p=0,001$). Fibrilación auricular ($p=0,001$), grupo sanguíneo ABO ($p=0,018$) y TVNS ($p=0,041$) fueron las tres variables que mantuvieron una asociación significativa con la concentración de este biomarcador.

4.3.4 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE NECROSIS EN MIOCITOS: TnThs

El estudio de los valores séricos de TnThs en asociación con las variables clínicas demostró que estas concentraciones de TnThs (pg/ml) fueron superiores en pacientes con MCH que en controles sanos: 12 (7-18) vs 3 (3-4) pg/ml, $p < 0,001$. Se encontró un aumento de las concentraciones de TnThs (por encima del punto de corte elegido de 14 pg/ml) en 40 pacientes (42,1%) y en sólo dos sujetos control (4,4%; $p < 0,001$). Los valores séricos de TnThs de seis pacientes se mantuvieron por debajo del límite inferior de detección del ensayo (3 pg/ml), mientras que sólo 13 sujetos control mostraron valores de TnThs por encima del límite de detección.

Se observó que las concentraciones de TnThs (pg/ml) se incrementaron en pacientes con disnea clasificándolos según los grupos de NYHA: 10 (5-16) pg/ml para NYHA I, 12 (7-17) pg/ml para NYHA II y 19 (11-29) pg/ml para NYHA III, $p = 0,042$ (Tabla 7) (Figura 26). Así, el 68,8% de los pacientes con clase funcional NYHA \geq III mostraron niveles elevados de TnThs frente a los pacientes con clase funcional NYHA $<$ III, donde sólo el 37,2% mostraron niveles altos de TnThs ($p = 0,020$; Tabla 14). Destaca el valor de las concentraciones en aquellos pacientes que presentan deterioro de la clase funcional (NYHA \geq III) de 14 (9-26) pg/ml, frente a 10 (5-17) pg/ml en el resto ($p = 0,048$). La figura 27 muestra mayores concentraciones en suero de TnThs en pacientes con disnea severa (clase funcional NYHA \geq III) que en pacientes sin disnea grave (clase funcional NYHA $<$ 3; $p = 0,004$). Además se asociaron los valores de TnThs con la obstrucción de la salida del VI ($p = 0,013$), disfunción sistólica ($p = 0,037$), y con una respuesta anormal de la presión arterial ($p = 0,036$; Tabla 14). No encontramos asociación entre los valores de TnThs y el Grupo sanguíneo O ó AB: 11 (6-18) vs 13 (8-21) (pg/ml), $p = 0,409$.

<i>Condición</i>	TnT_{hs} ≥14 (pg/ml) (n=95)		<i>Valor de p</i>
	<i>Si (%)</i>	<i>No (%)</i>	
<i>Género Masculino</i>	40,3	47,8	0,523
<i>HTA</i>	36,0	44,3	0,471
<i>Disnea ≥II</i>	50,0	32,5	0,090
<i>Disnea severa ≥III</i>	68,8	37,2	0,020
<i>Historia de síncope recurrente</i>	43,8	42,3	0,915
<i>Angina</i>	46,5	42,5	0,410
<i>MS familiar</i>	30,4	47,1	0,160
<i>Historia de FA</i>	37,5	43,6	0,654
<i>GTSVI > 30mm Hg</i>	57,9	32,1	0,013
<i>Máximo grosor de pared del VI(≥30 mm)</i>	80,0	40,4	0,102
<i>Disfunción sistólica</i>	83,3	39,8	0,037
<i>Respuesta tensional anormal</i>	60,0	36,4	0,036
<i>TVNS</i>	51,9	39,1	0,260
<i>RTG</i>	49,3	23,1	0,021

HTA: Hipertensión arterial sistémica

Tabla 14. Elevación de TnT_{hs} en suero en relación a las comorbilidades asociadas a MCH en nuestra población de pacientes.

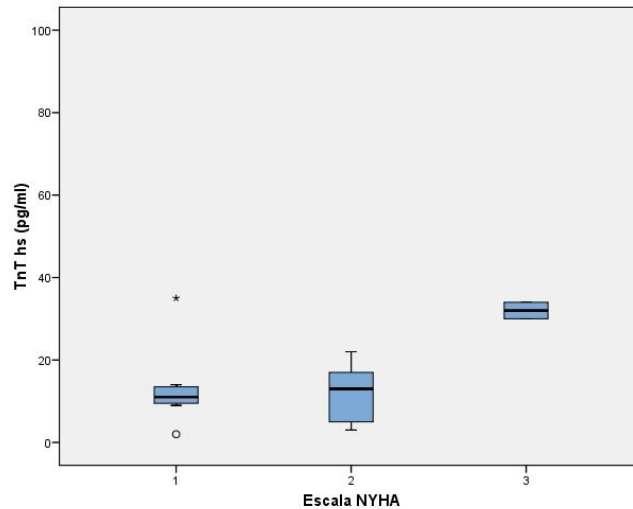


Figura 26. Comparación de los valores de TnT_{hs} en función de tres subgrupos de los pacientes con MCH clasificados según la escala NYHA. Comparación mediante test de Kruskal-Wallis ($p=0,042$).

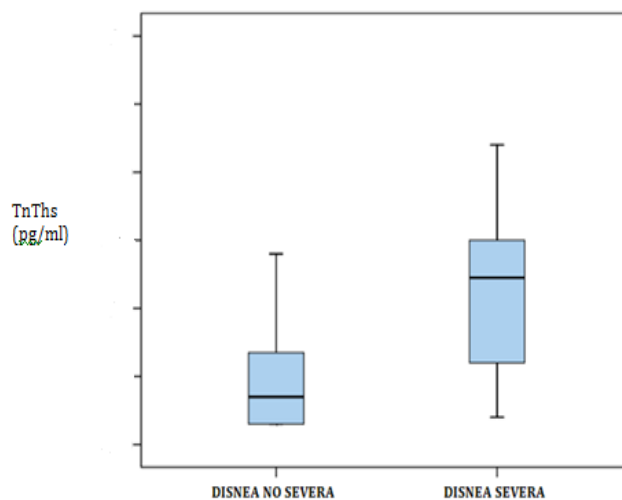


Figura 27. Concentraciones de TnT_{hs} en pacientes con MCH y clase funcional severa NYHA \geq III, frente al resto, ($p=0,004$).

El estudio mediante correlaciones bivariadas de los valores séricos de TnT_{hs} en relación a los datos ecocardiográficos evidenció que la TnT_{hs} no correlacionó ni con el diámetro telediastólico del VI, diámetro sistólico final del VI ni con la fracción de eyección del VI (Tabla 15). Por otro lado, sí encontramos correlaciones positivas y significativas para las siguientes variables: máximo espesor de pared del VI ($r=0,47$; $p<0,001$), diámetro de la aurícula izquierda indexada ($r=0,36$; $p<0,001$) y el GTSVI ($r=0,28$; $p=0,008$). A pesar de encontrar mayores niveles de NT-proBNP en los pacientes (228 [117-500] pg/ml) que en los sujetos control

(27,85 [12,70-76,40] pg/ml); $p < 0,001$), no hubo asociación significativa entre los niveles TnT_{hs} y NT-proBNP ($r = 0,16$, $p = 0,132$). La PCR_{hs} tampoco demostró una correlación significativa con la TnT_{hs} ($r = 0,01$; $p = 0,99$).

<i>TnT_{hs}</i>	<i>Valor de r</i>	<i>Valor de p</i>
Edad	0,098	0,343
Diámetro AI (mm)	0,362	<0,001
Volumen indexado AI (VAI)	0,248	0,052
Máximo grosor de pared del VI	0,465	<0,001
DTDVI	0,100	0,339
DTSVI	0,134	0,202
Gradiente TSVI	0,276	0,008
FEVI	0,005	0,960
Cociente E/A	0,156	0,140
NT-proBNP	0,156	0,132
PCR_{hs}	0,002	0,987
Aclaramiento de creatinina (ml/min)	-0,183	0,114

Tabla 15. Correlaciones entre TnT_{hs} y variables clínicas.

AI: aurícula izquierda.

Respecto a la valoración de las concentraciones séricas de TnT_{hs} en correlación con datos del estudio de resonancia magnética cardiaca, se encontró una asociación entre los valores séricos de TnT_{hs} y el realce tardío de gadolinio (RTG) ($p = 0,021$; Tabla 14). En particular, se encontraron mayores concentraciones de TnT_{hs} en pacientes que presentaron un realce mayor en el estudio de CRM (13 [9-23] pg/ml) en comparación con los pacientes que no presentaron un aumento de RTG (9 [4-13] pg/ml; $p = 0,045$). Estas concentraciones de TnT_{hs} son aún más bajas en los sujetos control (5 [4-6] pg/ml, $p = 0,013$). La figura 28 muestra la diferencia entre las concentraciones séricas de TnT_{hs} entre los pacientes que presentan fibrosis en la CRM, los pacientes sin fibrosis y los sujetos control. Se observó además que los pacientes que presentan valores elevados de TnT_{hs}

presentaron mayor número de segmentos afectados en la CRM en comparación con pacientes con valores bajos de TnThs pg/ml (4 [0-7] vs 1 [0-5], $p=0,022$).

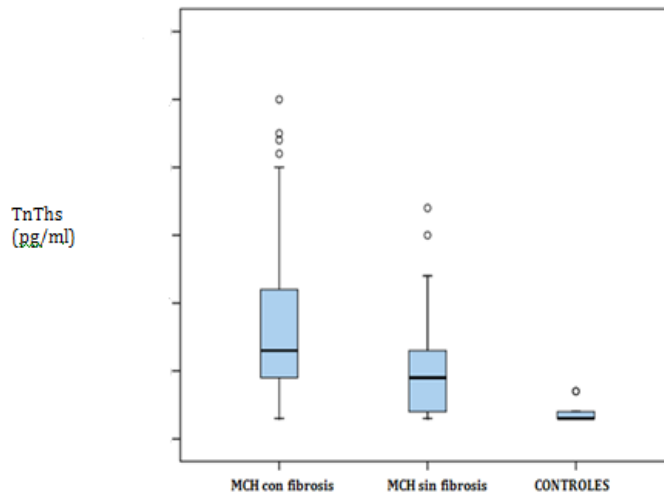


Figura 28. Valores de TnThs en pacientes con MCH que presentan fibrosis o no ($p=0,054$) y entre los controles sanos ($p=0,013$).

El análisis de regresión logística univariado de los datos (Tabla 16) corroboró una asociación interesante y fuerte entre concentraciones elevadas de TnThs y la presencia de fibrosis en el estudio de CRM (odds ratio [OR] 3,24 [intervalo de confianza (IC) del 95%: 1.16-9.04], $p=0,025$). También se encontró asociación significativa entre el número normalizado de los segmentos afectados (NNAS): 0=0 segmentos afectados; 1=1-2 segmentos afectados; 2= \geq 3 segmentos afectados) en el estudio de CRM y la elevación de la TnThs (OR: 1,5 [1,0-2,2]; $p=0,038$).

<i>TnT_{hs}</i>	<i>OR</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Edad</i>	1,01 (0,98-1,04)	0,614
<i>Sexo masculino</i>	0,74 (0,29-1,89)	0,524
<i>Disnea ≥II</i>	2,08 (0,89-4,86)	0,092
<i>Disnea severa ≥III</i>	3,72 (1,17-11,77)	0,026
<i>HTA</i>	0,71 (0,28-1,82)	0,472
<i>MS familiar</i>	0,49 (0,18-1,34)	0,165
<i>Historia de síncope</i>	1,06 (0,36-3,14)	0,915
<i>Historia de FA</i>	1,29 (0,43-3,30)	0,654
<i>Máximo grosor de pared del VI ≥ 30mm</i>	5,89 (0,63-54,87)	0,119
<i>Gradiente TSVI >30 mm Hg</i>	2,90 (1,24-6,82)	0,014
<i>Disfunción sistólica</i>	7,57 (0,85-67,6)	0,070
<i>Respuesta tensional anormal</i>	2,63 (1,05-6,55)	0,038
<i>TVNS</i>	1,68 (0,68-4,16)	0,262
<i>RTG</i>	3,24 (1,16-9,04)	0,025
<i>NNAS (nº de segmentos afectados)</i>	1,51(1,0-2,2)	0,038

Tabla 16. El análisis de regresión logística univariado. Punto de corte para TnT_{hs} 14 pg/ml. (NNAS): 0=0 segmentos afectados; 1=1-2 segmentos afectados; 2=≥ 3 segmentos afectados).

Por último, la presencia de disnea severa (3,72 [1,17-11,77]; p=0,026), respuesta anormal de la presión arterial (2,63 [1,05-6.55]; p=0,038), y la presencia de obstrucción en TSVI (2,90 [1,24-6,82]; p=0,014) también mostraron asociación significativa con la elevación de los niveles de TnT_{hs}, en el análisis de regresión logística.

4.3.5 FACTORES DE CRECIMIENTO: GDF15

Las características de la cohorte total de pacientes con MCH a los que se pudo medir el GDF-15 (102) se resumen en la tabla 17.

La concentración de GDF-15 muestra una distribución no paramétrica con una media de 2978 pg/ml y mediana de 2642 (2130-3471) pg/mL. Por su parte, la concentración plasmática de GDF-15 muestra diferencias considerables dentro de los subgrupos según la escala de la NYHA ($p=0,006$) (Figura 29), aumentando a medida que empeora la capacidad funcional (Tabla 17). Se observaron diferencias significativas en los grupos funcionales con respecto a las características basales, como la edad, el sexo masculino, el síncope ($p=0,002$, $p=0,022$ y $p=0,034$, respectivamente), peor capacidad de respuesta al ejercicio ($p<0.001$), obstrucción ($p=0,001$), así como el aumento de los niveles de otros biomarcadores estudiados, como el NT-proBNP ($p=0,001$), y la TnT_{hs} que mostró una fuerte tendencia con una $p=0,07$. Los marcadores de la disfunción diastólica también se mostraron alterados según el estado funcional, cociente E/A y VAI ($p=0,022$ y $p\leq 0,001$, respectivamente). No se encontró asociación entre los valores de GDF-15 y el Grupo sanguíneo *O* ó *AB*: 3350 (2167-4221) vs 2700 (2213-3471) (pg/ml), $p=0,203$.

	NYHA I (n=45)	NYHA II (n=42)	NYHA III (n=15)	Valor de p
Edad	40,6±13,9	47,8±13,8	56,1±10,37	0,002
Sexo masculino	83,3%	71,4%	46,7%	0,022
HTA	23,1%	36,8%	35,7%	0,390
Historia de FA	12,8%	21,1%	42,9%	0,060
Historia de síncope	7,9%	31,6%	20%	0,034
Disnea	5,1%	100%	100%	<0,001
MS familiar	18,4%	13,2%	26,7%	0,510
Diámetro AI (mm)	40,8 ± 7,0	44,6 ± 7,3	46,5 ± 5,6	0,014
VAI	23,7 (19,4-40,3)	35,0 (31,3-43,0)	45,7 (33,8-57,3)	<0,001
MGVI (mm)	17,0 (17,1-21,3)	20,5 (19,9-23,5)	23 (20-25,4)	0,004
MGVI ≥ 30mm	10,5%	5,1%	0%	0,360
DTDVI (mm)	44,8 ± 5,7	43,6 ± 6,1	42,3 ± 9,3	0,250
DTSVI (mm)	25,3 ± 5,2	24,7 ± 6,3	23,3 ± 9,7	0,530
FEVI %	66,2 ± 10,8	66,4 ± 11,2	71,9 ± 13,4	0,260
Cociente E/A	1,3±0,5	1,3±0,6	1,8±1,0	0,022
Gradiente TSVI >30 mm Hg	17,9%	51,3%	66,7%	0,001
Respuesta tensional anormal	35,3%	36,1%	42,9%	0,881
METs	11,7 ± 3,1	8,5 ± 2,8	6,7 ± 2,3	<0,001
TVNS	25,7%	33,3%	40%	0,581
RTG	61,4%	79,5%	86,7%	0,080
GDF-15 (pg/ml)	2878 (2290-3927)	3275 (2756-3203)	4159 (3634-7242)	0,006
Aclaramiento de creatinina ml/min	125,9 ± 44,6	110,2 ± 33,8	81,5 ± 29,9	0,003

MGVI: Máximo grosor de pared del VI.

Tabla 17. Características de los pacientes con MCH en función de la clase funcional (escala NYHA). (Test de ANOVA o Kruskal-Wallis).

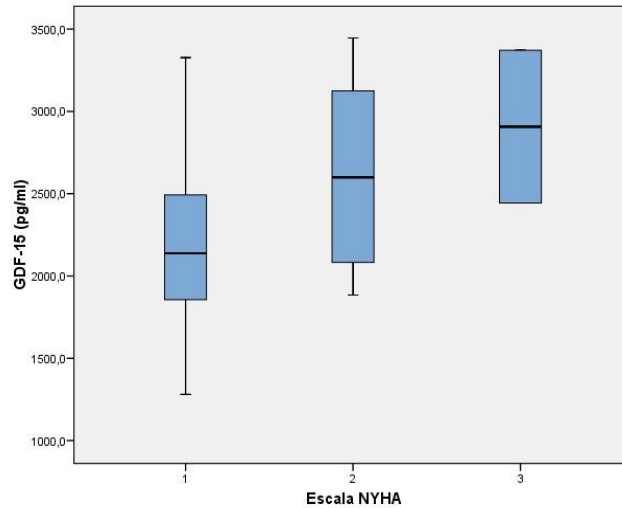


Figura 29. Comparación de los valores de GDF-15 en función de tres subgrupos de los pacientes con MCH clasificados según la escala NYHA. Comparación mediante test de Kruskal-Wallis ($p: 0,006$).

Concentraciones plasmáticas de GDF-15 y resto de biomarcadores con respecto a los grados de severidad en la MCH

No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de GDF-15 y la clase I y II ($p= 0,28$). Sí se incrementaron sus niveles en los pacientes con MCH y clase funcional según la NYHA \geq II, en comparación con el grupo NYHA I ($p=0,037$), y aún mayor se vio el aumento en aquellos con clase III según la NYHA ($p=0,002$). Este dato se puede observar en la tabla 17 y gráficamente en la figura 29 que representa los niveles de GDF-15 evaluados en tres grupos diferentes de pacientes con MCH según la clase funcional, lo que confirma un claro aumento de GDF-15 en pacientes con NYHA clase III, en comparación con los otros subgrupos. La diferencia entre estos tres grupos fue significativa ($p=0,006$) (Tabla 7). La presencia de comorbilidades como hipertensión, disnea, disfunción sistólica y fibrilación auricular también mostró aumento de los niveles de GDF-15 ($p=0,001$, $p=0,020$, $p=0,023$ y $p=0,012$, respectivamente) (Tabla 17 y 18). (Gráficas 30 y 31).

<i>GDF-15</i>	<i>Z Mann-Whitney</i>	<i>Valor de p</i>
Género femenino	-1,66	0,096
NYHA I y II	-1,09	0,280
NYHA II y III	-2,57	0,010
NYHA I y III	-3,08	0,002
NYHA I y NYHA ≥II	-2,08	0,037
HTA	-3,25	0,001
Disnea	-2,33	0,020
FA	-2,50	0,012
Historia de síncope	-1,18	0,240
MS familiar	-0,85	0,400
Disfunción sistólica	-2,45	0,023
GTSVI	-1,10	0,280
Respuesta tensional anormal	-0,38	0,700
TVNS	-1,49	0,140
RTG	-0,98	0,320

Tabla 18. Asociación de la concentración de GDF-15 con las variables clínicas (Test de Mann-Whitney).

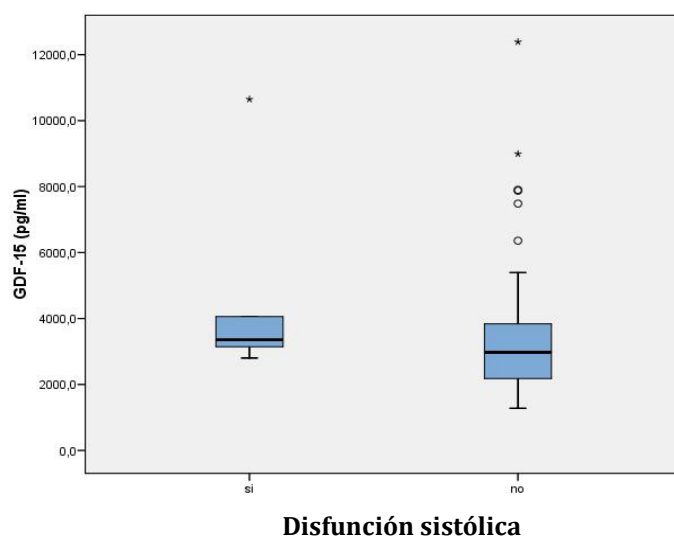


Figura 30. Valores de GDF-15 en pacientes con MCH que presentan disfunción sistólica frente a pacientes con MCH que no la presentan, ($p=0,023$).

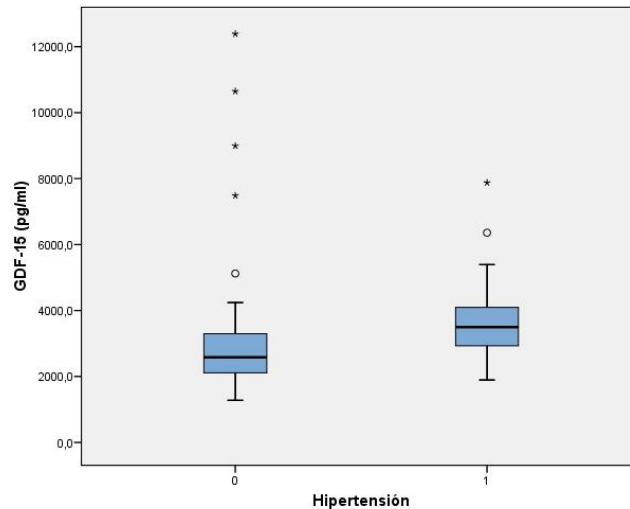


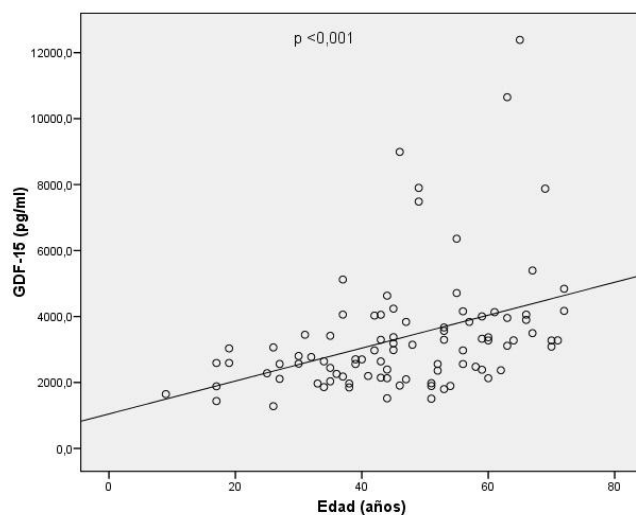
Figura 31. Valores de GDF-15 en pacientes con MCH que presentan hipertensión arterial, frente a pacientes con MCH que no la presentan, ($p=0,001$).

Se observaron correlaciones significativas entre los valores de GDF-15 y otros biomarcadores propuestos de remodelado ventricular estudiados, como NT-proBNP ($r: 0,28$, $p=0,049$) o TnThs ($r: 0,30$, $p=0,003$) y FvW ($r: 0,33$, $p=0,001$) (Tabla 19).

Las concentraciones de GDF-15 también mostraron correlación significativa con la edad ($r: 0,48$, $p<0,001$), así como una correlación negativa con la capacidad de ejercicio evaluada con los METs ($r: -0,45$, $p<0,001$) (Tabla 19) (Figuras 32 A-B). Por otra parte, el aumento de los valores de biomarcadores, como la TNThs, está asociado con graves daños en el miocardio y, por tanto, con el deterioro de clase funcional NYHA \geq III. En consecuencia, como se muestra en la figura 33, pacientes con MCH, que presentan valores elevados de TnThs (por encima del punto de corte (14 pg/ml) se asocia con mayores concentraciones de GDF-15 ($p=0,021$).

<i>GDF-15</i>	<i>Valor de r</i>	<i>Valor de p</i>
Edad	0,480	<0,001
Diámetro Aurícula Izquierda	0,183	0,116
VAI	0,179	0,198
Máximo grosor de pared del VI	-0,091	0,433
DTDVI	0,058	0,616
FEVI	-0,005	0,967
GTSVI	0,199	0,086
METs	-0,450	0,001
% de fibrosis (RTG)	-0,084	0,490
Aclaramiento creatinina ml/min	-0,300	0,002
NT-proBNP	0,280	0,049
TNThs	0,300	0,003
FvW	0,330	0,001

Tabla 19. Correlaciones bivariadas para GDF-15 y variables clínicas (Correlación de Spearman).



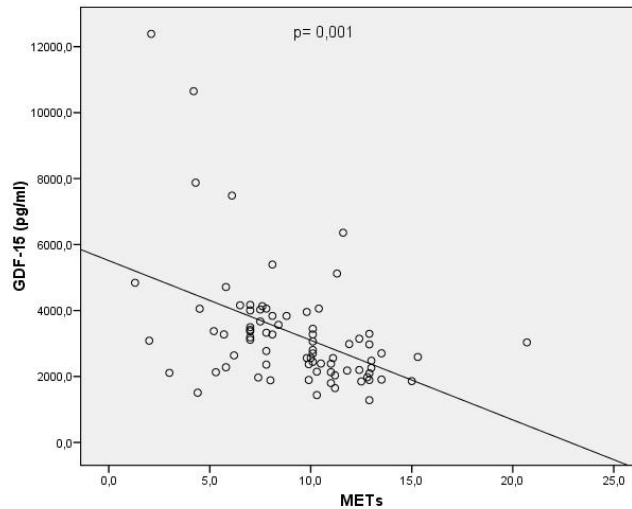


Figura 32 A-B) Gráficos de dispersión que muestra la distribución del GDF-15 correlacionando significativamente con variables clínicas evaluadas.

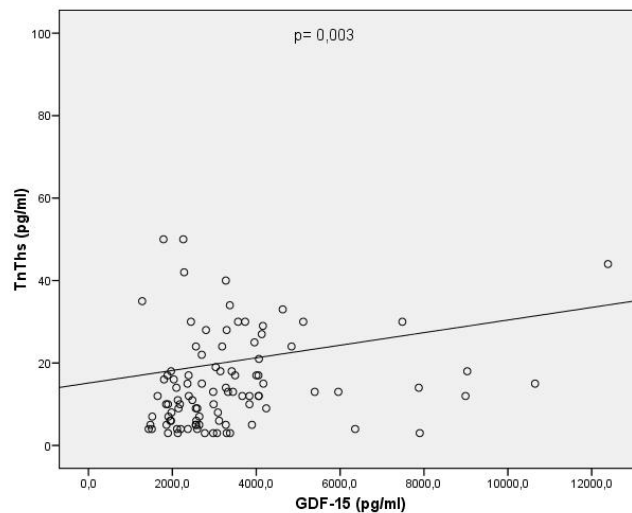


Figura 33. Valores de GDF-15 en correlación con los niveles de TnThs (pg/ml). (Punto de corte para TnThs <14 pg/ml).

El análisis bivariado mostró que los niveles de GDF-15 correlacionan con la edad, disnea, fibrilación auricular y los METs. Además también correlacionó con otros biomarcadores como el NT-proBNP y FvW ($p < 0,001$) en ambos.

La tabla 20 resume los resultados del modelo de análisis multivariado ($p < 0,001$) que mostró significación a medida que empeora la clase funcional (NYHA III), hipertensión o obstrucción (todos con $p = 0,005$) y con aquellos con taquicardia ventricular no sostenida ($p = 0,006$) influyendo así significativamente

en los niveles de GDF-15. En el estudio multivariado, el resto de biomarcadores de remodelado ventricular no parecen contribuir en los niveles de GDF-15.

Finalmente, se compararon las concentraciones de GDF-15 y el resto de biomarcadores significativos en pacientes con MCH y clase NYHA III, con y sin síntomas de TVNS ($p=0,002$) (Figura 34). Mientras que biomarcadores como TnT_{hs} o FvW no muestran un aumento significativo en este grupo de pacientes severos, los niveles de GDF-15 persisten elevados en los pacientes con TVNS y NYHA III ($p=0,001$). Sólo NT-proBNP mostró una clara tendencia similar ($p=0,066$).

Factores	B	SD	β	t	Valor de p
Constante	1680,752	294,256		5,712	<0,001
NYHA III	2156,536	466,484	0,504	4,623	<0,001
HTA	1898,961	373,482	0,559	5,084	<0,001
GTSVI	1157,885	369,951	0,348	3,130	0,005
TVNS	1154,622	384,448	0,320	3,003	0,006

Tabla 20. Análisis multivariado para GDF-15 y variables clínicas aplicadas.

B: Coeficiente no estandarizado

SD: Desviación estandar

B: Coeficiente estandarizado

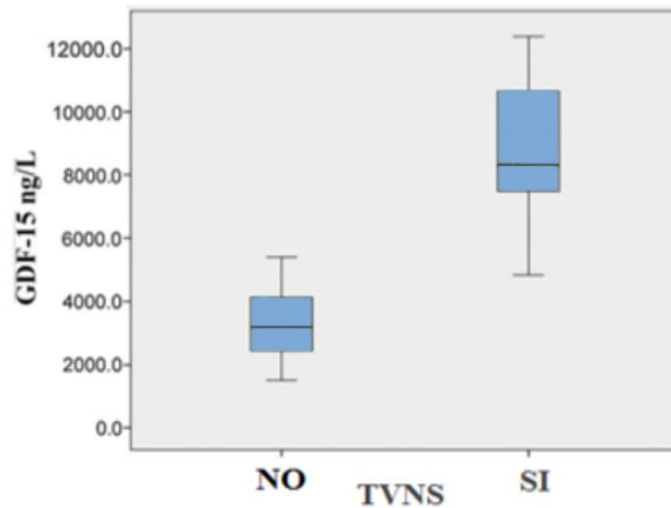


Figura 34. Valores de GDF-15 (ng/L) en pacientes con NYHA III y afectados de TVNS ($p=0,002$).

4.3.6 ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE FIBROSIS Y REMODELADO TISULAR: PÉPTIDOS DEL COLÁGENO

La Tabla 6 muestra los resultados de las concentraciones de los diferentes péptidos del colágeno tipo I y III entre los sujetos de estudio y sujetos control. Se observa como no muestran diferencias significativas el PINP, PICP y PIIINP.

Por otra parte, en el ICTP como marcador de degradación de colágeno tipo I, sí observamos diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,041$), con una concentración aumentada en los pacientes de 2,35 (1,15-3,94) $\mu\text{g/L}$ frente a 1,78 (1,27-2,78) $\mu\text{g/L}$, en los controles. De igual modo en la ratio resultante entre PICP e ICTP también encontramos diferencias significativas ($p=0,026$), 48,02 (31,0-96,3) ng/ml, frente a 46,8 (32,2-70,0) ng/ml.

	Pacientes (n=95)	Controles (n=78)	Valor de p
PICP* (ng/ml)	124,5 ± 55,3	110,2 ± 43,2	0,145
PINP (ng/ml)	27,3 (24,4-38,6)	33,2 (26,5-39,6)	0,937
ICTP (µg/L)	2,35 (1,15-3,94)	1,78 (1,27-2,78)	0,041
PIIINP (µg/L)	3,67 (2,83-4,55)	3,41 (2,81-4,19)	0,129
Ratio PICP/ICTP	48,0 (31,0-96,3)	46,8 (32,2-70,0)	0,026

Tabla 6. Concentraciones de los diferentes péptidos entre grupo de pacientes y grupo control y su correspondiente significación estadística (p). Para el análisis de PINP, PIIINP y ratio PICP/ICTP que no siguen distribución normal, se realizó una transformación logarítmica neperiana.

La Tabla 21 A-B (página 142-145), muestra como se encuentran los niveles séricos de los diferentes péptidos del colágeno, asociados a las variables clínicas estudiadas en nuestra población que suponen una severidad de la propia MCH.

Así vemos como el PINP está aumentado en pacientes con un grosor severo del VI, presentando en los pacientes una concentración de 112,7 (82,1-143,3) ng/ml frente a 26,7 (24,0-36,4) ng/ml con $p < 0,001$ (Figura 35). Además el PINP presenta una tendencia en aquellos pacientes con taquicardia ventricular no sostenida (TVNS) con $p = 0,062$.

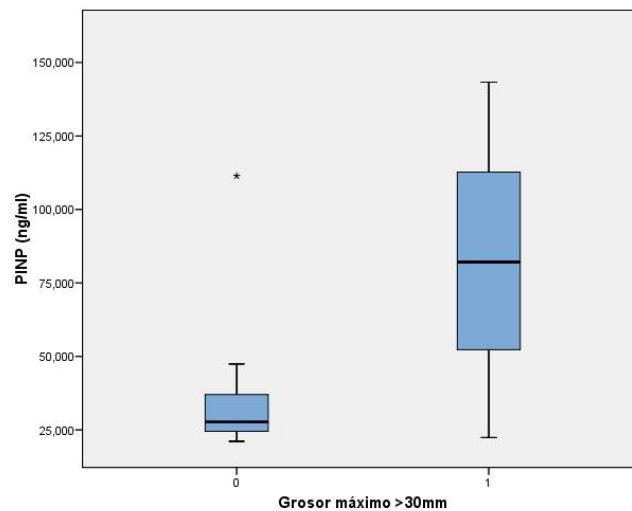


Figura 35. Concentraciones de PINP en pacientes con MCH que presentan un grosor máximo de pared del VI ≥ 30 mm (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0) $p=0,001$.

El PICP como péptido marcador de formación de colágeno tipo I, muestra asociación estadística en aquellos pacientes con MCH y que presentan historial previo de muerte súbita familiar con una media de PICP de $144,7 \pm 71,8$ ng/ml frente a $118,3 \pm 47,5$ ng/ml con $p=0,047$ (Figura 36).

El PICP presenta concentraciones elevadas en aquellos pacientes sin hipertensión arterial (HTA), estando su media más baja $107,6 \pm 32,2$ ng/ml en los pacientes con HTA, frente a $130,7 \pm 60,6$ ng/ml en los que sí se les asocia HTA y MCH $p=0,021$ (Figura 37).

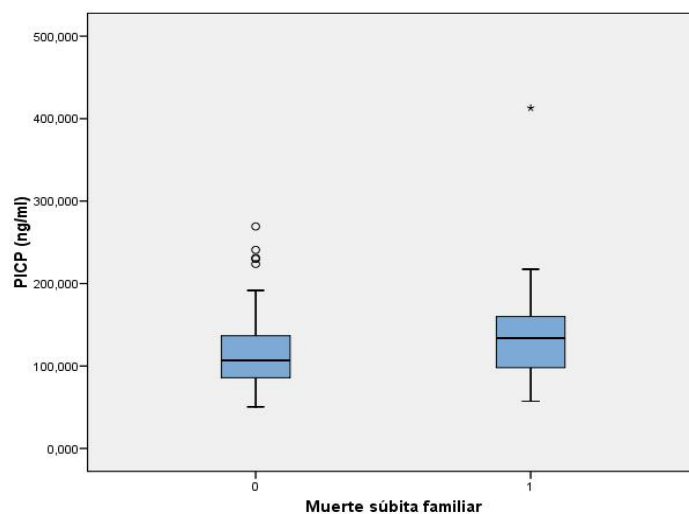


Figura 36. Concentraciones de PICP en pacientes con MCH que presentan historia de muerte súbita familiar (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0) $p=0,047$.

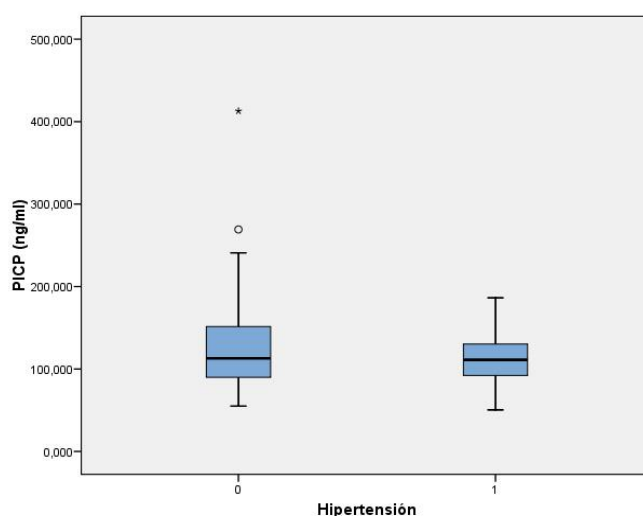


Figura 37. Concentraciones de PICP en pacientes con MCH que presenta hipertensión arterial (1), frente a pacientes con MCH que no la presentan (0) $p=0,021$.

El PIIINP como péptido marcador de formación de colágeno tipo III, muestra diferencias significativas en aquellos pacientes con MCH e historia de síncope recurrente con una mediana de concentración de 4,96 (3,60-6,50) ng/ml frente a 3,55 (2,80-4,31) ng/ml y $p=0,007$ (Figura 38). Se observó una tendencia a presentar mayores concentraciones de PIIINP en aquellos pacientes con MS asociada $p=0,062$.

Los resultados del ICTP como péptido de degradación y la ratio PICP/ICTP (formación/degradación de colágeno tipo I) no muestran asociaciones de sus niveles séricos frente a las variables clínicas estudiadas, salvo una tendencia de la ratio PICP/ICTP en pacientes con fibrilación auricular, $p=0,073$.

No se encontró asociación alguna de los péptidos del colágeno estudiados, que se relacione con variables de severidad de la MCH como podría ser pacientes que presenten disnea, disfunción sistólica o presenten realce tardío de Gadolinio.

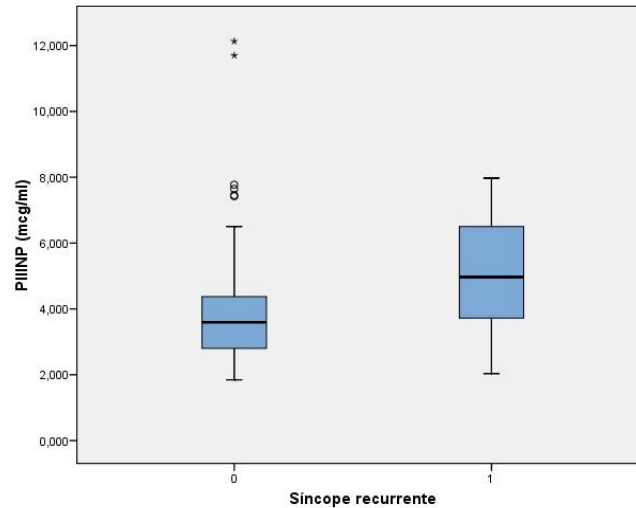


Figura 38. Concentración de PIIINP en pacientes con MCH que presentan historia de síncope recurrente (1), frente a pacientes con MCH que no lo presentan (0) $p=0,007$.

Se estudió la presencia de correlaciones bivariadas significativas entre las concentraciones séricas de los péptidos del colágeno con variables clínicas y datos ecocardiográficos obtenidos del ecocardiograma Doppler, el Holter-ECG para la TVNS, el porcentaje de fibrosis por RTG y la ergometría evaluada por los METs. (Tabla 22)(Página 146).

No se encontraron asociaciones significativas de los péptidos con una obstrucción del tracto sistólico de salida del VI. Tampoco se observó correlación con el DTDVI, la FEVI o el porcentaje de fibrosis evaluado por RTG, ni aparecieron correlaciones con el valor del volumen auricular indexado o que muestra signos de disfunción sistólica.

Por otro lado, sí se observó correlación del PICP y el lnPINP con la edad, ($r=-0,27$; $p=0,009$) y ($r=0,56$; $p=0,001$) respectivamente (Tabla 22) (Figura 39 A-B). Además lnPINP correlaciona con el máximo grosor de la pared del VI ($r=0,78$; $p=0,001$). En el modelo de análisis multivariado (r^2 corregida=0.60, $p<0.001$) se observó que el grosor máximo de la pared del VI es una variable predictora de los valores lnPINP ($\beta= 0.67$; $p<0.001$) y no está afectado por la edad de los pacientes, que no presenta asociación significativa ($\beta=-0.19$; $p=0,175$).

El lnPIINP correlacionó con los equivalentes metabólicos (METs) de la ergometría ($r=-0,25$; $p=0,020$), mientras la concentración de ICTP lo hizo con

mayores diámetros de la aurícula izquierda con ($r = -0,24$; $p = 0,023$) (Figura 40 A-B) y también con peor aclaramiento ($r = 0,023$; $p = 0,043$).

En cuanto a la ratio PICP/ICTP no mostró correlación estadísticamente significativa con ninguna de las variables estudiadas.

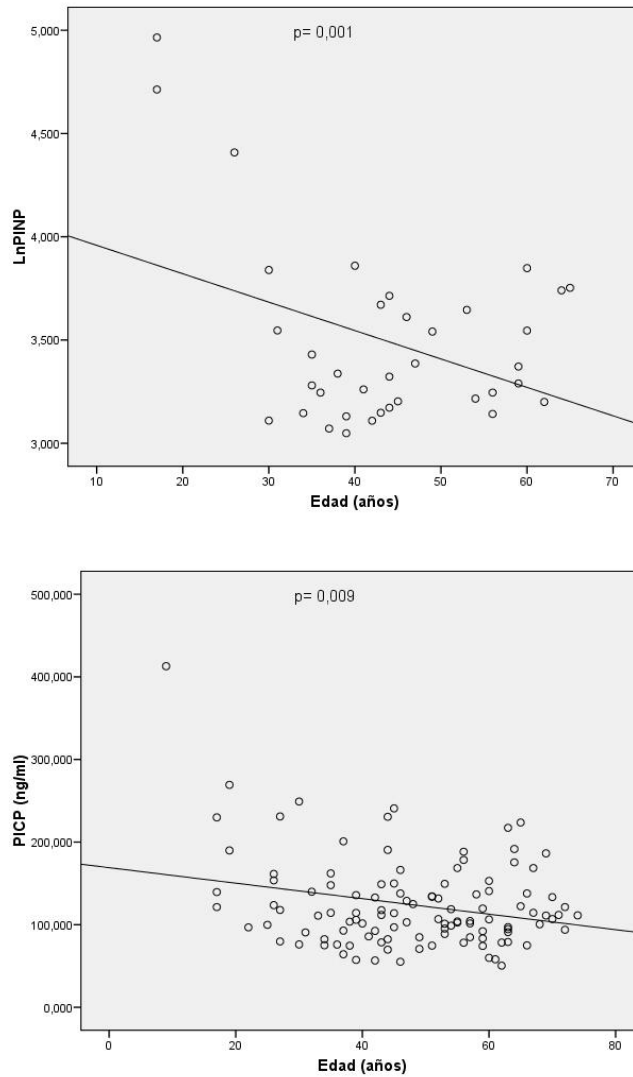


Figura 39 A-B) Gráficos de dispersión que muestran la distribución de algunos de los péptidos del colágeno que se correlacionaron significativamente con variables clínicas evaluadas. Correlación del PICP y el lnPINP con la edad ($r = -0,27$; $p = 0,009$) y ($r = 0,56$; $p = 0,001$) respectivamente.

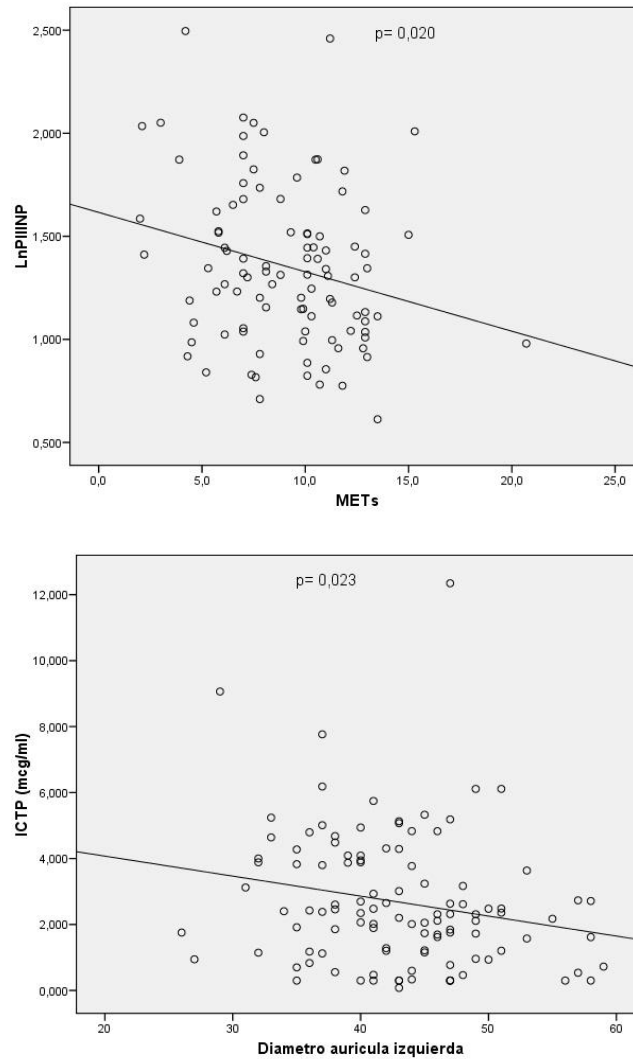


Figura 40 A-B) Gráficos de dispersión que muestran la distribución de algunos de los péptidos del colágeno que se correlacionaron significativamente con variables clínicas evaluadas. LnPIIINP correlacionó con los equivalentes metabólicos (METs) de la ergometría ($r=-0,25$; $p=0,020$). ICTP correlacionó con mayores diámetros de la aurícula izquierda con ($r = -0,24$; $p=0,023$).

TABLA 21 A)		PÉPTIDO DE FORMACIÓN DE COLÁGENO TIPO I					FORMACIÓN DE COLÁGENO TIPO III			
Variables clínicas	PICP (ng/ml)			PINP (ng/ml)			PIIINP (µg/L)			
	Si	No	p	Si	No	p	Si	No	p	
Disnea I-II	123,04 ± 44,39	126,36 ± 67,60	0,776	28,43 (24,69-45,65)	26,46 (1,16-4,09)	0,325	3,72 (3,06-4,55)	3,65 (2,78-4,56)	0,318	
Disnea III-IV	132,60 ± 50,37	122,91 ± 56,32	0,537	25,59 (23,32-41,82)	27,94 (24,37-38,56)	0,586	3,88 (3,31-6,18)	3,67 (2,82-4,53)	0,227	
HTA	107,61 ± 32,21	130,67 ± 60,63	0,021	30,76 (2,93-4,01)	27,16 (23,71-38,56)	0,991	3,42 (2,93-4,01)	3,83 (2,82-4,89)	0,160	
MS	144,77 ± 71,79	118,36 ± 47,50	0,047	23,29 (21,09-24,94)	28,15 (24,61-39,28)	0,179	4,17 (3,25-5,22)	3,59 (2,76-4,53)	0,062	
Historia Síncope recurrente	124,84 ± 58,21	124,39 ± 58,21	0,977	31,28 (22,99-45,41)	27,29 (24,59-37,34)	0,865	4,96 (3,60-6,50)	3,55 (2,80-4,31)	0,007	
Historia fibrilación auricular	122,96 ± 51,12	124,78 ± 56,39	0,905	24,57 (24,54-54,61)	27,94 (24,13-39,04)	0,383	3,57 (2,57-4,72)	3,68 (2,96-4,55)	0,951	
Grosor Severo >30 mm	145,08 ± 52,25	123,29 ± 55,48	0,392	112,71 (82,13-143,30)	26,71 (24,03-36,43)	0,001	5,09 (2,69-6,62)	3,67 (2,82-4,53)	0,488	

IV. Resultados

GTSVI > 30 mm Hg	121,10 ± 47,44	126,76 ± 60,18	0,625	30,87 (26,58-41,02)	25,68 (23,86-37,02)	0,551	3,55 (2,79-5,25)	3,73 (3,04-4,54)	0,928
Disfunción sistólica	146,86 ± 53,44	122,92 ± 55,35	0,307	24,54 (21,02-33,85)	27,74 (24,23-38,80)	0,544	4,18 (3,36-7,38)	3,65 (2,82-4,55)	0,160
Respuesta tensional anormal	129,71 ± 71,32	126,59 ± 47,59	0,812	29,13 (26,71-37,67)	25,88 (23,56-40,58)	0,817	3,88 (2,96-5,25)	3,69 (2,81-4,55)	0,286
TVNS	125,37 ± 44,90	126,77 ± 59,12	0,914	38,33 (27,98-44,23)	26,08 (23,29-30,87)	0,061	3,82 (3,42-5,09)	3,56 (2,81-4,50)	0,197
RTG	127,20 ± 55,92	117,44 ± 53,96	0,448	28,64 (24,03-40,58)	25,88 (24,28-31,42)	0,125	3,63 (2,82-4,56)	3,70 (3,02-4,32)	0,899
Grupo sanguíneo O (sí) ó AB (no)	116,10 ± 4444,70	131,70 ± 66,70	0,211	24,91 (22,60-28,45)	29,50 (23,89-42,88)	0,077	3,59 (2,79-4,58)	3,74 (3,04-4,56)	0,642

TABLA 21B) DEGRADACIÓN DE COLÁGENO TIPO I:

Condición	ICTP ($\mu\text{g/L}$)			Ratio PICP/ICTP		
	Si	No	p	Si	No	p
Disnea I-II	2,08 (1,10-3,33)	2,46 (1,16-4,09)	0,288	50,65 (34,11-114,41)	41,87 (28,35-86,13)	0,433
Disnea III-IV	2,33 (1,73-3,62)	2,36 (0,95-3,98)	0,912	50,04 (42,58-76,26)	47,75 (30,51-96,83)	0,988
HTA	2,47 (1,73-4,09)	2,32 (0,95-3,79)	0,645	38,19 (26,40-93,93)	53,66 (32,31-101,40)	0,226
MS	2,45 (2,05-4,48)	2,24 (0,90-3,79)	0,112	45,55 (30,70-69,46)	2,24 (31,33-104,41)	0,350
Historia Síncope recurrente	2,01 (1,01-3,57)	2,41 (1,14-3,91)	0,665	61,23 (36,28-138,71)	48,02 (30,78-94,25)	0,980
Historia fibrilación auricular	2,82 (2,02-4,06)	2,31 (0,90-3,79)	0,491	32,87 (23,27-70,16)	50,04 (33,30-100,37)	0,073
Grosor severo	2,60 (0,53-4,25)	2,34 (1,18-3,91)	0,933	52,14 (40,73-243,78)	47,37 (30,74-95,13)	0,474
GTSVI > 30 mm Hg	2,11 (0,67-3,37)	2,46 (1,36-4,06)	0,181	50,04 (29,21-135,46)	47,75 (31,22-79)	0,211
Disfunción sistólica	2,82 (2,03-5,03)	2,31 (1,13-3,88)	0,219	50,06 (24,60-109,25)	48,02 (31,12-96,53)	0,553

IV. Resultados

TABLA 21B) Condición	DEGRADACIÓN DE COLÁGENO TIPO I: ICTP (µg/L)			Ratio PICP/ICTP		
	Si	No	p	Si	No	p
Respuesta tensional anormal	2,21 (0,58-3,31)	2,38 (1,28-3,98)	0,360	50,04 (36,26-155,66)	49,53 (30,86-90,23)	0,228
TVNS	2,69 (1,73-3,98)	2,32 (1,01-3,86)	0,419	40,99 (30,67-99,78)	50,09 (32,02-96,42)	0,539
RTG	2,38 (1,24-3,70)	2,08 (0,92-4,62)	0,799	50,04 (31,94-96,53)	44,93 (23,52-93,43)	0,620
Grupo sanguíneo O (sí) ó AB (no)	2,14 (0,81-3,51)	2,40 (1,17-4,60)	0,248	50,35 (30,65-116,06)	47,47 (27,82-92,29)	0,609

Tabla 21 A-B) Se muestran como se encuentran la concentración sérica de los diferentes péptidos del colágeno, asociadas a las diferentes variables clínicas estudiadas en nuestra población de pacientes que suponen una severidad de la propia MCH.

Los datos expresan n (%), media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico).

HTA: Hipertensión. MS: Muerte súbita familiar

Disnea I-II: clase funcional correspondiente a la escala I-II de la NYHA.

Disnea III-IV: clase funcional correspondiente a la escala III-IV de la NYHA.

Grosor: Grosor severo o Máximo grosor de pared del VI (≥ 30 mm)

GTSVI: Gradiente del tracto sistólico de salida del VI > 30 mm Hg.

DISFUNCIÓN SISTÓLICA: evaluada mediante la fracción de acortamiento deprimida.

TVNS: Taquicardia ventricular no sostenida.

Variables clínicas	PICP		PINP		ICTP		PIIINP		Ratio PICP/ICTP	
	Valor <i>r</i>	Valor <i>p</i>	Valor <i>r</i>	Valor <i>p</i>	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>
Edad	-0,27	0,009	0,55	0,001	-0,17	0,085	-0,10	0,310	0,05	0,629
Diámetro Aurícula Izquierda	-0,09	0,383	-0,29	0,114	-0,23	0,023	-0,09	0,360	0,16	0,125
Volumen auricular indexado	-0,21	0,102	-0,22	0,255	-0,19	0,140	-0,10	0,406	0,06	0,620
GROSOR SEVERO >30mm	0,04	0,677	0,77	0,001	-0,02	0,799	0,15	0,125	0,04	0,683
DTDVI (mm)	-0,03	0,770	-0,08	0,649	0,08	0,412	-0,03	0,735	-0,35	0,742
FEVI %	0,05	0,598	0,29	0,108	-0,03	0,744	-0,04	0,642	0,07	0,077
GTSVI > 30mmHg	0,01	0,939	0,05	0,779	-0,18	0,077	0,05	0,613	0,12	0,225
METs	-0,40	0,722	-0,08	0,663	-0,05	0,637	-0,25	0,020	0,09	0,408
% de fibrosis (RTG)	0,04	0,709	0,15	0,425	0,14	0,217	0,02	0,829	-0,14	0,215
Aclaramiento de creatinina (ml/min)	0,09	0,398	0,34	0,081	0,233	0,04	-0,043	0,715	-0,09	0,438

Tabla 22. Correlaciones entre variables cuantitativas y los diferentes péptidos del colágeno. Las correlaciones con PICP se expresan mediante el coeficiente de correlación de Pearson, al seguir distribución normal. El resto de péptidos y la ratio siguen distribución no normal, por lo que las correlaciones se expresan mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

4.4 ASOCIACIONES CON LOS FACTORES DE RIESGO DE MUERTE SÚBITA Y PEOR CAPACIDAD FUNCIONAL

Como se definió en métodos, se exploró la relación entre los distintos biomarcadores estudiados y su asociación con los factores de riesgo o comorbilidades relacionados con muerte súbita en MCH, creando para ello la variable denominada “Factores de riesgo de muerte súbita”. En ella se incluyó a aquellos pacientes que no presentaban ningún factor de riesgo asociado a muerte súbita (Grupo 1), pacientes con uno o dos factores de riesgo (Grupo 2) y pacientes que presentaban tres o más (Grupo 3).

En la figura 41, se observa la distribución de pacientes en función de cuantos factores de riesgo presentaban. Se aprecia como aproximadamente un 50% de los pacientes presenta uno o dos factores de riesgo dentro de su patología de base de MCH. Un 30% no presentó ninguno y aproximadamente un 28% presenta tres o más comorbilidades agravantes a la patología de base.

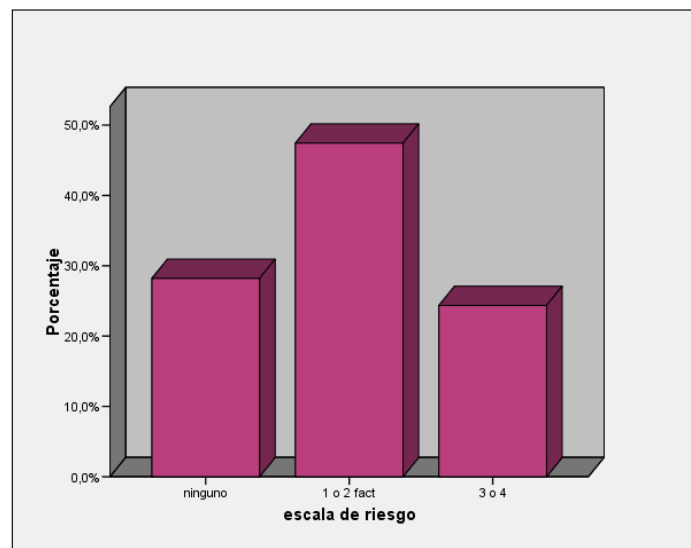


Figura 41. Distribución de la población de estudio de MCH en función de factores de riesgo.

Factores de riesgo asociados a muerte súbita

Las asociaciones observadas de los biomarcadores estudiados fueron las siguientes: historia de síncope recurrente, asociado con concentraciones elevadas de PIINP; historia previa de episodios de muerte súbita familiar, a la cual se asoció concentraciones altas de PIINP, PICP, PINP y NT-proBNP; presencia de obstrucción, evaluada por GTSVI>30 mmHG y que se observó relación con valores elevados de TnThs y FvW. Aparición de arritmia ventricular (TVNS), relacionado a valores altos de FvW. Además también consideramos como factores de riesgo, una respuesta tensional anormal (mal pronóstico) y presencia de grosor severo del VI observado por CRM.

Factores de riesgo asociados a peor capacidad funcional y severidad clínica

Las asociaciones de los diferentes biomarcadores de nuestro estudio encontradas fueron: hipertensión previa, asociado a concentraciones altas de PCRhs, NT-proBNP, GDF-15 y FvW; historia de fibrilación auricular relacionado a concentraciones elevadas de PCRhs y FvW; Disnea NYHA> II y Disnea NYHA II-IV (disnea grave según la NYHA) relacionado con valores elevados de TnThs, NT-proBNP, GDF-15 y FvW. Aparición de disfunción sistólica asociado con TnThs. Presencia de obstrucción, evaluada por GTSVI>30 mmHG y relacionada con valores altos de TnThs y FvW. Y por último, presencia de fibrosis observada por RTG en la CRM y asociado a concentraciones altas de TnThs y NT-proBNP.

Del estudio de la concentración de NT-proBNP frente a la variable creada observamos como el grupo 1 presentó una mediana de NT-proBNP de 252 (37-602) pg/mL, el grupo 2: 221 (140-432) pg/mL y el grupo 3: 274 (139-545) pg/mL. En la figura 42 se observa como no existe significación estadística del test total ($p=0,694$), ni entre subgrupos.

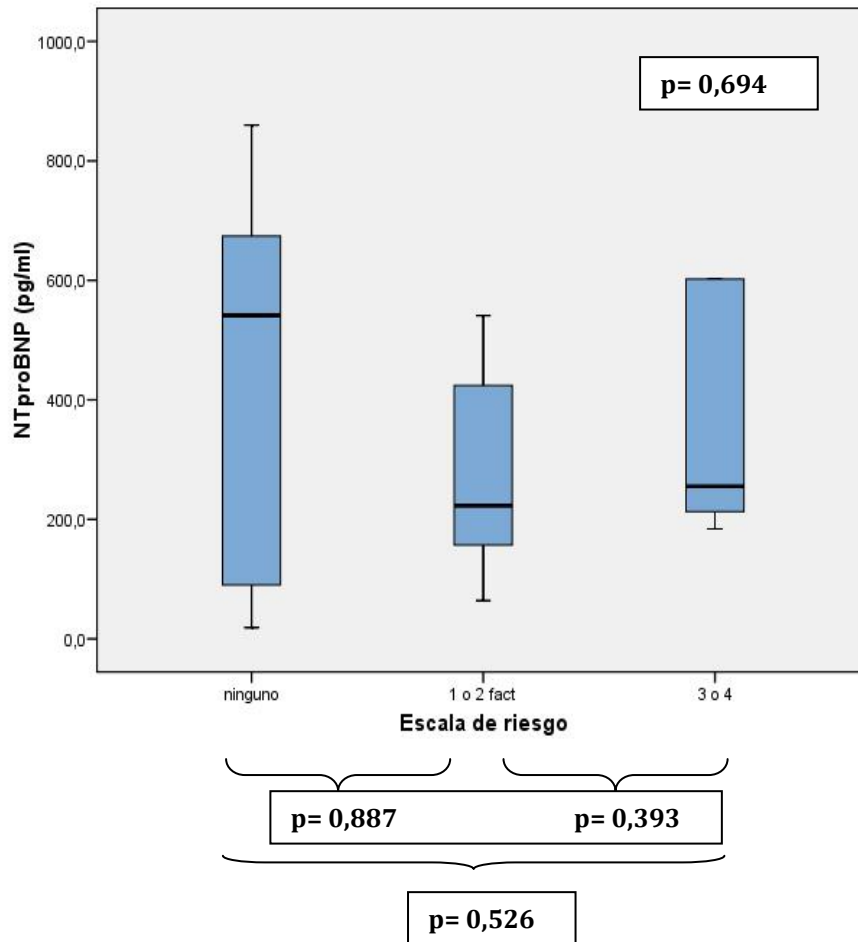


Figura 42. Prueba de Kruskal-Wallis: NT-proBNP frente a factores de riesgo de MS.

En el comportamiento de los valores de FvW frente a la variable creada observamos como el grupo 1 presentó una media de FvW de $121,56 \pm 57,70$ UI/mL, el grupo 2: $142,66 \pm 61,45$ UI/mL y el grupo 3: $146,78 \pm 61,98$ UI/mL. En la figura 43 se observa como no existen diferencias significativas en el test total ($p=0,268$), ni entre subgrupos.

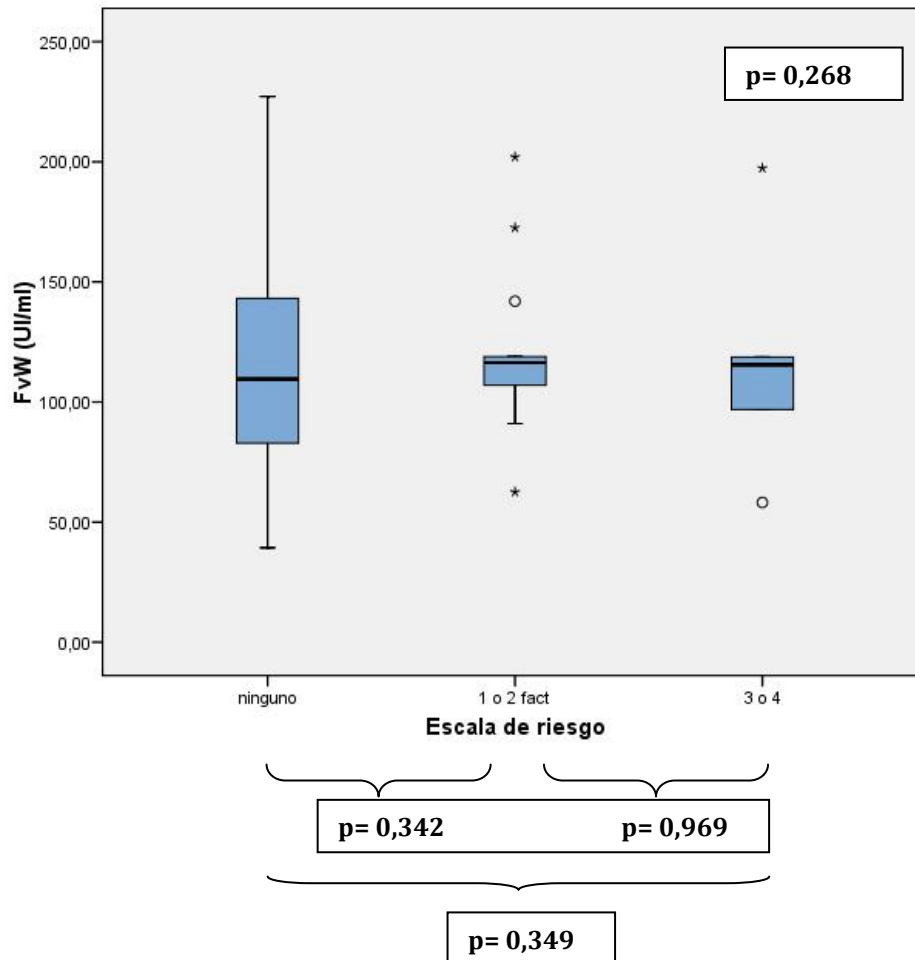


Figura 43. Test de ANOVA (TEST POST-HOC (TUKEY): FvW frente a factores de riesgo de muerte súbita.

De igual modo, del estudio de los valores de TnThs se vió como el grupo 1 presentó una mediana de TnThs de 9 (5-21) pg/mL, el grupo 2: 12 (5-17) pg/mL y en el grupo 3: 17 (11-28) pg/mL. En la figura 44 se observa como para este biomarcador sí existe significación estadística del test total ($p=0,038$), y a su vez entre los subgrupos 1 y 3 ($p=0,011$).

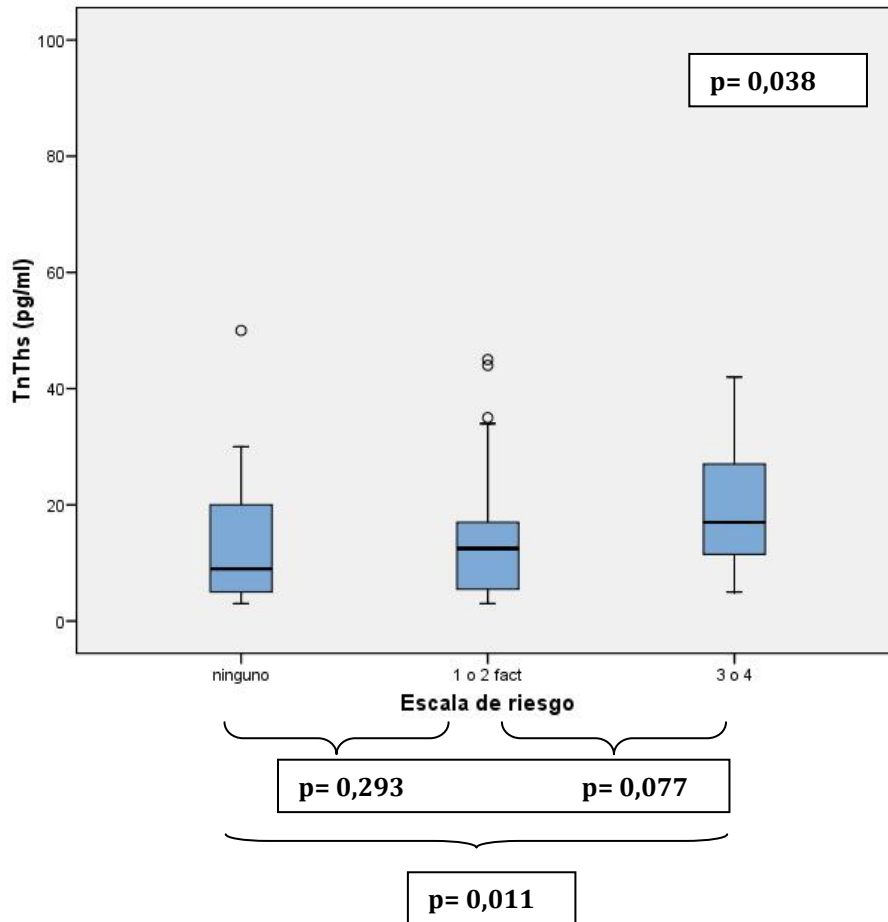


Figura 44. Prueba de Kruskal-Wallis: TnThs frente a factores de riesgo de MS.

El grupo 1 presentó una mediana de GDF-15 de 2561 (2004-3156) pg/mL; para el grupo 2: 2560 (2096-3897) pg/mL y para el grupo 3: 3326 (2459-3616) pg/mL. En la figura 45 se observa como para este biomarcador no existe significación estadística del test total ($p=0,139$), pero sí entre los subgrupos 1 y 3 ($p=0,037$).

En cuanto a los valores de PCRhs frente a los factores de riesgo de MS, no mostraron resultado significativo ($p=0,367$). Tampoco entre los subgrupos creados según factores de riesgo: $p=0,849$ entre grupo 1 y 2, $p=0,136$, entre grupo 2 y 3 ó entre 1 y 3, $p=0,341$.

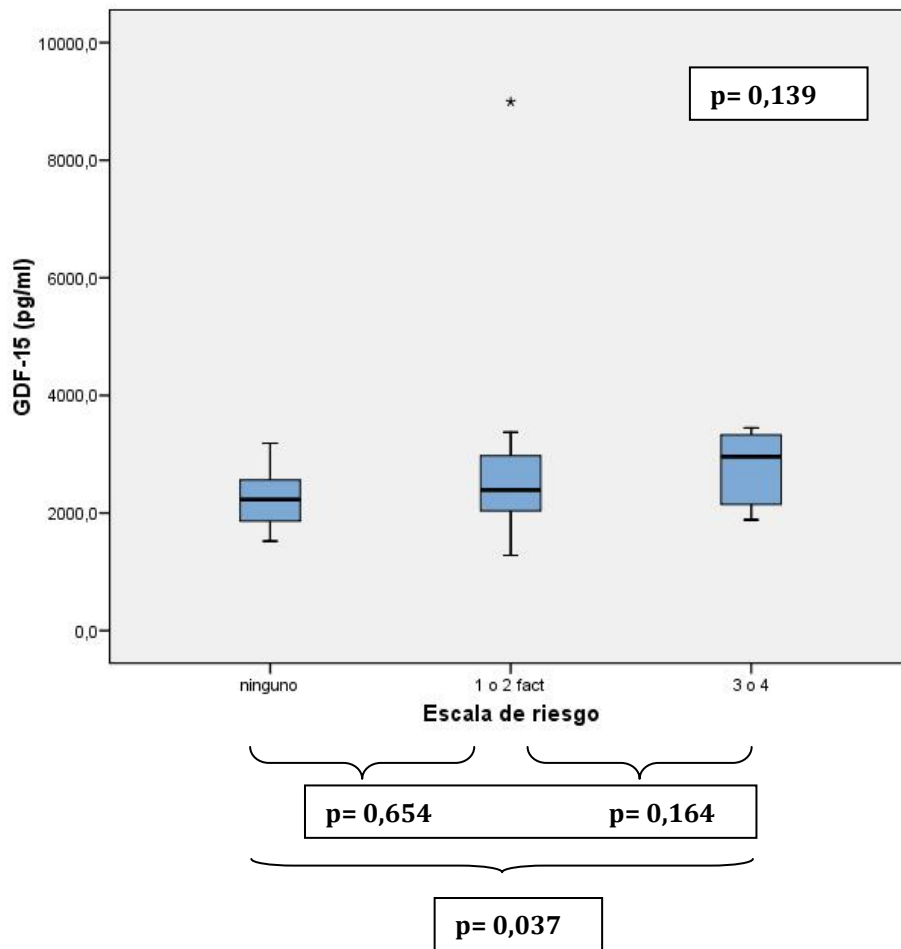


Figura 45. Prueba de Kruskal-Wallis: GDF-15 frente a factores de riesgo de MS.

Por último, para el grupo de péptidos del colágeno, la evaluación de sus concentraciones según el número de factores de riesgo de MS arrojó significación estadística únicamente para el péptido de formación de colágeno tipo III: PIIINP. El grupo 1 presentó una mediana de PIIINP de 3,32 (2,66-4,55) $\mu\text{g/L}$, el grupo 2: 3,61 (2,76-4,45) $\mu\text{g/L}$ y el grupo 3: 4,52 (3,55-6,07) $\mu\text{g/L}$. En la figura 46 se observa como sí existen diferencias estadísticamente significativas del test total ($p=0,011$), y a su vez entre los subgrupos 2 y 3 ($p=0,017$) y los subgrupos 1 y 3 también ($p=0,003$). Así se relacionó un aumento de las concentraciones de PIIINP a medida que agrupamos los pacientes según la presencia de mayor número de factores de riesgo y severidad de la enfermedad.

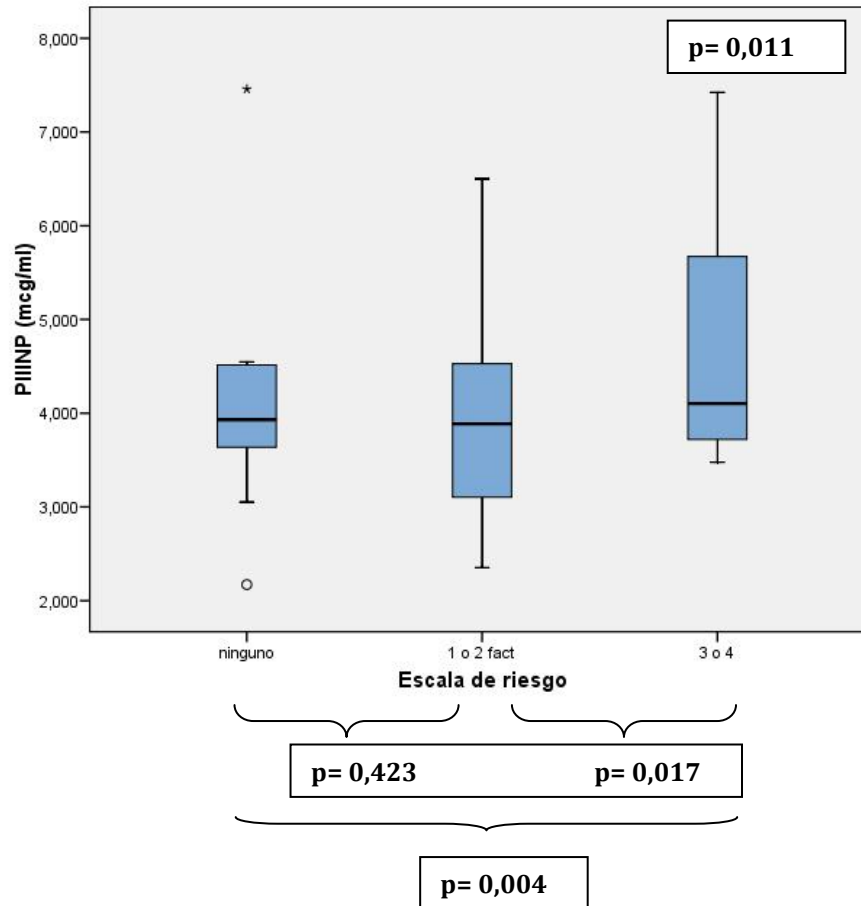


Figura 46. Prueba de Kruskal-Wallis: PIIINP frente a factores de riesgo de MS.

El resto de péptidos del colágeno no presentaron datos estadísticamente significativos como se puede apreciar en la Tabla 23.

Valor de p	Subgrupo 1 frente a 2	Subgrupo 2 frente a 3	Subgrupo 1 frente a 3	Prueba Kruskal- Wallis
PINP	0,112	0,711	0,126	0,175
PICP	0,239	0,224	0,598	0,898
PIIINP	0,427	0,017	0,004	0,011
ICTP	0,480	0,701	0,592	0,739
Ratio	0,355	0,858	0,448	0,603
PICP/ICTP				

Tabla 23. Valor de p de la comparación de los diferentes péptidos del colágeno estudiados en función de los subgrupos creados en función de los factores de riesgo de MS asociado.

V. DISCUSIÓN

Muchas de las moléculas involucradas en la fisiopatología subyacente en la MCH se pueden detectar en sangre periférica y son lo que conocemos con el nombre de biomarcadores. Es más nos pueden dar información sobre diferentes procesos biológicos normales, mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades, y pueden ser extremadamente útiles a la hora de realizar un diagnóstico diferencial o incluso de añadir un valor pronóstico a nuestra práctica clínica. En el presente trabajo se pretende evaluar la utilidad de los principales biomarcadores asociados a MCH, patología en la que desafortunadamente su estudio ha sido poco desarrollado. Ha existido un gran interés en el estudio y valoración de la utilidad de los biomarcadores en otras enfermedades cardiovasculares, siendo mayor su utilización en la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardiaca [126].

En los últimos años, la presencia de RTG como prueba de imagen, ha sido sugerida como una de las más novedosas aportaciones en cuanto al diagnóstico de MCH y podría estar asociada con un peor pronóstico para dichos pacientes, asociado con la dilatación ventricular progresiva y un mayor número de factores de riesgo de muerte súbita [99;101]. Además esta técnica se consolida como un método no invasivo establecido para evaluar la presencia de fibrosis.

En nuestro estudio, se observó una prevalencia de RTG en pacientes con MCH del 72,6%, similar a la reportada en otras series [101;198]. Esta prueba de imagen, junto al resto de variables clínicas descritas, nos permite evaluar los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a los distintos biomarcadores planteados a estudio.

5.1. BIOMARCADORES DE ESTRÉS PARIETAL: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS: NT-proBNP

Entre los biomarcadores de estrés parietal, el BNP y el NT-proBNP son sin duda los biomarcadores más ampliamente estudiados en la MCH.

Se ha postulado como el BNP evaluado en MCH obstructiva y no obstructiva aparece 85 y 23 veces más elevado respectivamente, en comparación con controles [61;134], dato que corroboramos en nuestra población con unas concentraciones

de NT-pro BNP de 228 (117-500) pg/ml en pacientes frente a 27 (12-76) pg/ml en controles sanos ($p < 0,001$). Así, Khan y cols propusieron la medición de BNP como una medida eficaz para la detección de MCH, especialmente en los niños, donde la sensibilidad de ECG y la ecocardiografía es relativamente más baja [199].

Tanto en miocardiopatía dilatada como en MCH, se ha demostrado que en los pacientes con disfunción cardíaca más grave y peor clase funcional según la New York Heart Association (NYHA), presentan concentración plasmática de BNP más altas [85;200]. Del mismo modo, en MCH, se relacionan los valores plasmáticos de BNP y la gravedad de los síntomas relacionados con la insuficiencia cardíaca que produce. Estos síntomas están generalmente asociados a una disfunción diastólica prevalente, aunque también a una disfunción sistólica con una reducción del VI, hipertrofia de la pared y ampliación de la cavidad en un 10%-15% de los casos. Esta evolución generalmente se manifiesta durante la mediana edad, y junto con la muerte súbita, representa la causa principal de mortalidad en estos pacientes [8;85;200]. Estos datos concuerdan con las concentraciones encontradas en nuestra población de pacientes con MCH que presentaron un aumento de la concentración de NT-proBNP y una clase funcional con disnea severa (NYHA \geq III) (498 (218-752) vs 106 (19-276) pg/ml, $p < 0,001$). Además de corroborarse con un aumento progresivo de sus concentraciones entre los tres grupos de NYHA ($p = 0,005$) (figura 19). Esta misma exploración en el comportamiento del NT-proBNP ha sido evaluada en un reciente estudio del valor pronóstico de dicho péptido en MCH realizado por Coats CJ y cols [201] y muestran la mismas diferencias en el aumento de la concentración de NT-proBNP a peor capacidad funcional según la NYHA.

Por otro lado, Pieroni y cols demostraron en pacientes con MCH no obstructiva, como el aumento de los niveles de BNP se producía en un tiempo relativamente corto en comparación con el tiempo de vida de los pacientes con MCH. Así, paralelamente a la reducción del espesor máximo de pared, un aumento progresivo del DTSVI y el DTDVI, y la reducción de la función contráctil del VI, aparecía un empeoramiento de los síntomas clínicos y la clase funcional de la NYHA [200]. Los valores de BNP reflejarían no sólo el llenado anormal del VI, sino también el empeoramiento de la función del VI y la elevación de las presiones del lado derecho. Todo conllevaría a una progresión de la enfermedad a etapa dilatada

e hipocontráctil, con un empeoramiento del cuadro clínico que elevaría significativamente los niveles de BNP en plasma, como resultado de un aumento de su secreción por los miocitos del VI y reflejaría el deterioro hemodinámico, caracterizado por un aumento de presiones [200]. En nuestro estudio no se encontraron asociaciones del NT-proBNP con la obstrucción del tracto sistólico de salida del VI, ni correlación con el DTDVI o la FEVI, pero sí se observó una correlación significativa con el valor del volumen auricular indexado ($r: 0,336$, $p=0,008$), que podría apoyar esos rasgos de disfunción sistólica propuestos por Pieroni y cols [200].

Posteriores trabajos en MCH, centrados en la determinación de NT-proBNP, demostraron como se asociaban valores plasmáticos aumentados de este biomarcador con los diferentes parámetros ecocardiográficos y clínicos, estudiados previamente para el BNP, incluyendo la clase funcional (NYHA), el GTSVI, el espesor máximo de la pared del VI o el diámetro de la aurícula izquierda, como aplicamos en nuestro estudio.

Thaman R. y cols [131] corroboran la teoría de que la liberación del NT-proBNP de los miocitos ventriculares surge en respuesta a un aumento del ensanchamiento de la pared del VI. Así en MCH, tanto la hipertrofia miocárdica, la fibrosis, la desorganización de los miocitos y la obstrucción del tracto de salida del VI, contribuyen a ello. Por tanto, no es sorprendente que los valores de NT-proBNP correlacionen con un espesor máximo de la pared y el GTSVI en reposo. La relación con el deterioro de la función sistólica es similar a la observada en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva [202], lo que presumiblemente refleja el mayor deterioro hemodinámico y el estrés de pared asociado con la dilatación ventricular [131].

Como factores pronósticos, los valores plasmáticos de NT-proBNP y ANP son predictores independientes de eventos cardiovasculares en pacientes con MCH [131;202]. Así, Mutlu B. y cols [203] demostraron como la determinación de la concentración de NT-proBNP pueden predecir el curso clínico de pacientes con MCH. Presentaban pacientes con una situación basal de los niveles de NT-proBNP ≥ 1500 pg/ml que mostraban mayor riesgo de deterioro clínico y empeoramiento de los síntomas de insuficiencia cardíaca a 2 años vista. Proponían, por tanto, una

estratificación de los pacientes con MCH dividiendo los subgrupos en bajo, mediano y alto riesgo, utilizando 2 variables simples, la clase funcional de la NYHA y la concentración de NT-proBNP. Los valores de NT-proBNP y la clase funcional de la NYHA fueron predictores independientes en su estudio, pero la evaluación de la gravedad de los síntomas usando la clase funcional de la NYHA puede ser muy subjetiva, debido a la presentación heterogénea de pacientes con MCH, por lo que proponían la utilización de NT-proBNP como más representativo para predecir el curso clínico de la MCH [203]. En este trabajo no evidenciamos aumento estadísticamente significativo de los valores de NT-proBNP a medida que agrupamos los pacientes según la presencia de mayor número de factores de riesgo y sólo se comportó como predictor independiente asociado al porcentaje de fibrosis.

Pero, la confirmación de este biomarcador respecto a su valor pronóstico en MCH, ha sido recientemente publicada por Coats CJ y cols [201]. Así en un amplio estudio de 847 pacientes durante una media de 3,5 años, evidencian como pacientes con concentraciones NT-proBNP presentaban un riesgo siete veces mayor de muerte o trasplante (Riesgo relativo (RR) 6,7, IC 95%: 1.7-27.2, $p=0,0074$) en comparación con aquellos con valores normales de NT-proBNP. Además su concentración fue mayor en pacientes transplantados y en aquellos que murieron por IC crónica, que en los que murieron por MS o habían recibido una descarga en el desfibrilador implantado (DAI), durante el seguimiento. En el análisis de regresión de Cox univariable, encontraron como el NT-proBNP se comportaba como un importante predictor de IC y de muertes relacionadas con trasplante ($n=23$; RR 3,03, IC 95%: 1,99-4,60; $p<0,001$), pero no de MS o de eventos relacionados con el DAI ($n=11$, HR: 1,54, IC 95%: 0.91-2.60, $p=0,111$) en pacientes con MCH. Estos datos sugerirían que valores elevados de NT-proBNP, podrían identificar a pacientes en beneficio de usar ciertas estrategias farmacológicas de prevención de disfunción progresiva del VI, antes de la aparición de la clínica asociada a IC [201].

Por otra parte, Magga J. y cols [137] en un estudio de 24 pacientes con MCH atribuible a mutación TPM1-Asp175Asn, evaluaron los niveles de NT-proBNP y además examinaron el fenotipo cardíaco por CRM y las concentraciones de PIIINP,

como en el presente trabajo. El principal hallazgo que encontraron los autores, fue la elevación de los valores de NT-proBNP que reflejaba remodelación cardiaca, apoyado esto en los resultados de la CRM. Demostraron también que en los pacientes con MCH, los títulos de NT-proBNP se asociaban con los niveles del PIIINP, reflejando estos la presencia de fibrosis miocárdica en MCH y confirmado con presencia de RTG [99;137]. Este estudio indica que la remodelación del VI aumenta la secreción de NT-proBNP y evidencia que en un subconjunto de pacientes con MCH, sufren una remodelación cardiaca, caracterizada por un creciente deterioro interrelacionado de la masa del VI, del tabique izquierdo, fibrosis y disfunción sistólica. Así proponen que este proceso de remodelación se produciría por un ensanchamiento de la pared del miocardio, que aumenta la liberación de NT-proBNP de los miocitos y fibroblastos [137]. En el análisis de la presente serie de datos de NT-proBNP con el PIIINP y el resto de péptidos del colágeno, no se encontró asociación significativa alguna que corrobore los datos presentados en dicho estudio, el cual presentaba un tamaño muestral pequeño y que podría ser la causa de las diferencias con los datos que ahora se han presentado en una población mayor.

Nuestro grupo en un estudio previo, también describió concentraciones elevadas de NT-proBNP asociándolas con una incipiente remodelación del VI y fibrosis evaluada por CRM con presencia de RTG. En este trabajo se proponía éste biomarcador para ser utilizado en el diagnóstico de remodelación del VI y considerar su concentración elevada, como un factor de riesgo de MS en MCH [101]. Además, los pacientes con presencia de fibrosis en RTG presentaban una tolerancia peor para la prueba de esfuerzo y mostraron niveles más altos de NTproBNP. De forma similar, en nuestro trabajo se sugiere la determinación de NT-proBNP como un factor de riesgo a añadir en la valoración de los pacientes con MCH, ya que nuestros datos muestran como los pacientes que presentaban asociada historia de muerte súbita familiar tenían mayores concentraciones de NT-proBNP (294 (137-524) vs 100 (18-235) pg/ml, $p < 0,001$). Además mostramos datos en nuestra cohorte de pacientes con presencia de fibrosis marcada mediante RTG y NT-proBNP elevada (272 (153-523) vs 117 (33-398) pg/ml, $p = 0,003$) y una

correlación positiva del NT-proBNP con el porcentaje de fibrosis evaluado por RTG (r: 0,263, p=0,018).

Por tanto se corrobora que los valores de NT-proBNP se correlacionan positivamente con la severidad de la hipertrofia, al igual que otros estudios mencionados [101;131] y que NT-proBNP es un marcador de progresión de la enfermedad en la MCH asociado a peor capacidad funcional. Por todo ello, se podría sugerir que la evaluación seriada de este biomarcador podría proporcionar de forma no invasiva el reconocimiento del deterioro hemodinámico, presencia de fibrosis y severidad de la MCH.

5.2. BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN: PCRhs

La proteína C-reactiva ultrasensible (PCRhs) es un indicador muy sensible de procesos que cursan con inflamación. Ha demostrado que es un predictor independiente de mortalidad cardiovascular en pacientes con enfermedad arterial coronaria [142;204;205]. Estos estudios proporcionaron pruebas convincentes de que las concentraciones elevadas de PCRhs indicaron presencia de enfermedades inflamatorias clínicamente importantes, y de forma independiente la PCRhs se comportó como un biomarcador predictivo de eventos cardiovasculares en estos pacientes. También se ha demostrado que concentraciones elevadas de PCRhs juegan un papel importante en la progresión de la aterosclerosis [142;206]. Además, sus valores se correlacionan con la evolución de insuficiencia cardiaca congestiva [207]. Pero fueron Lamparter S. y cols los primeros en estudiar sus valores en miocardiopatías, en su caso miocardiopatía dilatada idiopática, en una cohorte amplia con 198 pacientes [208]. Los datos que obtuvieron mostraron una mayor proporción de pacientes (41%) con PCRhs altas y asociadas a pacientes con clase funcional III frente a un 25% de pacientes con mejor estado de clase funcional y valores más bajos de PCRhs (p<0,005). Además encontraron que la PCRhs y la FEVI se comportaban como predictores de muerte.

Senes M. y cols encontraron concentraciones elevadas de PCRhs y fibrinógeno en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática en comparación con controles

[209]. Este hallazgo confirmaba también la existencia de un aumento de PCRhs en procesos inflamatorios y un estado protrombótico en pacientes con esta cardiomiopatía, pero estos datos se obtuvieron en un estudio con sólo 28 pacientes.

Nuestros resultados no muestran datos similares a estos estudios. Presentando una cohorte mayor (95 pacientes para PCRhs), no se ha visto diferencias de sus valores entre pacientes y controles. Sí en cambio se observó asociación de concentraciones mayores en pacientes con peor capacidad funcional (figura 22) y además se encontraron datos significativos en pacientes con HTA y antecedentes de FA que podrían atribuirse al rol inflamatorio y aterosclerótico de estas covariables.

Ishikawa C. y cols estudiaron la PCRhs y el NT-proBNP como predictores de mortalidad en pacientes con miocardiopatía dilatada, en una serie de 84 pacientes [210]. En dicho estudio, no encontraron correlación significativa entre los niveles de PCRhs y los de NT-proBNP como posible marcador de sobrecarga hemodinámica, al igual que en nuestra cohorte ($p=0,072$). En su trabajo, clasificando los pacientes según la NYHA en clase funcional III o IV, sí encuentran incrementados los valores plasmáticos de NT-proBNP y PCRhs en relación con la gravedad de la insuficiencia cardiaca. Por tanto, consideran la combinación de ambos, sobre todo valores de PCRhs >1 mg/L, como importantes predictores independientes de eventos cardíacos en este tipo de pacientes.

Las limitaciones más significativas del estudio de las concentraciones séricas de PCRhs, recaen en el hecho de que son un reflejo no específico de una amplia gama de procesos patológicos, incluyendo la inflamación local o sistémica, trauma de cualquier tipo, daño tisular o infección. Por tanto, las concentraciones de PCRhs no se pueden interpretar sin una historia clínica y un examen físico completos [206]. Además se añade que las concentraciones de PCRhs pueden variar marcadamente en el día a día, por lo que sería conveniente su estudio de tipo cinético.

5.3. BIOMARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL: FvW

La disfunción endotelial es un hallazgo frecuente en pacientes con MCH y su extensión ha demostrado implicaciones pronósticas [211]. Los valores plasmáticos de FvW están aumentados en diferentes estados de daño endotelial y por tanto han sido propuestos como marcadores útiles de daño y disfunción endotelial [158;159]. En nuestro estudio se ha visto como en pacientes con MCH presentaban concentraciones plasmáticas de FvW significativamente elevadas y que están asociadas con diferentes condiciones relacionadas con la severidad de la enfermedad.

Este no es el primer biomarcador de disfunción microvascular que se ha visto aumentado en la MCH. De hecho, Dimitrow *y cols.* [160] demostraron como la trombomodulina soluble (sTM), el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), la dimetilarginina asimétrica (ADMA), la dimetilarginina simétrica (SDAM) están elevados en la MCH en comparación con individuos sanos, lo que indica que la disfunción endotelial podría observarse con biomarcadores en sangre periférica. Sin embargo, los dos estudios previos que evaluaban los valores de FvW entre pacientes con MCH y controles emparejados por edad y sexo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas [160;161]. Pero el hecho de que ambos estudios incluyeran sólo pequeñas cohortes de pacientes podría haber limitado sus resultados.

Se han identificado concentraciones plasmáticas aumentadas de FvW en diferentes entidades clínicas como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes mellitus y en fibrilación auricular [212] y se asocian con mayor riesgo cardiovascular y peores resultados [212;213]. Nuestros resultados revelan que además, en pacientes con MCH y FA, tienen concentraciones aún más elevadas de FvW. Aunque, no observamos aumento estadísticamente significativo de los niveles de FvW a medida que agrupamos los pacientes según la presencia de mayor número de factores de riesgo, los valores elevados de FvW de la presente cohorte sí se relacionaron con diferentes comorbilidades como HTA o FA. Esto sugiere que el daño/disfunción endotelial aparece de forma independiente en la MCH. Además, los títulos elevados de este biomarcador aparecen correlacionados

con las diferentes condiciones de severidad de la enfermedad, que son la clase funcional grave, obstrucción del VI y con mayor importancia la TVNS.

En el presente estudio se ha podido observar que pacientes con MCH y obstrucción del TSVI tienen mayores concentraciones de FvW en comparación con los pacientes sin él. El flujo acelerado debido a la obstrucción del TSVI puede estimular las plaquetas o células endoteliales a través de un incremento de la tensión de cizalla que, a su vez, aumente la producción de trombina y FvW [146]. Aparte de este aumento, como demuestra Le Tourneau *y cols.* [214], altas fuerzas de cizallamiento aumentan la proteólisis de los multímeros grandes del FvW, produciendo deterioro de su función y un síndrome de von Willebrand adquirido. Este deterioro de la función se asoció de forma independiente con la magnitud de la obstrucción y su reducción se asoció con una mejoría de la función del FvW. En contraste, los pacientes con MCH tienen un riesgo tromboembólico mucho más alto que las personas sanas [116]. La activación de la trombina y las plaquetas proporcionan mayor riesgo de sufrir un evento embólico.

Los mecanismos exactos de la disfunción endotelial en la MCH son desconocidos. Posiblemente el hecho de tener un ventrículo engrosado podría generar fuerzas extravasculares de compresión que jueguen un papel en la disfunción microvascular visto en la MCH [215]. Otra posibilidad es la existencia de plaquetas activadas [146] que produzcan factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se sabe que el PDGF tiene el potencial para inducir la proliferación de células musculares lisas vasculares, fibroblastos y células endoteliales [216].

Una mayor extensión del grado de RTG reflejaría una mayor expresión de la enfermedad [90;101] y se asocia con daño miocárdico más severo y con resultados clínicos adversos [198]. De hecho, está demostrada la asociación entre el RTG, la TVNS y la obstrucción del TSVI [101]. Estos datos sugieren relación con el pronóstico, pero sin embargo, nuestros datos no mostraron una asociación significativa entre el FvW y la fibrosis, evaluada por la RTG.

La existencia de la disfunción microvascular podría estar implicada en la patogénesis de la hipertrofia observada en pacientes con MCH. Se ha demostrado que la disfunción endotelial conlleva una producción aumentada de un potente

mediador vasoconstrictor, producido por las células endoteliales vasculares como es la endotelina-1 (ET-1). Ésta puede estar aumentada en pacientes con MCH, como se ha observado en estudios donde causaría hipertrofia en cultivos de células musculares del corazón, sugiriendo su papel en el desarrollo de hipertrofia cardiaca [217]. Además se ha visto a su vez como los títulos de ET-1 aumentan los niveles de FvW en humanos, produciendo una interacción recíproca, es decir, la propia disfunción microvascular aumenta la expresión de ET-1 que, a su vez, estimula la producción de FvW [218].

Se demuestra por tanto con este trabajo que los pacientes con MCH presentan títulos significativamente más elevados de FvW. A su vez, éstos están asociados con diferentes condiciones relacionadas con la gravedad de la enfermedad, como la clase funcional grave, obstrucción y taquicardia ventricular no sostenida. Los niveles elevados del FvW parecen ser el resultado de la presencia de disfunción microvascular latente en estos pacientes y no debido a condiciones relacionadas con la MCH.

5.4. BIOMARCADORES DE NECROSIS EN MIOCITOS: TnT_{hs}

En este trabajo se muestra como los valores séricos de TnT_{hs} se elevan hasta en un 42% de nuestra cohorte de pacientes con MCH, y en sólo el 4,4% de los sujetos de control sanos emparejados por edad y sexo. Es importante destacar que los pacientes incluidos con MCH son pacientes ambulatorios estables que acuden por seguimiento a las consultas clínicas. La elevación de TnT_{hs} podría reflejar una continua pérdida de miocitos, debido al moderado rango de la necrosis que observamos. Además, la elevación de TnT_{hs} se asocia con los parámetros de la gravedad de MCH como la clase funcional, disfunción sistólica, y la fibrosis evaluada por CRM. Observamos también, un aumento significativo de las concentraciones de TnT_{hs} a medida que agrupamos los pacientes según la presencia de mayor número de factores de riesgo y severidad de la enfermedad.

Por lo tanto, se podría proponer la TnThs como un biomarcador importante en la MCH, informando de la presencia de daño miocárdico en estos pacientes.

Con los datos presentados se muestra que los pacientes con MCH presentan también mayores títulos de TnThs que los sujetos control pero, como era de esperar, este incremento fue relativamente bajo, si lo comparamos con los que aparecen en los procesos agudos coronarios. Se ha podido demostrar, la importancia de la detección de la TnThs en los procesos no agudos, y cómo esta medida de alta sensibilidad puede aumentar el porcentaje de troponinas positivas hasta un 42%.

En anteriores estudios basados en pacientes crónicos estables, menos del 10% de los pacientes mostraron una elevación de troponinas determinadas con los métodos clásicos [166]. Incluso en pacientes con IC aguda, estudios de cohortes revelan como sólo el 6,2% de los pacientes fueron positivos para las troponinas medidas sin métodos ultrasensibles [219]. Otro estudio que incluyó 60 pacientes con miocardiopatía dilatada, presentó un 28,3% de TnT positivas en muestras tomadas en un momento agudo o subagudo [220].

Por otra parte, en MCH, Pop y cols. [221] mostraron que la troponina por encima de los valores normales puede estar presente en pacientes con MCH sin enfermedad coronaria manifiesta. Sato y cols. [168] demostraron que pacientes con MCH con concentraciones séricas de TnT aumentadas tuvieron una disminución de la fracción de acortamiento del VI y del grosor del tabique ventricular en el ecocardiograma durante el seguimiento, sugiriendo a la TnT como un indicador de lesión subclínica de miocitos y/o de progresión MCH dilatada. Encontraron que el 50% de los pacientes presentaron TnT positivas en una pequeña cohorte de 30 pacientes con MCH [168], apoyando así nuestros resultados con TnThs. En nuestro estudio se observa que los niveles de TnThs se asocian con parámetros de gravedad en la MCH. Por tanto, serían necesarios estudios longitudinales para determinar si los niveles de TnThs podrían ser un biomarcador predictivo fiable en el pronóstico de esta patología.

Recientemente, el VAI se ha propuesto como buen índice de función diastólica y marcador de "la carga de presión" y como un excelente predictor de eventos adversos cardiovasculares. Mientras, el tamaño de la AI se ha convertido en una

herramienta valiosa en el diagnóstico de IC con fracción de eyección conservada [222]. En MCH, el remodelado de la AI ha demostrado que se asocia con una mayor hipertrofia ventricular izquierda, mayor disfunción diastólica, aumento de las presiones de llenado, peor clase funcional, y a un mayor riesgo de arritmias auriculares [222]. En los resultados del presente estudio se observa una fuerte correlación entre los valores de TnT_{hs} con el diámetro de la aurícula izquierda, pero no se ha podido encontrar una correlación significativa con el VAI.

Los cambios patológicos observados en los cardiomiocitos y en los fibroblastos, son componentes importantes del remodelado cardiaco. Además del daño y la apoptosis de miocitos, los fibroblastos y el “turnover” del colágeno también juegan un papel importante en el remodelado del miocardio [223]. La disfunción microvascular coronaria, la hipertrofia severa, y la desorganización de los miocitos están asociadas a una evolución desfavorable en pacientes con MCH, ya que son factores determinantes de la isquemia y el desajuste entre la demanda y suministro de oxígeno, lo que podría ser la explicación de los mayores valores de TnT_{hs} en pacientes con MCH. Este estado de isquemia es la consecuencia, entre otros mecanismos, de la disfunción endotelial debido a las anomalías de las pequeñas arterias coronarias intramurales, que suelen ser más comunes en las partes de tejido con fibrosis miocárdica que en aquellos tejidos sin ella ó leve fibrosis [56]. Además concuerda con los datos obtenidos para el FvW elevados también en MCH, y considerado como marcador de daño y disfunción endotelial mencionados anteriormente. Cecchi *y cols.* [224] encontraron que la severidad de la disfunción microvascular coronaria, evaluada por tomografía por emisión de protones, era predictor independiente a largo plazo del deterioro clínico y muerte por causas cardiovasculares en pacientes con MCH. Así, la disfunción microvascular es una posible causa asociada a valores elevados de TnT_{hs} en los pacientes estudiados y por tanto, estos datos apoyan los obtenidos en el presente trabajo. La asociación entre la concentración de TnT y la presencia de fibrosis ha sido observada anteriormente en miocardiopatía dilatada idiopática y en grupos con cardiomiopatía secundaria, donde el subgrupo de pacientes con concentraciones elevadas en suero de colágeno y la TnT mostraron peor pronóstico a corto plazo [220]. En consonancia con las conclusiones del presente estudio, algo similar ocurre en los pacientes con MCH, lo que explicaría la

asociación de los niveles de TnT con el grado de fibrosis evaluado por CRM y la disfunción sistólica del VI.

En conclusión, en base a los resultados obtenidos y en comparación con estudios anteriores en cardiopatías similares estudiando TnT, los resultados obtenidos en este trabajo han sugerido que un aumento en la TnT podría considerarse como un valor relevante del remodelado cardiaco en la MCH. Además de un indicador de daño subclínico de miocitos en curso y, en consecuencia, podría ser importante, tras comprobar también, como aumenta a peor estado funcional de los pacientes. Por tanto, los valores de TnT en suero podrían considerarse como un biomarcador útil para predecir y/o indicar el deterioro del estado clínico, el grado de fibrosis, y la progresión a disfunción sistólica del VI en pacientes con MCH.

5.5. FACTORES DE CRECIMIENTO: GDF15

Estudios recientes han evaluado la asociación entre los títulos de GDF-15 y varias patologías cardiovasculares, lo que denota un vínculo con la gravedad de la enfermedad y además, sugieren el GDF-15 como un nuevo biomarcador pronóstico en la insuficiencia cardíaca [225]. Debido al interés de este biomarcador en otras enfermedades cardiovasculares, se decidió evaluar los diferentes aspectos clínicos del biomarcador, comparándolo en tres subgrupos clasificados según la clase funcional (NYHA), con el fin de identificar una relación entre los niveles de GDF-15 y gravedad de la enfermedad, ya que la MCH se asocia con un empeoramiento de la clase funcional.

Está descrito que la hipertensión sería la causa secundaria más común de la hipertrofia cardíaca [226]. Este estudio excluyó a los pacientes con hipertensión arterial refractaria y los resultados corresponden únicamente a pacientes con MCH que a veces padecen hipertensión en ausencia de otra etiología [227]. Esta condición además provoca un mayor deterioro de la clase funcional de NYHA en individuos más jóvenes, mientras que en pacientes mayores, la diferencia entre

MCH con la hipertensión y la MCH aislada se estrecha y se vuelve insignificante [228].

En el presente estudio, la elevación de los valores de GDF-15 se ha asociado con características indicativas de severidad de la enfermedad, como el aumento de la edad, la clase funcional severa (NYHA \geq II), comorbilidades y peores predictores de eventos (hipertensión, disnea o FA), capacidad de ejercicio limitada y una leve reducción en el aclaramiento de creatinina. De acuerdo con los resultados actuales, Eggers *y cols.* demostraron que concentraciones de GDF-15 eran mayores según presentaban diferentes comorbilidades como hipertensión o diabetes [229]. Además, en el análisis multivariado se puede ver que los niveles de GDF-15 están relacionados con la HTA ($p < 0,001$) y con TVNS ($p = 0,006$). Como ambas comorbilidades agravan irremediablemente el remodelado y la hipertrofia, las concentraciones de GDF-15 podrían reflejar los cambios fisiopatológicos que se producen en la remodelación del ventrículo izquierdo.

Se ha demostrado que la TVNS es un fuerte determinante de insuficiencia cardíaca congestiva y muerte súbita en pacientes jóvenes con MCH; sin embargo, en pacientes de más de 40 años la TVNS está más relacionada con una pérdida progresiva de miocitos y fibrosis [230]. Como la cohorte del presente estudio incluyó pacientes con edades de media $47,1 \pm 14,2$, hace pensar que el aumento de GDF-15 y la incidencia de arritmia ventricular reflejan probablemente un peor estado funcional. Además, los valores de GDF-15 únicamente se asociaron con la TVNS en el grupo III según NYHA (figura 34). Por tanto, la valoración de las concentraciones de GDF-15 asociadas a síntomas severos en MCH, podría ser un hallazgo que permitiera la identificación de más pacientes de riesgo en comparación con otros biomarcadores corrientes de uso clínico.

Diferentes estudios clínicos han demostrado claramente que la estratificación de los pacientes es posible en función de varios factores que regulan la respuesta hipertrófica del miocardio [231]. Los cambios en MCH grave se asocian independientemente con la edad y riesgo consecuente, que lleve consigo peores y sucesivas alteraciones como niveles de expresión de las proteínas estructurales, tasa de proliferación de fibroblastos, deposición de los componentes de la matriz extracelular o la fibrosis y la hipertrofia de los miocitos cardíacos [232].

A pesar de las limitaciones que puedan surgir de interpretar perfiles de biomarcadores plasmáticos, el presente estudio muestra correlaciones interesantes entre GDF-15 y los valores plasmáticos del resto de biomarcadores que pueden sugerir gravedad de la MCH como son: NT-proBNP, TnT_{hs} o el FvW. Roldán *y cols.* encontraron cambios en los niveles de MMP-2 en pacientes con MCH, lo que sugiere la implicación del sistema de metaloproteinasas en el estado a largo plazo de la enfermedad [123]. Además, como está descrito, los valores plasmáticos de NTproBNP en la MCH se relacionan con un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca [233], en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo, donde este biomarcador se ha visto más elevado a mayor disnea y en aquellos pacientes con mayor fibrosis vista en el RTG. Concentraciones altas de TnT_{hs} también se han relacionado como se muestra en este trabajo, con graves manifestaciones clínicas en la MCH, debido a la pérdida continua de miocitos, por lo que la TnT_{hs} se sugiere como biomarcador de remodelado cardíaco y de mayor daño miocárdico. Además, en pacientes con MCH, hemos visto que una mayor concentración plasmática de FvW se relaciona con un peor estado de clase funcional, y además vemos como el FvW también se correlaciona con los valores de GDF-15.

Diferentes artículos definen el GDF-15 como un factor agravante en la hipertrofia, aún sin ser una citoquina cardíaca específica. Xu *y cols.* observaron que los ratones transgénicos que sobreexpresan GDF-15 soportaban mejor la presión inducida por sobrecarga de la hipertrofia [178]. También mostraron como la expresión de este biomarcador, en cultivos de cardiomiocitos antagoniza la hipertrofia inducida por agonistas *in vitro*, identificando esta proteína como un factor antihipertrófico que antagoniza la pérdida de la función ventricular. Por tanto, las correlaciones presentadas entre los valores de GDF-15 en plasma y el resto de biomarcadores, sugieren que el podría actuar dentro de la red de citoquinas cardioprotectoras activas en el remodelado de la hipertrofia.

Podríamos haber esperado resultados con mayores influencias en el análisis multivariable respecto a las concentraciones de GDF-15 que remarcara daño severo cardíaco, pero el hecho de que la cohorte contemplada en este análisis multivariado no seleccionaba pacientes más jóvenes podría explicarlo. Estos serían

más capaces de adoptar métodos eficaces para controlar la enfermedad, que resulte en una disminución de sus síntomas y la expresión de biomarcadores.

En este trabajo observamos un aumento significativo de los niveles de GDF-15 en aquellos pacientes con mayor presencia de factores de riesgo y severidad de la enfermedad, al igual que con la evaluación de sus resultados en función de los subgrupos según la clase funcional de NYHA. Se muestra un aumento significativo de los títulos de GDF-15 sólo en condiciones patológicas desarrolladas y clase funcional avanzada. Los pacientes de clase NYHA I, sin un perfil severo de la enfermedad, presentan valores de GDF-15 bajos y moderados (Tabla 17) y, por tanto, no parecen estar implicados en la enfermedad de MCH. Sin embargo, el hecho de que los valores de GDF-15 no aumenten en pacientes estables (clase I) le confiere un poder mayor como biomarcador que indique cambio de situación funcional, puesto que sólo estaría altamente elevado en peor grado de la clase funcional (Figura 29), y así sería útil deducir daño miocardio en profundidad. De hecho, los títulos de GDF-15 en clase II se elevan ligeramente, pero aumentan notablemente en clase III en comparación con pacientes en clase funcional I (Figura 29), y esto corrobora hipótesis de este trabajo.

En esta misma línea, Daniels *y cols.* mostraron como los valores de GDF-15 podían predecir muerte en pacientes ancianos de forma independiente y en combinación con NT-proBNP y no asociados a motivos cardiovasculares [234]. Pero se necesitan estudios con diferentes edades, ya que el valor predictivo de este biomarcador en poblaciones más jóvenes requiere más investigación.

Aunque el conocimiento de las funciones fisiológicas es limitado, el aumento de los valores de GDF-15 podría estar relacionado con la progresión de la enfermedad, como una consecuencia aparente de la actividad del remodelado cardíaco. Asociaciones similares se encontraron en diferentes estudios, entre las concentraciones plasmáticas de GDF-15 y peor estado de insuficiencia cardíaca y de la función renal [177;234] que proporciona gran información pronóstica. Aunque, por el contrario, se encontraron correlaciones similares para otros marcadores de predicción como TnT_{hs} y NT-proBNP. El presente estudio muestra correlaciones con otros biomarcadores que indican el gran potencial como biomarcador de peor estado funcional del GDF-15 en MCH.

GDF-15 ha demostrado por tanto, estar aumentado en la hipertrofia de los miocitos, exhibir efectos agravantes o de protección en la hipertrofia y estar asociado con trastornos vasculares como la aterosclerosis, la hipertensión y la insuficiencia cardíaca. Como conclusión, se observa el aumento de los niveles plasmáticos de GDF-15 en pacientes con un peor perfil de MCH y que se asocia con manifestaciones clínicas severas. Además, los valores de GDF-15 están significativamente correlacionados con otros biomarcadores de daño vascular y remodelado intersticial, mecanismos que están involucrados en la fisiopatología de la enfermedad. Los títulos de GDF-15 se incrementan significativamente en condiciones de MCH y clase funcional avanzada. GDF-15 podría ser útil para estimar el grado de daño miocárdico en la práctica clínica. Así los títulos de GDF-15 podrían permitir una mejor caracterización de los pacientes con MCH grave y, por lo tanto, un uso eficaz de una terapia específica y estrategias de prevención.

5.6. BIOMARCADORES DE FIBROSIS Y REMODELADO TISULAR: PÉPTIDOS DEL COLÁGENO

Un hallazgo constante en el miocardio de pacientes con MCH, es la alteración del depósito de fibras de colágeno de tipo I y de tipo III. Estas alteraciones reflejan la pérdida del equilibrio fisiológico entre la síntesis y la degradación de las moléculas de colágeno fibrilar, a su vez debida a que en el miocardio se ve alterada la regulación tanto de los factores que estimulan la síntesis e inhiben la degradación, como de los factores con acciones opuestas [182]. Desde el punto de vista histológico, las alteraciones de la matriz de colágeno presentes serían: *a)* fibrosis difusa secundaria a la acumulación exagerada de fibras en el intersticio y en el espacio perivascular, y *b)* disrupción excesiva de la red de colágeno que rodea a cada cardiomiocito (endomysio) y a grupos de cardiomiocitos (perimysio).

Se ha demostrado en la MCH un remodelado del ventrículo izquierdo (VI), con cambios en la matriz extracelular [121]. Así las alteraciones en la matriz extracelular podrían desempeñar un papel importante en la génesis de la disfunción diastólica en la MCH, y muy probablemente en aquellos que desarrollan

disfunción sistólica. El depósito de colágeno aumenta la rigidez de la cámara ventricular izquierda y compromete el llenado ventricular durante la diástole. La cuestión aún no aclarada consiste en saber si, la alteración en la matriz intersticial ocurre sólo debido a la activación de fibroblastos en respuesta a factores humorales o mecánicos, sin que haya pérdida de cardiomiocitos o si, por el contrario, se asocia a la muerte celular, estimulando el crecimiento de la matriz extracelular [51;122].

Se ha publicado que en la MCH existe un aumento en la tasa recambio de colágeno tipo I que puede conllevar a una disfunción diastólica [122]. La muerte de los cardiomiocitos mediante apoptosis podría ser un proceso más común de lo que pensamos, estimulándose procesos de reparación que contribuyen a la expansión del intersticio. La apoptosis de los cardiomiocitos lleva también al adelgazamiento de la pared ventricular, hecho descrito en la MCH [235], y al deterioro de la función sistólica. En estudios clínicos recientes efectuados en pacientes con MCH se ha observado que la fibrosis se asocia con la disfunción diastólica [236], y la disrupción con la disfunción sistólica. Sin embargo, las relaciones entre las alteraciones del colágeno miocárdico y las alteraciones de la función cardiaca todavía no están claras y no pueden contemplarse aisladas de posibles alteraciones de otros componentes de la matriz extracelular que, también influyen en la rigidez de la cámara ventricular durante la diástole o la contractilidad sistólica del miocardio.

Lombardi *y cols.* [122] en un estudio con 36 pacientes, defienden cómo el recambio de colágeno en MCH está aumentado comparado con resultados en controles sanos, predominando la síntesis de colágeno tipo I y III sobre su degradación y estando asociados cambios en la actividad de las metaloproteinasas (MMP), principales enzimas encargadas de la degradación de los componentes de la matriz, y sus inhibidores (TIMPs). Aún así, en los datos que presentan, son las concentraciones de PIIINP e ICTP las que muestran significación estadística en su comparación con los controles, por tanto ambos péptidos de formación y degradación están aumentados en los pacientes de su estudio. Sipola *y cols.* [237] en otro estudio con 21 pacientes, presentaron concentraciones de PIIINP elevados frente a controles. A su vez, en ambos estudios, se ve cómo la fibrosis, valorada

mediante resonancia magnética, está relacionada con el remodelado ventricular, la hipertrofia, la aparición de taquicardia ventricular [101;122] y el deterioro en la clase funcional [101;123;123].

Como se puede observar en los resultados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los péptidos relacionados con formación de colágeno tipo I y III (PICP, PINP o PIIINP), entre pacientes y controles. Sin embargo, en el ICTP, péptido asociado a la degradación de colágeno tipo I, sí se apreciaron diferencias significativas en sus concentraciones entre ambos grupos. Dichos resultados coinciden con los datos aportados recientemente por Schwartzkopff y cols. [238], en el que muestran cómo los niveles de PICP no están aumentados en suero de pacientes con miocardiopatía dilatada, pero sí los niveles de ICTP, junto a los valores de las MMP-1 y sus inhibidores (TIMP-1). Estos hallazgos sugieren que la degradación del colágeno tipo I jugaría un papel importante en el remodelado tisular extracelular que tiene lugar en patologías como la MCH o la cardiopatía dilatada, contribuyendo a una dilatación del VI [239]. De igual modo, la deposición de colágeno tipo III sería importante en este remodelado como indican diferentes estudios en los que está aumentado [51;122;240], pero que no hemos podido confirmar en nuestros resultados. Así, se puede prever cómo en la fase temprana del remodelado tisular en la MCH, principalmente es el colágeno tipo III el que se acumula, mientras que el colágeno tipo I llega a ser predominante en un corazón más severamente dañado, significativo de que la patología está más avanzada [241;242]. Por tanto, en la primera fase del remodelado, el colágeno tipo I es cada vez más degradado, y luego es reemplazado por colágeno tipo III, mientras que al avanzar la enfermedad habría un cambio en el balance del colágeno, aumentando la deposición de colágeno tipo I. Por tanto, el hecho de que no encontremos diferencias significativas en nuestra población en cuanto a los valores séricos de PIIINP, podría ser debido a que es una población en la que existe ya una marcada fibrosis, por lo que el remodelado puede estar teniendo lugar en el colágeno tipo I. De ahí el hecho que nuestra población presente MCH más avanzada, con media de edad de $45,7 \pm 14,2$ años y que además al observar mediante técnicas de imagen, una fibrosis marcada, confirme una evolución de varios años de la enfermedad. Este

cambio en la proporción relativa de los tipos de colágeno intersticial I y III puede influir en las propiedades físicas del miocardio. Tejidos con predominio de colágeno tipo I se caracterizan por la resistencia y rigidez, mientras que los tejidos que contienen grandes cantidades de colágeno tipo III presentan propiedades más elásticas [243]. En teoría, estos cambios pueden predisponer a una pérdida de miocitos en el ventrículo y remodelado intersticial de la cámara. Habría que señalar, sin embargo, que en nuestro estudio únicamente hemos encontrado que las concentraciones de PINP están más elevadas en pacientes con MCH y grosor severo (≥ 30 mm) y que el lnPINP correlaciona positivamente con él. Para el resto de los parámetros del colágeno medidos no hemos encontrado correlación con volúmenes del ventrículo izquierdo o diámetros en reposo.

Se ha relacionado la asociación de concentraciones elevadas de PIIINP en presencia de pequeños VI como marca anatómica de disfunción diastólica pasiva en MCH [122], siendo una complicación muy común en MCH y uno de los síntomas más determinantes de congestión pulmonar [43;44], pero no se encontraron correlaciones significativas entre los índices de disfunción diastólica y los biomarcadores de colágeno, al analizar los resultados. Sí, en cambio, se confirmó una correlación negativa entre ICTP y el diámetro de la aurícula izquierda, viéndose ésta aumentada en su tamaño a raíz de la propia hipertrofia ventricular izquierda.

Recientemente Lin YH y cols. [244] en un estudio de 21 pacientes con insuficiencia cardíaca, relacionan los niveles de PIIINP con los parámetros de variabilidad del ritmo cardíaco, proponiendo dicho péptido como un potencial marcador sérico para evaluar el control autonómico cardíaco y el riesgo de muerte súbita. Así, la fibrosis de la matriz extracelular cardíaca jugaría un papel importante en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca, pudiendo proporcionar un sustrato para la arritmogenicidad observada en estos pacientes, lo que podría causar episodios de muerte súbita. Éste es uno de los principales motivos de estudio de los pacientes con MCH, ya que existe un alto porcentaje de muerte súbita en pacientes jóvenes con esta patología. En los resultados de este estudio se observa como las concentraciones de PICP asocian de forma significativa con riesgo de MS, sin hallar esta asociación para el PIIINP. Sin embargo, sí hemos visto

un aumento de las concentraciones de PIIINP en pacientes con MCH con historia de síncope recurrente, signo relacionado con la presencia de episodios de arritmogenicidad en los pacientes con MCH y su elevado riesgo de MS [245].

De manera adicional, hemos encontrado una correlación positiva entre el PIIINP con los equivalentes metabólicos (METs) de la prueba de esfuerzo. Sin embargo, creemos que estas asociaciones no son clínicamente muy relevantes, ya que no existen asociaciones entre ninguno de los péptidos del colágeno tipo I o III y factores de riesgo severo de la enfermedad como podría ser la disfunción diastólica evaluado mediante ecocardiografía Doppler con el volumen auricular indexado, los gradientes de obstrucción (GTSVI) o los porcentajes de fibrosis evaluados por RTG, como uno de los principales objetivos del estudio. Por tanto, no hemos sido capaces de observar correlación entre los marcadores de colágeno y los datos observados por CRM como encuentran otros grupos [122;237].

Por otro lado se ha comparado las concentraciones de los péptidos del colágeno entre pacientes con MCH y controles de nuestro grupo. Así, la ratio PICP/ICTP como tasa de evaluación de formación/degradación de colágeno tipo I se encuentra más elevada para nuestros pacientes en comparación con los valores de los controles. De igual modo Chi Young Shim y cols. [246] en un estudio reciente con 36 pacientes, evaluaron los mismos marcadores de fibrosis estudiados en nuestra población, relacionándolos con la disfunción diastólica en reposo y ejercicio en pacientes con MCH. En este ensayo también encuentran una mayor ratio, en este caso, de PINP/ICTP como tasa de evaluación de formación/degradación de colágeno tipo I, y la asocian con aquellos pacientes que presentan disfunción sistólica en reposo, no en aquellos en los que la disfunción diastólica aumenta durante el ejercicio y por tanto proponen esta ratio como un marcador útil para evaluar la disfunción diastólica en MCH como una de sus principales complicaciones.

Varios trabajos del grupo de Díez y cols. han profundizado en el estudio sobre todo del PICP en la MCH [180;181;247]. Así, en un reciente trabajo [232] evaluaron las concentraciones de diferentes péptidos del colágeno en pacientes con MCH y presencia de hipertrofia ventricular mediante RTG y otro grupo de pacientes con un desarrollo temprano de la MCH, sin hipertrofia ventricular asociada ni

presencia de RTG. Así en este grupo de pacientes encuentran aumentadas las concentraciones de PICP, sugiriendo un aumento de la síntesis de colágeno que contribuye a la aparición de los primeros cambios fisiopatológicos que caracterizan a la MCH, mientras que en el grupo con MCH y presencia de hipertrofia ventricular, encuentran aumentada también la ratio PICP/ICTP entre pacientes y controles ($p < 0,001$). Por tanto, estos datos apoyan nuestros propios resultados y los mencionados anteriormente [246], sugiriendo que la síntesis de colágeno excede la degradación en la enfermedad ya establecida. Adicionalmente, esto también podría explicar nuestra falta de resultados claros en los otros péptidos al ser nuestra población de estudio pacientes con MCH desarrollada como corrobora el alto porcentaje de presencia de RTG (72,6%). Por tanto, el incremento de fibrosis miocárdica, como sello de la MCH, podría interpretarse como una respuesta secundaria al remodelado fisiopatológico de esta larga enfermedad y estaría asociado a isquemia, obstrucción y daño microvascular como hemos observado en otros resultados expuestos en este trabajo.

Analizando dicho compendio de estudios en la literatura científica vemos cómo la mayoría de publicaciones tienen una limitación común que es el relativo bajo número de pacientes con MCH incluidos. En ellos vemos datos más significativos en cuanto al estudio de los diversos péptidos del colágeno que en nuestro estudio que ya presentan un mayor tamaño muestral de sujetos bien seleccionados ($n=95$), como es el caso del trabajo de Pekka y cols. ($n=73$), [248]. En este estudio, muestran resultados de estos péptidos y citoquinas relacionadas con la miocardiopatía dilatada en su caso, poco representativos como sucede en nuestra población de estudio. Por tanto de igual modo, podemos concluir en que el metabolismo del colágeno cardiaco está alterado en la MCH y se ve afectado por cambios que no se reflejan claramente en el estudio de los péptidos implicados en el remodelado ventricular izquierdo a nivel sérico. Ya que no se observaron tampoco, correlación alguna entre los niveles de estos péptidos en suero y las imágenes diagnósticas de presencia de fibrosis observadas por RTG mediante CRM en un 72,6% de nuestra población, como sí hemos visto con otros biomarcadores relacionados con MCH en este trabajo.

Un examen microscópico basado en la biopsia endomiocárdica ha sido considerado siempre como la prueba estándar para el diagnóstico de la fibrosis miocárdica. Pero este método diagnóstico requiere un procedimiento invasivo y también existe la limitación que una muestra de tejido parcial de endocardio que se obtiene desde el ventrículo derecho puede no reflejar con precisión la heterogeneidad de la fibrosis en el ventrículo izquierdo [124;249-251].

Debido a la heterogeneidad de la población de estudio y que la MCH es una enfermedad multifactorial, donde interfieren varios mecanismos fisiopatológicos además del remodelado cardíaco, es difícil encontrar asociaciones claras del estudio de los péptidos del colágeno, ya que sólo aparecen asociaciones puntuales con respecto a ciertas variables clínicas y no en todos los péptidos estudiados. Por tanto vemos, que aún es necesario estudiar de manera más profunda y con amplias poblaciones bien seleccionadas para poder determinar la utilidad los diferentes biomarcadores de fibrosis a nivel sérico.

Como conclusión, podríamos proponer el uso de la ratio PICP/ICTP como tasa de evaluación de síntesis-degradación de colágeno tipo I como marcador de recambio (“turnover”) que estime el grado de fibrosis miocárdica con un simple test sérico no invasivo, en los pacientes con MCH avanzada. Pero el hecho de que no existan asociaciones significativas de los diferentes péptidos del colágeno tipo I y III con las principales variables clínicas como disfunción diastólica evaluada mediante ecocardiografía Doppler, los gradientes de obstrucción o los porcentajes de fibrosis por RTG evaluados en la CRM, principales herramientas diagnósticas de la patología, hace que sea éste el aspecto más crítico de su posible utilización clínica como biomarcadores séricos.

5.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitación del presente estudio reside en su diseño puramente de corte transversal. Hemos realizado un análisis sólo de las asociaciones, pero no un estudio longitudinal a largo plazo de seguimiento de nuestros pacientes, el cual probablemente proporcionaría información adicional para corroborar el valor pronóstico de los biomarcadores estudiados para predecir la progresión de la patología. Además, este estudio observacional se basó en una cohorte seleccionada de pacientes remitidos a las consultas especializadas participantes, por lo tanto, está sujeta a sesgos potenciales e interacciones entre las diferentes variables estudiadas. Por lo tanto, las características de la muestra son típicas de los pacientes observados en consultas especializadas de MCH, con un perfil más grave de la enfermedad que el de la población general de pacientes con MCH.

Además, la obstrucción del tracto de salida del VI se ha analizado sólo en condiciones de reposo y no relacionado este dato con la actividad física. Como describieron Maron MS *y cols.* [113] sólo el ejercicio permite la identificación de un perfil más grave de la enfermedad frente al de la población general de pacientes con MCH, en los que sus síntomas de insuficiencia cardíaca progresiva, se explican por una obstrucción inducida por el ejercicio.

VI. CONCLUSIONES

Conclusión 1:

- El aumento de las concentraciones de NT-proBNP en pacientes con MCH, sugiere la existencia de un aumento en la tensión de la pared del ventrículo y una mayor rigidez de la misma debido al depósito de tejido fibrótico. Se ha observado un marcado daño endotelial, como demuestra una media elevada del FvW en el grupo de pacientes. La presencia de necrosis de cardiomiocitos se corrobora, al resultar significativo un discreto aumento de concentraciones de TnThs en los sujetos con MCH. Entre los péptidos del colágeno estudiados, sólo el ICTP está aumentado en pacientes, sugiriendo que la degradación del colágeno tipo I jugaría un papel importante en el remodelado tisular extracelular que tiene lugar en la MCH.

Conclusión 2:

- Se observa una asociación entre los valores séricos de NT-proBNP, FvW, TnThs y GDF-15 con una peor capacidad funcional. Los valores de PCRhs obtenidos, aun encontrando asociación a peor capacidad funcional, sugieren que en la MCH no hay presencia de afección de carácter inflamatorio en su fisiopatología.

Conclusión 3:

- NT-proBNP se ha asociado al grado de fibrosis estimado mediante RTG. La concentración de FvW se ha relacionado con obstrucción y taquicardia ventricular no sostenida, no en cambio con el RTG. Sí se asocia el aumento de TnThs a más fibrosis, además de con disfunción sistólica, por lo que dicho incremento podría reflejar una pérdida continua de miocitos debido a un moderado rango de necrosis. Del grupo de péptidos estudiados del metabolismo del colágeno tipo I y III, no se han observado resultados concluyentes que expliquen un desequilibrio entre el remodelado tisular, destrucción y formación de tejido fibrótico miocárdico.

I. INTRODUCTION

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a myocardial disease caused by genetic changes in genes encoding proteins of the sarcomere. So far, more than 400 mutations have been described in eleven genes located on chromosomes 1, 11, 14 and 15 [1], including mutations of myosin and troponin, or related to them. With an estimated prevalence of 1/500 subjects in an unselected population [2], HCM is considered a common disease with variable penetrance and usually follows an autosomal dominant pattern of heritability [1].

HCM provides cardiac hypertrophy, myocyte disarray and increased interstitial collagen matrix [3], which contribute to the development of a broad spectrum of functional abnormalities, including myocardial ischemia, systolic dysfunction, congestive heart failure, arrhythmias and sudden cardiac death (SCD) [4].

However, the HCM is a disease characterized by the heterogeneity in relation to the morphological changes, functional findings and clinical manifestations. Not all the HCM patients have the same phenotype, differing in the hypertrophic degree, location and SCD risk; hence there is great heterogeneity in genotype-phenotype sarcomeric mutations studied. The development of myocardial hypertrophy usually coincides with the growth phase, and may be seen more florid grades during adolescence and youth [5]. However, many ways of late developments have been described in which the characteristic phenotype is expressed in adulthood [6].

Traditionally it has been considered as one of the main causes of SCD in young patients and athletes [7]. In fact sport practices increase the risk of SCD in patients with HCM. Therefore, attention has focused on the development of pre-screening strategies, being a determinate factor in all prevention strategies, the cost-effectiveness of these [8;9].

Genetics

HCM is inherited as a mendelian autosomal dominant trait and caused by mutations in any 1 of 10 genes, each encoding proteins of the cardiac sarcomere (components of thick or thin filaments with contractile, structural, or regulatory functions)[4;8;46]. The physical similarity of these proteins makes it possible to regard the diverse HCM spectrum as a single disease entity and primary sarcomere disorder. The mechanisms by which disease-causing mutations cause left ventricle hypertrophy (LVH) and the HCM disease state are unresolved, although several hypotheses have been suggested [31]. Three of the HCM-causing mutant genes predominate, namely, β -myosin heavy chain (the first identified), cardiac troponin T, and myosin-binding protein C. The other genes each account for a minority of HCM cases, namely, cardiac troponin I, regulatory and essential myosin light chains, titin, α -tropomyosin, α -actin, and α -myosin heavy chain (Figure 1). This diversity is compounded by intragenic heterogeneity, with more than 150 mutations identified, most of which are missense with a single amino acid residue substituted with another [4;23;31]. Molecular defects responsible for HCM are usually different in unrelated individuals, and many other genes and mutations, each accounting for a small proportion of familial HCM, remain to be identified [46].

Morphological and microscopic characteristics of hypertrophic cardiomyopathy

Macroscopically, HCM is characterized by unexplained left or right ventricular hypertrophy in the absence of an increased external load, which is usually asymmetric in affecting different portions of the ventricles (Figure 2) [61]. Microscopic changes in obstructive HCM include myocyte hypertrophy and disarray, as well as increased interstitial fibrosis and small intramural coronary artery abnormalities (Figure 4) [39;46;51].

Myocyte disarray is a characteristic feature of HCM, seemingly preceding hypertrophy and fibrosis [39;46]. The high degree of disarray observed in obstructive HCM is distinctive [51;52] and involves substantial portions of left ventricle (LV) wall. Fibrosis is another important component of the

pathophysiology of obstructive HCM [51]. Histological examination demonstrates an increase of connective tissue between individual cells and deposition of large amounts of collagen and fibronectin [39]. However, the distribution and severity of fibrosis can be quite variable. For example, fibrosis is greater beneath the endocardium and is more prominent in the interventricular septum area compared to the free LV wall [54]. Abnormalities in small intramural coronary arteries and subendocardial arterioles have also been observed at autopsy in obstructive HCM subjects. The walls of these intramural vessels, especially in the ventricular septum, are thickened and the vessel lumen is frequently narrowed [54;56;57]. There is hypertrophy of the intima and an abnormal ultrastructure of endothelial cells, providing a morphological substrate for functional impairment of the endothelium [58;59]. These abnormal vessels are usually within the areas of fibrous tissue or in close proximity to these areas.

Pathophysiology of hypertrophic cardiomyopathy

The initial defects caused by the mutant proteins are diverse and a common mode of pathogenesis is believed to exist, ultimately converging into impaired cardiac myocyte function [61]. In vitro functional studies have shown that HCM mutants alter sarcomere function in two different ways: first, by decreasing the translocating filament activity and/or force leading to a reduction of power production [62]. Several hypotheses have been proposed, the final model that can explain the hyper- and hypocontractility observed in both previous models is the 'energy compromise' hypothesis (Figure 5) [69]. For example, myosin ATPase uses at least 70% of adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis in the cardiac myocyte, and perturbation of either the motor itself or its regulation may alter the efficiency of ATP usage by the sarcomere [68]. In HCM patients, there is a reduction of the phosphocreatine to ATP ratio, which is an indicator of the energetic state of cardiac muscle. Such inefficient utilization of ATP results in the need for more energy to produce the same amount of force. Thus affecting a highly ATP-dependent process, the sarcoplasmic reticulum calcium pump (SERCA), leading to accumulation of calcium in the cytosol [67;78] (Figure 6).

Diagnosis

Clinical diagnosis of HCM is established most easily and reliably with 2-dimensional echocardiography [39;46] by imaging the hypertrophied but nondilated LV chamber, in the absence of another cardiac or systemic disease (eg, hypertension or aortic stenosis) capable of producing the magnitude of hypertrophy evident [40;46]. Hypertrophic cardiomyopathy may be initially suspected for a positive family history, new symptoms, or abnormal electrocardiogram (ECG) pattern (Figure 7). In clinically diagnosed patients, increased LV wall thicknesses to massive >30 mm and left ventricular outflow tract gradient >30 mmHg (LOVTG) [8;111]. Classical disease markers are weak predictors of functional disability in affected patients. Magnetic resonance imaging (MRI) may be of diagnostic value when echocardiographic studies are technically inadequate or in identifying segmental LVH undetectable by echocardiography (Figure 8), Doppler (Figure 9) and the use of gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance (LGE) (Figure 10), it is possible to improve the evaluation of the presence of myocardial fibrosis in HCM [101].

Clinical Course

HCM is unique among cardiovascular diseases by virtue of its potential for clinical presentation during any phase of life. Some patients progress along certain relatively discrete, adverse pathways: (1) high risk for SCD; (2) congestive symptoms of heart failure with dyspnea and functional disability often associated with chest pain and usually in the presence of preserved LV systolic function [39;83]; and (3) consequences of atrial fibrillation (AF), [116;117] including embolic stroke (Figure 11).

Biomarkers in HCM

Biomarkers are molecules that are objectively (and easily) measured by laboratory techniques, which can give us useful information about normal biological processes, abnormal pathophysiology, and prognosis, as well as in assisting differential diagnosis [61]. The most active fields in cardiovascular

medicine in which biomarkers have shown to be useful are ischaemic heart disease and heart failure. In ischaemic heart disease, for example, multiple biomarkers have helped us to understand the pathophysiology of the atheromatous plaque [61;126]. Such biomarkers have also been used to predict the risk for coronary artery disease and its sequel. For example, B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP (NT-proBNP) are useful in the diagnostic and prognostic pathway for patients with heart failure [202].

The measurement of plasma biomarkers in HCM provides interesting information about abnormal pathophysiology and prognosis [61].

Wall stress markers: natriuretic peptides

Atrial (ANP) and BNP are stable peptides that are synthesized predominantly in the atria and left ventricle, respectively, in response to elevated wall tension. Plasma levels of the peptides correlate positively with cardiac filling pressures, making them excellent markers for the presence of LV dysfunction and abnormal LV wall stress [134;135]. Elevated NT-proBNP levels are associated with incipient LV remodeling and fibrosis assessed by cardiac magnetic resonance, could be used to diagnose insidious unfavourable LV remodeling and higher risk of sudden death in HCM [101;137]. Furthermore, correlates with the classification of the New York Heart Association (NYHA) suggesting worst functional capacity [131] and presence of ventricular obstruction [134]. NT-proBNP levels were subsequently studied in patients with HCM. Thaman et al [131] demonstrated the existence of an inverse relationship between maximal oxygen consumption during exercise and levels of NT-proBNP, and it remains a useful biomarker in the assessment of the severity of the disease to the rest of functional variables such as NYHA functional class, LVOTG or shortening fraction.

Inflammatory biomarkers

Cytokines are pleiotropic proteins that regulate leukocyte activity. In the acute-phase response, cytokines such as interleukin (IL)-1 and IL-6 drive production of reactant proteins, including C-reactive protein. Inflammatory biomarkers that have been most studied in HCM patients are IL-6 and TNF- α

[143;144]. Both can be expressed in the myocardium under various forms of stress and are capable of modulating cardiac function by a variety of mechanisms including the induction of LV hypertrophy, cardiomyopathy, and apoptosis in cardiac myocytes [144;145]. C-reactive protein has also been studied in HCM. For example, Dimitrow et al. [146] showed that C-reactive protein was more elevated in HCM patients than in controls. Lamparter et al studied high sensitive CRP (hsCRP) values in cardiomyopathies, exactly in idiopathic dilated cardiomyopathy in a large cohort [206]. The data obtained showed a higher proportion of patients (41%) with high hsCRP in patients with functional class III versus best functional class status who presented lower values of hsCRP.

Markers of endothelial function

One of the less known characteristic of HCM is the existence of microvascular dysfunction with functional and morphological abnormalities in small intramural coronary arteries and subendocardial arteriola [150]. Functionally, the endothelium-dependent coronary vasodilatation is impaired with an abnormal vasoconstrictor response to acetylcholine [150], cold pressor test and pacing stimulation [153]. In addition, hyperaemic myocardial blood flow as measured by PET scan is severely blunted, with particularly pronounced hypoperfusion at the subendocardial layer, indicative of microvascular dysfunction [211;215]. The morphological substrate underneath the microvascular dysfunction consists of a thickening of the arteriolar wall and its intima with a consequent narrowing of the lumen, and an abnormal ultrastructure of endothelial cells [54;56-59]. These altered vessels are usually within the fibrous tissue or in close proximity to these areas. Microvascular dysfunction might be reflected by elevated levels of circulating biomarkers. In fact, Dimitrow et al. [160] have recently found that some endothelial dysfunction markers were elevated in HCM compared to healthy individuals, suggesting that endothelium in HCM could be functionally abnormal. However, von Willebrand factor (vWF), one of the classic and established endothelial marker of damage/dysfunction [158;159], has recently been analysed in two, but small, studies comparing levels between HCM patients and age- and

gender matched controls. The authors found no statistically significant differences between both groups [160;161].

Myonecrosis markers: troponin

Serum concentration of cardiac troponin T (TnT) is a specific and highly sensitive marker of myocardial injury and its diagnostic and prognostic values have been well established in acute coronary syndromes [168]. On the other hand, patients with idiopathic dilated cardiomyopathy with particularly poor prognosis, show increased serum concentrations of TnT in absence of significant coronary stenoses [220]. In outpatients with stable chronic heart failure (HF) of a non-ischaemic nature, the detection of TnT, even at low levels, means an increased risk of adverse cardiac events, which seems to be independent of other clinical, analytical and ECG variables [166]. These elevated levels of TnT could imply ongoing myocardial damage or leakage of myofibrillar components and reflect the loss of viable cardiac myocytes characteristic of progressive HF [163]. All these studies, based on classical TnT determination methods, reveal strong discrepancies among the number of positive TnT patients, probably due to the heterogeneous detection limit of the used technique and the selected cutoff point. In addition, the haemodynamic state (acute or stable patients) of the TnT determination also adds difficulty to the evaluation of this biomarker in other cardiopathies different from acute coronary syndromes. New developed techniques based on the relevance of the myocardial damage in these patients, such as high sensitive (hsTnT) determination, have been shown to improve the diagnosis in acute coronary syndromes, due to its increased sensitivity for troponin T detection and quantification [61] and could help in the diagnosis of these other pathologies. The role of troponin levels in patients with HCM is not clearly established. However, troponin circulating levels show an association with a significantly lower shortening fraction and thicker interventricular septum [168]. It has also been described that an increased troponin release may be present in patients with HCM secondary to exercise, which is reduced with β -blockade [123]. In HCM, ischemia may occur due to massive heart weight, myocyte disarray or small vessel disease [123]. Severe microvascular dysfunction is a potent long-term predictor of LV

adverse remodeling and systolic dysfunction in HCM [160]. Moreover myocyte injury, coronary microvascular dysfunction, and fibroblast and collagen turnover also play an important role in cardiac remodeling. A continuous extracellular matrix remodeling takes place in HCM [98], undergoing increased interstitial fibrosis, due to raised amounts of collagen type I/III deposition [101]. Regions of myocardial late gadolinium enhancement assessed by cardiac Magnetic Resonance Imaging (MRI) reflect increased myocardial collagen and it has been demonstrated an important association of several clinical variables and risk factors with late gadolinium enhancement in HCM patients [100]. Taking this in account, an increase in hsTnT levels could be used as a biomarker of myocardial remodeling, a proposed prognostic marker in HCM. This could reflect subclinical ongoing myocyte damage in HCM and, consequently, could take influence in functional status.

Growth factors

Growth differentiation factor-15 (GDF-15) is a member of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily. This large family of related proteins can be subdivided into two main groups: the TGF- β /Activin and bone morphogenetic protein and the GDF branches, based on their sequence similarity [172]. These cytokines are involved in a wide variety of tissue differentiation and proliferation processes [173]. Clinical studies have shown that cardiovascular diseases such as ischemia, inflammation, or injury [174] notoriously up-regulate GDF-15 expression in the heart. These pathologic situations could indicate that this factor acts as a stress sign for the cardiomyocytes. Several clinical and experimental reports have provided evidence of a link between GDF-15 and vascular disorders [175;229], additionally, increased levels of GDF-15 were associated with poor prognosis in acute coronary syndrome [175;176] and, more recently in HF [177]. Although it has not been formally demonstrated, these observations suggest that elevated GDF-15 levels identify high-risk patients across a broad spectrum of cardiovascular diseases [178] and that it might display a regulatory role in the process of hypertrophy [179].

Thus, the measurement of biomarkers in HCM seems to provide promising information about myocardial damage and prognosis [61]. In this sense, increasing attention has been arising towards GDF-15 as a marker of multiple stress pathways in myocardium; we therefore hypothesized a change in GDF-15 levels related to HCM disease severity.

Cardiac remodeling and fibrosis biomarkers

The collagen network is a metabolically active structure in the sense that the balance between the synthesis and degradation of collagen determines its turnover, which is estimated to be from 80 to 120 days [187]. Once procollagen types I and III are synthesized and secreted by fibroblasts and myofibroblasts as a triple-helix procollagen precursor containing terminal propeptides. The propeptides are cleaved in block by specific procollagen proteinases. The released molecules reach the bloodstream and can be detected in blood. If the propeptides are cleaved in every molecule of collagen, the amount of theirs quantified in the circulation could be proportional to the amount of collagen formed, these propeptides qualify as indexes of collagen synthesis [187]. This holds true for the carboxyterminal propeptide of procollagen type I (PICP) and likely for the amino-terminal propeptide of procollagen type I (PINP) (Figure 14).

The search for biomarkers of collagen metabolism has provided a large number of candidate molecules can be classified into 2 categories: the biomarkers related to the synthesis of molecules that form new collagen fibers and biomarkers related to degradation of the molecules that comprise mature collagen fibers [187]. Collagen type III is derived from a larger protein, procollagen type III, with two end extensions on both sides of the molecule. Some of the aminoterminal propeptide (PIIINP: N-terminal propeptide of procollagen type III) are released during the synthesis and deposition of collagen type III, and other molecules are retained on the forming part of the collagen fibers. The interstitial matrix metalloproteinases (MMP) initiate digestion of collagen by hydrolysis of the peptide bond after a glycine residue. The procollagen carboxyterminal telopeptide type I (ICTP) is released by the resultant action of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) (Figure 15). There is a relationship between the numbers of molecules of type I collagen

degraded ICTP molecules released. Thus, the amount of ICTP that reaches the circulation would be proportional to the amount of degraded fibrillar collagen [187]. This peptide could associate a marker for collagen degradation or lysis [188].

Therefore, according to the literature [187;193], the evaluation of collagen peptides as potential biomarkers representing a turnover in the HCM, it may report the pathogenesis of myocardial remodeling and HCM.

So, a continuous extracellular matrix turnover appears in HCM, leading to an increase of interstitial fibrosis due to the higher amount of collagen type I/III deposited. The presence of late gadolinium enhancement (LGE), assessed by cardiac magnetic resonance (MRI), seems to reflect an increase in myocardial fibrosis [101;194]. Lin et al. [244], explored the interstitial remodeling, by measuring the serum levels of type III aminoterminal propeptide of procollagen (PIIINP) in HF patients. In this study, PIIINP is proposed as a serum biomarker of cardiac autonomic control and risk of SCD. Interestingly, a recent report by Ho et al. [232], also studied different biomarkers of fibrosis and interstitial remodeling and revealed that serum type I carboxyterminal propeptide of procollagen (PICP) seems to indicate increased myocardial collagen synthesis in sarcomere-mutation carriers without overt disease. They proposed that this profibrotic state precede the development of left ventricular hypertrophy or fibrosis visible on MRI [232]. Fibrosis may provide electrical heterogeneity and a substrate for arrhythmogenicity, which may cause SCD, a feared first symptom that can appear at the onset of both pathologies (HF and HCM) [7;232;244]. Thus, we proposed the evaluation of collagen turnover in HCM, through different serum levels of formation and degradation collagen peptides and their relation with different clinical values of the severity of the disease.

II. AIMS

This study aims to explore biomarkers related to heart disease to help to complement the clinical evaluation of HCM patients, and to correlate with clinical variables of the disease. For that we took into account all the evidence from HCM patients in the Departments of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca of Murcia and Hospital General Universitario of Alicante.

Currently, there is no biomarker that can predict quickly and reliably as possible early development of HCM or used clinically to complement the management, appropriate treatment and prognosis in patients with HCM.

Therefore, based on these assumptions, we suggest an investigation to study the determination of several biomarkers related to the pathways involved in HCM and risk factors of HCM in a study group and a control group, both selected in the mentioned hospitals:

- 1. NT-proBNP, as a biomarker of wall stress.
- 2. hsCRP, as a biomarker of inflammation.
- 3. vWF, as a biomarker of endothelial damage or dysfunction.
- 4. hsTnT, as a biomarker of myocardial necrosis.
- 5. GDF-15, as a biomarker associated with fibrosis and severity of the disease.
- 6. Formation and degradation collagen peptides as biomarkers of fibrosis and tissue remodeling.

In order to work these issues, we will deep in several aspects, relating the biomarkers analyzed with functional class of patients, the risk factors involved in HCM and other complementary tests performed to patients.

Thus, the performance evaluation of different biomarkers, might show differences in HCM patients compared with healthy controls, and also whether these levels are related to the different variables associated with ventricular remodeling in HCM and disease severity. In this context we will explore the possible association with several variables: clinical (age, gender, hypertension, familiar SCD, recurrent syncope, angina, presence of AF, and functional class

(estimated according to the NYHA scale) echocardiographic variables (LV outflow tract obstruction (LOVT), LV wall thickness, left atrial enlargement, and diastolic function), other valuation techniques of cardiac structure and function (abnormal blood pressure response to exercise, non sustained ventricular tachycardia (NSVT) registered in Holter, late gadolinium enhancement (LGE) evaluated by MRI).

In all, the study of these biomarkers raises a possibility of an improvement in the pathophysiological characterization of HCM.

The objectives of this work were:

- 1. Compare the values of the different biomarkers (wall stress, inflammation, endothelial damage, necrosis, fibrosis and tissue remodeling) between HCM patients and a control group with similar characteristics.
- 2. Examine the behavior of the different biomarkers concentrations, classifying patients according to their functional capacity, attending to the NYHA scale groups.
- 3. To study the association of each biomarker to different clinical variables related with demographics and various complementary tests to estimate the severity of the disease.

III. PATIENTS AND METHODS

We included 124 HCM stable patients, attending a cardiology outpatient clinic for routine follow-up, from 2 referral hospitals in Spain (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca from Murcia and Hospital General Universitario from Alicante), 91 (73%) males and aged 47.7 ± 14.2 years old. The diagnosis criteria of HCM was the presence of a left ventricular wall thickness of at least 15 mm without any other cause that could lead to ventricular hypertrophy, and in the case of first-degree relatives of affected individuals, proposed familial criteria were used.

Exclusion criteria were patients with concomitant neoplastic, infectious, connective tissue, demonstrated ischaemic heart disease, anticoagulant treatment or inflammatory diseases. A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram, echocardiography, symptom-limited treadmill exercise test and 24-hour ECG-Holter monitoring. Exercise treadmill test was performed by Bruce's protocol. Maximal exercise was continued until patient exhaustion. MET (metabolic equivalent) units were calculated. Risk factors for sudden death were evaluated (personal and family history of sudden death, recurrent unexplained syncope, maximal wall thickness >30 mm, rest left ventricular outflow tract gradient >30 mmHg, abnormal blood pressure response during effort test, and non-sustained ventricular tachycardia).

Echocardiography Study

The following parameters were measured in the echocardiographic study: LV cavity size, interventricular septal and posterior wall thickness, maximal LV thickness, and ejection fraction were measured in accordance with European Society of Echocardiography recommendations [196]. We defined systolic dysfunction as the value of the ejection fraction below the cutoff point of 50%. Left atrial volume (LAV) was measured from two orthogonal views. LAV was indexed to body surface area. Pulsed-wave Doppler tracings of mitral inflow were obtained by placing a sample volume at the tips of mitral valve from an apical view. A Doppler study was performed too.

Cardiac Magnetic Resonance Imaging study

Cardiac MRI was performed on a 1.5T scanner (Intera; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands). Parallel imaging (SENSE) was used. Cine Magnetic Resonance imaging was obtained in the cardiac short-axis, vertical long-axis and horizontal longaxis planes using a breath-hold balanced fast field-echo sequence. A peripheral bolus injection of gadolinium-DTPA (0.2 mmol/Kg) was administered and late contrastenhanced images were acquired using a segmented inversion-recovery sequence. Gadolinium enhancement images were acquired in

the left ventricular short-axis orientation. A qualitative analysis of the presence of late myocardial enhancement was done. Additionally, we analysed data using validated software (Mass Suite 6.1, MEDIS Medical Imaging Systems, Leiden, Netherlands). Briefly, endocardial and epicardial borders were manually traced in each slice. Secondly, we chose the late enhancement threshold looking at the baseline intensity in the bull's eye graph (a map with different intensity signals in each image of the heart). Then, using this threshold, we looked at all the images checking the Gadolinium enhancement areas. If all of them were included, we accepted this threshold. If some of them were excluded we changed the threshold to make sure it is the correct (Figure 16).

Blood samples and laboratory assays

Venepuncture was performed in the morning on patients and healthy controls who had been fasting for >12 hours. Blood samples were drawn atraumatically. Serum and plasma fractions were obtained by centrifugation for 15 minutes at 3500g. The creatinine clearance (CLcr) was calculated. Aliquots were stored at -80°C to allow batch analysis. Plasma or serum levels were determined for fibrosis markers (collagen derived peptides), endothelial damage (vWF) and growth differentiation factor-15 (GDF-15), using techniques of manual enzyme immunoassay (E.I.A). Also measured by electrochemiluminiscence assays, the myocardial stress markers (NT-proBNP), type I aminoterminal propeptide of procollagen (PINP), and high-sensitive cardiac TnT (hsTnT) on automated analyzers Cobas 6000, Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany). Inflammation (high-sensitive C-reactive protein (hsCRP)) serum levels were measured by immunoturbidimetry on automated analyzers Cobas 6000, Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany). VonWillebrand factor (vWF) plasma levels were measured by ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) commercial kit of Zymutest® Aniara Diagnostica Mason, Ohio USA. GDF-15 plasma levels were assayed by commercial ELISA (Biovendor, Modrice, Czech Republic). Serum levels of PIIINP (N-terminal propeptide of procollagen type III) were measured by radioimmunoassay (Orion Diagnostica® EIA (Espoo, Finland)). The rest of resulting peptides from collagen I synthesis: type I carboxiterminal propeptide of

procollagen (PICP), and degradation C-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP), were measured by commercial ELISA, Metra®CICP EIA of QUIDEL (San Diego, USA) for PICP and Orion Diagnostica® EIA (Espoo, Finland) for ICTP.

The characteristics of the different biomarkers assays are resumed in table 1.

Statistical analysis

Continuous variables were tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. The normal distributed continuous variables are shown as mean \pm standard deviation, and those non-parametrically distributed are shown as median (interquartile range). Categorical variables are presented as frequencies (percentages). Comparisons of the groups for continuous variables were performed with the unpaired t test for independent samples or the Mann-Whitney U test (as appropriate). The comparison of discrete variables was done via the χ^2 test or the Fisher test (as appropriate). Correlation between two continuous variables was performed by Pearson test (if relevant by Spearman test). An ANOVA test (if relevant by Kruskal Wallis test) was performed to assess the relation between biological markers and the number of sudden death risk factors. For that we created the variable called "Risk factors for sudden death." It included those patients without any risk factors associated with sudden death (Group 1), patients with one or two risk factors (Group 2) and patients who had three or more (Group 3). Binary logistic regression analyses were also undertaken with the presence/absence of elevated hs TnT levels as dependent variable (cut-off point ≥ 0.014 ng/ml) and different clinical and biological factors as covariables. A twoside probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were carried out with SPSS version 11.0 software (Chicago, Illinois, USA).

HCM patients were compared to 78 control subjects with similar age and sex.

The Research Ethics Committee of the two centres approved the study. Risk factors for sudden death were evaluated.

Acknowledgements

All recruited subjects gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the Local Research Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, as amended in Edinburgh in 2000. (See annex I and II).

This research was supported by a project funded by FIS PS09/00721 of Instituto de Salud Carlos III, and in part by FEDER funds and by Roche Diagnostics.

Juan Antonio Vilchez Aguilera holds a "Rio Hortega" grant research training funded by the Instituto de Salud Carlos III, aimed at health professionals who have completed specialized training.

IV. RESULTS

Normality test of Kolmogorov-Smirnov of biochemical markers are resumed on table 2. In selected patients, 91 (73%) were male with an age of 47.7 ± 14.2 years. 68 patients (54.8%) had deterioration in functional class (NYHA \geq II), and 6 patients had systolic dysfunction (6.3%). 57 (46%) had angina and 84 patients (67%) showed late gadolinium enhancement (LGE) rated by MRI. Table 3 shows the clinical and demographic characteristics of patients with HCM and control group. Table 4 shows the baseline characteristics of the study population, classifying patients according to the three groups of NYHA. Data are expressed as n (%), mean \pm standard deviation or median (25th and 75th percentiles).

For the first aim, the comparison of biomarkers levels between HCM patients and control groups showed the following results: significant differences between NT-proBNP levels, vWF and hsTnT ($p < 0.001$ in all cases). While we found no difference between the values of hsCRP and GDF-15 ($p = 0.211$ and $p = 0.101$ respectively) (Table 5). In the case of the collagen peptides only the ICTP as a marker of type I collagen degradation, showed statistical significance ($p = 0.041$). Similarly in the resulting ratio between PICP and ICTP also observed significant differences ($p = 0.026$) (Table 6).

For the aim two, the comparing biomarkers levels between the three classified subgroups according to functional class (NYHA), we found significant differences in the increased values of certain biomarkers studied relating to a worse functional class. So, NT-proBNP behave differently in the three groups of NYHA ($p=0.005$) and GDF-15 concentrations increased to worse functional capacity ($p=0.006$), both associated previously to severity of cardiovascular diseases. Similarly, the hsTnT and hsCRP showed significant difference ($p=0.042$ and $p=0.045$ respectively) (Table 7).

For the aim three, assessment of the biomarkers levels and the correlation with clinical variables are showed for each biomarker.

Stress biomarkers: natriuretic peptide study (NT-proBNP)

NT-proBNP associations are showed in table 8. We found increased levels of NT-proBNP (pg/ml) in patients with HCM who had family history of SCD(294 (137-524) vs 100 (18-235) pg/ml, $p<0.001$), in patients with marked fibrosis by LGE (272 (153-523) vs 117 (33-398) pg/ml, $p=0.003$) and in those patients presenting with severe functional class NYHA \geq III, (498 (218-752) vs 106 (19-276) pg/ml, $p<0.001$ (Figures 17 A-C). NT-proBNP showed significant correlations for the percentage of fibrosis assessed by LGE ($r: 0.263$, $p=0.018$) and the value of indexed atrial volume (LAV) ($r: 0.336$, $p=0.008$). The multivariate linear regression analysis showed statistically significance values ($r^2= 0.06$, $p=0.032$), but only 6% of the variability of the biomarker is explained by the model. Thus, as was observed only independent predictor, the presence of fibrosis ($\beta = 0.28$, $p=0.032$) and respect to severe dyspnea \geq III ($\beta = 1.01$, $p=0.067$), with a clear trend.

Inflammation biomarkers study: hsCRP

The hsCRP in a measuring range up to 0.015 mg/dl, showed no association with the main variables studied in HCM (Table 10). Only a significant increase in the hsCRP (mg/dl) levels in patients with HCM and hypertension (0.18 (0.10-0.32) vs. 0.11 (0.07 to 0.21) mg/dl, $p=0.002$), and in patients with a history of AF (0.23 (0.16-0.31) vs. 0.13 (0.07 to 0.24) mg/dl, $p=0.005$ (Figures 20 A-B).

Endothelial damage biomarkers study: vWF

HCM patients showed higher levels of vWf as compared to healthy controls (139.6±64.8 UI/mL vs 105.0± 51.0 UI/mL, p<0.001). In the whole population of the study (controls and HCM patients), there were statistical differences in the levels of vWf between group 0 and group non 0 (116.2±58.6 UI/ml vs 137.3±58.4, p=0.022) but the distribution of ABO blood groups were similar in controls and HCM patients (p=0.411). The clinical characteristics and association with vWF levels in patients with HCM are summarized in Table 12. vWf levels were found raised in patients with severe functional class (168.4± 65.9 UI/mL vs 132.4±60.7 UI/mL, p=0.020), AF (175.8±69.4 UI/mL vs 133.0±59.0 UI/mL, p=0.005), hypertension (161.4±60.8 vs 128.9±60.5, p=0.010) obstruction (153.9±67.9 vs 128.2± 57.4 UI/mL, p=0.046) and non sustained ventricular tachycardia (159.3±59.1 vs 133.0±63.0, p=0.049) (Figure 23 A-E). vWf correlated with age (r:0.26; p=0.006) and obstruction (r:0.22; p=0.021) (Figures 25 A-B). In the multivariate analysis (linear regression), adjusting by age, severe functional class, hypertension, atrial fibrillation, obstruction, ABO blood group and non sustained ventricular tachycardia, the concentration of vWf was associated with the proposed model (r²:0.18; p=0.001). AF (p=0.001), ABO blood group (p=0.018) and non sustained ventricular tachycardia (NSVT) (p=0.041) were the three variables that remained associated with the levels of this biomarker.

Myocardial necrosis biomarkers study: hsTnT

We found increased hsTnT levels (above the cutoff point: 14 pg/mL) in 40 patients (42.1%) and in only two control subjects (4.4%; p< 0 .001). The association with clinical features and hsTnT serum levels in HCM were raised in patients with severe dyspnea: NYHA functional class>3 (p= 0.020), outflow obstruction (p=0.013), systolic dysfunction (p=0 .037), abnormal blood pressure response (p=0.036), and presence of LGE (p=0.021) (Table 14) (Figure 26-27). hsTnT levels correlated positively with the maximum left ventricular wall thickness (r:0.47; p=0.001), left atrial diameter (r: 0.36,p=0.014), and LOVTG (r:0.28; p=0.008) (Table 15). In particular, we found higher hs-TnT levels in patients showing late gadolinium enhancement in the cardiac MRI study (13 [9-23]

pg/mL) compared with patients without enhancement (9 [4-13] pg/mL; $p=0.045$), these levels being even lower in control subjects (5 [4-6] pg/mL; $p=0.013$). Figure 28 displays the difference between serum hsTnT levels between patients presenting fibrosis in the MRI, patients without fibrosis, and control subjects. Univariate logistic regression analyses of the data (Table 16) corroborated the interesting and strong association between elevated hsTnT levels and the presence of fibrosis in cardiac MRI study (odds ratio [OR] 3.24 [95% confidence interval (CI) 1.16-9.04]; $p=0.025$).

Growth factors study: GDF-15

Although differences were not significant between class I and II ($p=0.28$), GDF-15 levels were clearly increased in impaired functional class patients (NYHA class \geq II) compared to NYHA I ($p=0.037$), and more strongly increased in NYHA class III ($p=0.002$) (Table 17). Figure 29 represents GDF-15 levels assessed in the three different functional classes of HCM, confirming a clear increased level in NYHA class III patients, compared to the other subgroups. The difference between those three groups was remarkably significant ($p=0.006$). The presence of comorbidities such as hypertension, dyspnea, and AF also increased GDF-15 levels ($p=0.001$, $p=0.020$ and $p=0.012$, respectively) (Table 18) (Figure 30-31). Significant correlations between GDF-15 levels and proposed biomarkers of ventricular remodeling were found, NT-proBNP ($r: 0.28$, $p=0.049$), or hsTnT ($r: 0.30$; $p=0.003$), and endothelial dysfunction as vWF ($r: 0.33$, $p=0.001$) (Table 19) (Figure 33-34). Moreover, GDF-15 levels were also found significantly correlated with age ($r: 0.48$, $p\leq 0.001$), as well as a negative correlation with exercise capacity measured in METs ($r: -0.45$, $p<0.001$) (Table 19). Bivariate analysis showed that GDF-15 levels were more likely related to age, dyspnea, AF and METs. Table 20 summarize the results of multivariate analysis model ($p<0.001$) that showed worse functional class (NYHA III), hypertension or obstruction (all $p<0.005$) and NSVT ($p=0.006$) significantly influencing GDF-15 levels. We finally compared GDF-15 and other biomarker plasma levels in NYHA III patients with and without symptoms of NSVT (Figure 34). While the common biomarkers did not show a

significant increase with NSVT, highest GDF-15 levels were observed in patients with NSVT ($p=0.001$) although NT-proBNP also showed a clear trend ($p=0.066$).

Cardiac remodeling and fibrosis biomarkers

Patients presented higher levels of ICTP than controls and higher levels of the ratio PICP/ICTP (Table 6). PICP levels were raised in HCM patients without hypertension (107.6 ± 32.2 vs. 130.6 ± 60.6 ng/mL; $p < 0.021$) and in those with history of familiar SCD (144.7 ± 71.8 vs. 118.3 ± 47.5 ng/mL; $p < 0.047$). PINP levels were increased in patients with severe maximal left ventricular wall thickness [$112.7(82.1-143.3)$ vs. $26.7(24.0-36.4)$ ng/mL; $p < 0.001$]. PIIINP levels were raised in patients with history of recurrent syncope [$4.96(3.60-6.50)$ vs. $3.55(2.80-4.31)$ mg/L; $p < 0.007$] (Table 21 A-B) (Figures 35-38). We did not find any significant association with NSVT, abnormal blood pressure response to effort test, severe functional class, AF, significant obstruction, or LGE observed in MRI. PICP ($r = -0.27$; $p < 0.009$) and PINP ($r = 0.55$; $p < 0.001$) correlated with age. PINP correlated with maximal left ventricular wall thickness ($r = 0.77$; $p < 0.001$). ICTP correlated with left atrial diameter ($r = -0.237$; $p < 0.023$). PIIINP correlated with effort capacity in metabolic equivalent units (Table 22).

Risk factors for sudden death

Figure 41 shows the distribution of patients according to risk factors presented and the biomarkers processed. But this study has not shown a clear data, except for hsTnT levels, whose comparison with risk factors was statistically significant between the groups created.

V. DISCUSSION

Stress biomarkers: natriuretic peptide study (NT-proBNP)

It has been demonstrated the presence of severe cardiac dysfunction and poor functional class according to NYHA and a higher plasma BNP levels, in patients with HCM or dilated cardiomyopathy. Similarly, in HCM has been related higher BNP levels and severity of symptoms associated with the HF produced. These symptoms are usually associated with a prevalent diastolic dysfunction, although with systolic dysfunction too with a lower LV, lower wall hypertrophy and expansion of the cavity by 10% -15% of the cases. This development usually occurs during middle age, and with SCD, represents the leading cause of death in these patients [8;85;200]. These data are consistent with the concentrations found in our population of patients with HCM who had an increase in the NT-proBNP levels and a functional class with severe dyspnea (NYHA \geq III) (498 (218-752) vs 106 (19-276) pg/mL, $p < 0.001$). Besides it is corroborated with a progressively increasing levels between the three NYJA groups ($p=0.005$) (figure 19). This behaviour of NT-proBNP levels has been similar presented in the recent study by Coats CJ et al. [201] showing a significant difference in NT-proBNP across NYHA classes. Thaman R. et al [131] support the theory that the release of NT-proBNP in ventricular myocytes is caused in a response to increased wall thickening of the LV. Mutlu B. et al [203] demonstrated the determination of the NT-proBNP levels, may predict the clinical course of patients with HCM. Patients presenting baseline levels of NT-proBNP ≥ 1500 pg/ml, showed increased risk of clinical deterioration and worsening symptoms of HF at 2 years away. Therefore, they proposed a stratification of HCM patients dividing in low, medium and high risk subgroups, using two simple variables, the NYHA functional class and the NT-proBNP levels. In our study, we has no shown statistically significant increase of NT-proBNP values according to the presence of a greater number of SCD risk factors and only acted as an independent predictor associated with the percentage of fibrosis.

But the best approximation in the relation of NT-proBNP levels to prognosis is presented in the recent study of Coats CJ et al. [201] showing how NT-proBNP

was a significant predictor of HF and transplant-related deaths but not SCD or appropriate shock from an implantable cardioverter defibrillator, in patients with HCM. This suggests that raised NT-proBNP might identify patients who would benefit from pharmacological strategies to prevent progressive left ventricular dysfunction before the onset of clinically apparent HF [201].

Thus it is confirmed that the NT-proBNP values are positively correlated with the severity of hypertrophy, as well as other studies reported [101;131] and that NT-proBNP is a biomarker of disease progression in HCM associated to worse functional capacity. Therefore, we might suggest that serial assessment of this biomarker could provide a noninvasive nearing of hemodynamic deterioration, fibrosis and severity of HCM.

Inflammation biomarkers study: hsCRP

The hsCRP is a very sensitive indicator of processes involving by inflammation. It has been shown to be an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with coronary artery disease [142;204;205]. These studies provided evidence that elevated hsCRP values indicated the presence of clinically important inflammatory diseases, and hsCRP behaved as a independently predictive biomarker of cardiovascular events in these patients.

Lamparter S. et al. were the first to study the hsCRP values in cardiomyopathies, exactly in idiopathic dilated cardiomyopathy in a cohort of 198 patients [206]. The data obtained showed a higher proportion of patients (41%) with high hsCRP, associated with functional class III patients versus a 25% with better functional class status and lower values of hsCRP ($p < 0.005$). Our results, has no shown similar data compared to those studies. Presenting a cohort of 95 patients, it has not been seen differences among hsCRP values in patients and their controls. Only a change was observed in the association with higher levels in patients with worse functional class (figure 22) and also we found significant data in patients with hypertension and a history of AF that could be attributed to inflammatory and atherosclerotic role of these covariates.

The most significant limitations in the study of the serum hsCRP levels, relate in the fact that those levels are a non specific reflect of a broad range of pathologic processes, including local or systemic inflammation, any kind of trauma, tissue injury or infection. Therefore, hsCRP levels cannot be interpreted without a complete medical history and physical examination [206]. It also adds that hsCRP values may vary markedly from day to day, so it would be convenient a kinetic study.

Endothelial damage biomarkers study: vWF

Endothelial dysfunction is a common finding in HCM patients and its extent has demonstrated prognostic implications [211]. Plasma levels of vWF are raised in different states of endothelial damage and have therefore been proposed as useful markers of endothelial damage/dysfunction [158;159]. In this study, we have observed how HCM patients present significantly raised plasma levels of vWf and also are associated with different conditions related to the severity of the disease. However, in two previous studies no statistically significant differences in vWf levels have been found between HCM patients and age and gender matched controls [160;161]. Both studies included only small cohorts of patients, and this fact could have limited their results. Increase in vWf plasma concentration has been identified in different entities such as hypertension, atherosclerosis, diabetes mellitus and AF [212]. They are associated with higher cardiovascular risk and worse outcomes [212;213]. Our results, has shown that HCM patients with AF have also higher levels of vWf. Although raised vWf levels in our cohort were also related with different comorbidities, as hypertension or AF, we demonstrated that endothelial damage/dysfunction is independently found in HCM. Moreover, the levels of vWf were related to different conditions linked to disease severity, which are severe functional class, obstruction and importantly, NSVT. We have shown that HCM patients with high LVOTG and obstruction have higher vWf levels compared with patients without them. But, our data has not shown a significant association between vWf and fibrosis, assessed by LGE.

The precise mechanisms of endothelial dysfunction in HCM are unknown. It is possible that a thickened ventricle could generate extravascular compressive

forces that play a role in the microvascular dysfunction seen in HCM [215]. The existence of microvascular dysfunction could get involved in the pathogenesis of the hypertrophy observed in HCM patients. It has been shown that endothelial dysfunction leads to the increased production of a potent vasoconstrictor mediator produced by vascular endothelial cells such as endothelin-1 [217].

Myocardial necrosis biomarkers study: hsTnT

This study showed that hs-TnT serum levels were elevated in up to 42% of our cohort of patients with HCM, and in only 4.4% of healthy paired control subjects. This elevation may reflect a continuous myocyte loss due to a moderate range of necrosis, and it is associated with parameters of HCM severity as the functional class, systolic dysfunction, and fibrosis assessed by cardiac MRI. So, we have observed in this study, how hs-TnT could be an important biomarker in HCM, reporting the presence of myocardial damage in these patients. Troponins I and T are very sensitive and specific indicators of cardiac myocyte injury, and they have been shown to be independent prognostic predictors in acute coronary syndromes [168]. In patients with acute decompensated HF, a positive cardiac troponin test is associated with higher in-hospital mortality, independently of other predictive variables [165]. In outpatients with stable chronic HF of a nonischemic nature, the detection of TnT, even at low levels, means an increased risk of adverse cardiac events, which seems to be independent of other clinical, analytical, and ECG variables [166]. Omland et al. [167] describes a low but detectable increase in hs-TnT circulating levels in stable coronary artery disease patients by using the same methods described in the present study. Those authors presented hs-TnT elevation in patients with stable coronary artery disease and its association with the incidence of cardiovascular death and HF. In our study, we have shown that HCM patients also presented higher hs-TnT levels than control subjects, but, as expected, this increase was relatively low if than those observed in acute coronary processes. In earlier studies based on chronic stable patients, only <10% of patients showed elevated TnT when determined with classic methods [166]. Another study including 60 patients with dilated cardiomyopathy showed up to 28.3% of TnT-positive patients in samples taken in an acute or subacute moment

[220]. Pop et al [221] showed that troponin released above normal values may be present in patients with HCM without overt coronary heart disease. Sato et al [168] demonstrated that HCM patients with increased serum TnT concentrations had a decrease in LV fractional shortening and ventricular septal thickness on echocardiogram during follow-up, and they suggested TnT as an indicator of subclinical myocyte injury and/or progression to dilated HCM. They found 50% TnT-positive patients in a small sample of 30 HCM patients, supporting our results [168]. Furthermore, we have shown that hs-TnT levels are associated with severity parameters in a cohort of HCM patients, but longitudinal studies are necessary to determine whether hsTnT levels can be a reliable predictive biomarker in prognosis.

Recently, LAV has been proposed as a good index of diastolic function. Left atrial size has become a valuable tool in the diagnosis of HF with preserved ejection fraction. In HCM, left atrial remodeling has been shown to be associated with greater LV hypertrophy, more diastolic dysfunction, higher filling pressures, worse functional class, and higher risk of atrial arrhythmias [222]. We found a strong correlation between TnT levels with the left atrial diameter, but we were unable to find a significant correlation with LAV. The pathologic changes observed in cardiac myocytes and fibroblasts are important components of cardiac remodeling. Besides myocyte injury and apoptosis, fibroblasts and collagen turnover also play important roles in myocardial remodeling [222]. Coronary microvascular dysfunction, severe hypertrophy, and myocyte disarray are associated with an unfavorable outcome in patients with HCM [117]. The microvascular dysfunction is a possible cause of elevated TnT levels. Therefore, those data support those obtained in the present study. The association between TnT concentration and fibrosis presence has been previously observed in idiopathic dilated cardiomyopathy and secondary cardiomyopathy groups, where a subgroup of patients with raised concentrations of serum collagen and TnT showed poor short-term prognosis. In line with the findings of the present study, something similar occurs in HCM patients, which would explain the association of hs-TnT levels with the degree of fibrosis assessed by MRI and LV systolic dysfunction.

Growth factors study: GDF-15

Recent studies have evaluated the association between GDF-15 levels and several cardiovascular pathologies, denoting a link with severity disease and even more, suggesting it as a new prognostic biomarker in HF [224]. HCM is associated with a decreased functional status; hence it was pertinent to compare GDF-15 levels and other severity factors in the three well-defined NYHA groups. As indicated by other reports [225], long-standing hypertension may be the most common secondary cause of hypertrophy. This condition additionally deteriorates functional status in younger individuals whereas in the older patients NYHA class, the difference between HCM with hypertension and HCM narrows and becomes insignificant [227].

In the present study, elevated GDF-15 levels are indeed associated with severe disease features in HCM patients, such as increased age, severe NYHA functional class (NYHA \geq II), comorbidities and poor outcomes predictors (hypertension, dyspnea or AF), limited exercise capacity and a mild reduction in CLcr. In line with the present results, Eggers et al. also reported that concentrations of GDF-15 were higher in different comorbidities such as hypertension or diabetes [229]. In addition, the multivariate analysis shows that GDF-15 levels are related to hypertension ($p<0.001$) and NSVT ($p=0.006$). As both comorbidities irremediably aggravate remodeling and hypertrophy, GDF-15 levels might reflect pathophysiological changes that occurs in left ventricular remodeling. NSVT has been proven to be a strong determinant of progressive HF and death in young patients with HCM; however in patients over 40 years old, NSVT is more related to a progressive myocyte loss and fibrosis [229]. The current cohort presents individuals aged of 47.1 years old, hence, the increase of GDF-15 levels and incidence of ventricular arrhythmia probably reflects worse functional status. On the other hand, according to the previous commentaries, greater biomarker influences in the multivariate analysis would have been expected for the GDF-15 levels, which would have denoted severe heart damage. In accordance, the present data show only significantly increased levels in evolved pathological conditions and advanced functional class. NYHA I class patients, without a severe profile of the disease, present lower and moderate GDF-15 levels (table 17), and thus these

levels do not seem to be involved in HCM disease. Nonetheless, the fact that GDF-15 levels are not increased in stable patients (class I) confers a stronger power as a biomarker of changing status, since the cytokine would be only highly increased in worse functional class (figure 29), which is useful to deduce myocardium depth damage. Indeed, GDF-15 levels of class II were slightly raised but notoriously increased in class III compared to functional class I patients (figure 29), corroborating the present assumption. In the same line, an interesting report found that GDF-15 levels predicts noncardiovascular death in older patients alone or in combination of NT-proBNP [234], although different ages studies, the predictive value of this biomarker in younger populations requires further investigation.

Cardiac remodeling and fibrosis biomarkers

There are few studies investigating the role of collagen peptides in HCM. Lombardi et al. [122] also showed that collagen turnover was enhanced in HCM, presenting increased concentrations of PIIINP and ICTP compared to healthy controls. Also defended that collagen I synthesis prevails over degradation and correlated a passive dysfunction in HCM patients, as seen in other studies [123]. Data presented by Ho et al. showed elevated levels of PICP in HCM patients without overt disease, reflecting an increased myocardial collagen synthesis on the early disease [232]. We did not find that relation in our study population with developed HCM (72.6% of them presented fibrosis), however, we were able to find a higher ratio PICP/ICTP in patients compared to controls as Ho et al. and previous studies [232;246]. We propose the use of the ratio PICP/ICTP as a synthesis-degradation marker of type I collagen turnover, to estimate the degree of interstitial fibrosis with a simple serum test in HCM. Moreover, HCM can lead to SCD, mainly due to ventricular tachycardia and it is known that HCM is the most common cause of SCD in young competitive athletes [9]. We found higher PIIINP levels in patients with recurrent syncope and higher PICP levels in patients with familiar history of SCD. These data suggest a collagen remodeling involvement in the development of HF and SCD in our patients, as described by Lin et al. [244]. The fact that we only found occasional associations of different peptides of collagen type I/III with

clinical values and not with diastolic dysfunction assessed by Doppler echocardiography, the gradients of obstruction or the percentage of fibrosis assessed on MRI, highlights the need of deeper studies in order to establish their potential clinical use as biomarkers on HCM.

LIMITATIONS

The principal limitation of the present study lies in its purely cross-sectional design. We could perform only association analyses, but long-term follow-up of our patients would likely provide additional information to corroborate the proposed value of hs-TnT for predicting progression to poor clinical states. In addition, this observational study was based on an selected patient cohort referred to the specialized participating clinics; therefore, it is subject to potential biases and interactions among the different variables studied. Thus, the sample characteristics were typical of those seen in specialized HCM clinics, with a more severe profile of the disease than that of the overall population of HCM patients. In addition, obstruction to left ventricular outflow has been only analyzed under resting conditions and not related to physical activity. As was described by Maron et al. [113] only exercise permitted the identification of a more severe profile of the disease than that of the overall population of HCM patients, in whom progressive HF symptoms are explained by latent exercise-induced obstruction.

VI. CONCLUSIONS

Conclusion 1:

- Increased concentrations of NT-proBNP, suggest the existence of an increased wall tension and increased ventricular stiffness due to deposition of fibrotic tissue, in HCM patients. A marked endothelial damage has been observed, as evidenced elevated vWF levels in patients. The presence of a cardiomyocyte necrosis is confirmed in the slight but significant increase of hsTnT levels in HCM subjects. Among the studied collagen peptides, only the ICTP was increased in patients, suggesting that type I collagen degradation may play a role in extracellular tissue remodeling that takes place in the HCM.

Conclusion 2:

- There is an association between serum levels of NT-proBNP, vWF, hsTnT and GDF-15, with worse functional class. The hsCRP values obtained even were associated with worse functional capacity, not suggested the presence of an inflammatory condition in the HCM pathophysiology.

Conclusion 3:

- NT-proBNP was associated with the fibrosis degree estimated by LGE. vWF levels has been linked to obstruction and non-sustained ventricular tachycardia, whereas not with the LGE. Higher values of hsTnT was clearly related to an increased fibrosis in addition to systolic dysfunction, therefore this increase may reflect a continuous myocyte loss due to a moderate range of necrosis. In the group of collagen peptides studied of collagen type I and III metabolism, have been inconclusive results that could explain an imbalance between tissue remodeling, destruction and formation of myocardial fibrotic tissue.

ANEXO I

Modelo de consentimiento informado de los pacientes con MCH del estudio:

12- 1-10:12:53 ; U. T. A. I. Y C. E. I. C : 958369438 # 1 / 1

Servicio Murciano de Salud

Arrixaca
Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca"
Ctra. Madrid - Cartagena • Telf. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. Juan Salinas Ramos
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca del que es Director Gerente el Dr. Manuel Alcaraz Quiñonero

CERTIFICA

1º. Que ha evaluado la propuesta del investigador principal **Dr. Francisco Marín Ortuño** referida al proyecto:

Título: Miocardiopatía hipertrófica y remodelado tisular. Papel de los biomarcadores.

2º. Considera que

- El proyecto que se plantea siguiendo las normas éticas y legales nacional e internacionalmente aceptadas.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad de la memoria en relación con los objetivos del proyecto y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador **Dr. Francisco Marín Ortuño** y sus colaboradores; las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el proyecto.

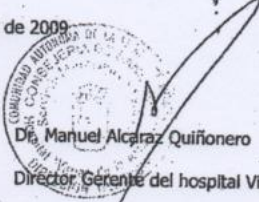
Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Murcia, 24 de abril de 2009

Fdo:

Dr. D. Juan Salinas Ramos
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

Dr. Manuel Alcaraz Quiñonero
Director Gerente del hospital Virgen de la arrixaca



ANEXO II

Carta emitida por el Comité ético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca aprobando el estudio. (Ver al final).

ANEXO III

Comunicaciones a congresos y artículos publicados a raíz del desarrollo de este trabajo de investigación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

CONGRESO: V CONGRESO NACIONAL DE LABORATORIO CLÍNICO. MÁLAGA 9-11 de Noviembre de 2011.

Autores: J.A. Vílchez Aguilera, D. Hernández Romero, F. Ruiz Espejo, E. Jover, A. García Honrubia, E. Orenes Piñero, M. Valdés, P. Martínez Hernández, F. Marín Ortuño

Título: COMPORTAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS DEL COLÁGENO EN EL REMODELADO MIOCÁRDICO DE PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).
Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

CONGRESO: IV CONGRESO NACIONAL DE LABORATORIO CLÍNICO. ZARAGOZA 2010.

Autores: Vílchez Aguilera, JA¹; Cambronero, F²; Ruiz-Espejo, F¹; Casas Pina, T¹; Hernández Romero, D²; García Honrubia, A³; Roldan, V⁴; Climent Payá, V³; Valdés, M²; Martínez Hernández, P¹; Marín Ortuño, F².

Título: EL FACTOR VON WILLEBRAND COMO MARCADOR DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.

1. Servicio de Análisis Clínico. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).
2. Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).
3. Servicio de Cardiología. Hospital General de Alicante.
4. Hospital Morales Meseguer (Murcia).

**CONGRESO: CONGRESO DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (SEC).
VALENCIA 2010.**

Autores: M^a Victoria Moreno Flores, Eva Jover García, Diana Hernández Romero, **Juan Antonio Vílchez Aguilera**, Antonio García Honrubia, Vicente Climent Payá, Mariano Valdés Chávarri, Francisco Marín.

Título: CONCENTRACIÓN SÉRICA DE TROPONINA T ULTRASENSIBLE. UN NUEVO BIOMARCADOR DE REMODELADO CAARDIACO EN MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hospital General Universitario, Alicante y Hospital General Universitario de Elche, Elche (Alicante).

Autores: Eva Jover García, Diana Hernández Romero, Antonio García Honrubia, **Juan Antonio Vílchez Aguilera**, Gonzalo de la Morena Valenzuela, Vicente Climent Payá, Mariano Valdés Chávarri, Francisco Marín.

Título: FACTOR DE DIFERENCIACIÓN DEL CRECIMIENTO-15 (GDF-15), UN NUEVO BIOMARCADOR DE SEVERIDAD EN MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.

Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hospital General Universitario, Alicante y Hospital General Universitario de Elche, Elche (Alicante).

**CONGRESO: CONGRESO DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (SEC).
BARCELONA 2009.**

Autores: Francisco J. Cambroneró Sánchez, Francisco Ruiz Espejo, **Juan Antonio Vílchez Aguilera**, Antonio García Honrubia, Vicente Climent Payá, M^aVictoria Moreno Flores, Mariano Valdés Chávarri, Francisco Marín Ortuño.

Título: LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA SE ASOCIA A UNA ENFERMEDAD MÁS SEVERA

Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar (Murcia) y Hospital General Universitario, Alicante.

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

2011

CONGRESS: IFCC-WORLDBLAB AND EUROMEDLAB, BERLIN 2011.

Authors: JA. Vílchez¹, D. Hernández-Romero², F. Ruiz-Espejo¹, E. Jover², T. Casas Pina¹, E. Orenes-Piñero², M. Valdés², P. Martínez-Hernández¹ and F. Marín Ortuño².

Title: EVALUATION OF COLLAGEN PEPTIDES ON THE MYOCARDIAL TURNOVER IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

(1) Clinical Analysis Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

(2) Cardiology Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

ESC CONGRESS: EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. STOCKHOLM 2010.

Authors: D. Hernández-Romero, E. Jover, **J.A. Vilchez**, A. Garcia-Honrubia, B. Bonacasa, G. De La Morena, V. Climent, P. Martínez, M. Valdes, F. Marin

Title: GROWTH-DIFFERENTIATION FACTOR-15, A NOVEL BIOMARKER OF SEVERITY DISEASE IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY.

(Murcia and Alicante, ES)

Authors: D. Hernández-Romero, **J.A. Vilchez**, V. Moreno, A. Garcia-Honrubia, F. Cambroner, T. Casas, P. Martínez, V. Climent, M. Valdes, F. Marin **Title: SERUM LEVELS OF HIGH SENSITIVE TROPONIN T. A NOVEL MARKER FOR CARDIAC REMODELING IN HYPERTROPHIC CARDIOMIOPATHY.**

(Murcia and Alicante, ES)

2009

ESC CONGRESS: EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. BARCELONA 2009.

Authors: F. Cambroner, F. Ruiz-Espejo, **J.A. Vílchez**, A. García-Honrubia, V. Roldan, D. Hernandez-Romero, G. De La Morena, V. Climent, M. Valdes, F. Marin Ortuño **Title: ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY IS RELATED TO MORE SEVERE DISEASE.**

(Murcia and Alicante, ES)

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES**2012**

Authors: Silvia Montoro-García¹, Diana Hernández-Romero¹, Eva Jover¹, Antonio García-Honrubia², **Juan Antonio Vilchez**³, Teresa Casas³, Pedro Martínez³, Vicente Climent², Luis Caballero², Mariano Valdés¹, Francisco Marín¹.

Title: GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-15, A NOVEL BIOMARKER RELATED WITH DISEASE SEVERITY IN PATIENTS WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY.

1. Department of Cardiology. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

2. Department of Cardiology. Hospital General de Alicante.

3. Department of Clinical Analysis. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

REF. REVISTA/LIBRO: Eur J Intern Med. 2012 Mar;23(2):169-74. Epub 2011 Sep 15.

2011

Authors: **Juan Antonio Vilchez**¹, Diana Hernández-Romero², Francisco Ruiz-Espejo¹, Antonio Garcia-Honrubia³, Mariano Valdés², Pedro Martínez-Hernández¹ and Francisco Marín².

Title: COLLAGEN PEPTIDES, INTERSTITIAL REMODELING AND SUDDEN CARDIAC DEATH IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

1 Clinical Analysis Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

2 Cardiology Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, University of Murcia, Spain

3 Cardiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

REF. REVISTA/LIBRO: Clin Chem Lab Med. 2011 Sep;49(9):1569-71. Epub 2011 Jun 13.

2010

Authors: Victoria Moreno¹, Diana Hernández-Romero¹, **Juan Antonio Vilchez**², Antonio García-Honrubia³, Francisco Cambroner¹, Teresa Casas², Pedro Martínez², Vicente Climent³, Mariano Valdés¹, Francisco Marín¹.

Title: SERUM LEVELS OF HIGH SENSITIVE TROPONIN T. A NOVEL MARKER FOR CARDIAC REMODELING IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY.

1. Department of Cardiology. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

2. Department of Clinical Analysis. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

3. Department of Cardiology. Hospital General de Alicante.

REF. REVISTA/LIBRO: Journal of Cardiac Failure. 2010 Dec;16(12):950-6.

Authors: Francisco Cambroner¹, **Juan Antonio Vilchez**², Antonio García-Honrubia³, Francisco Ruiz-Espejo², Victoria Moreno¹, Diana Hernández-Romero¹, Bárbara Bonacasa¹, Rocío González-Conejero⁴, Gonzalo de la Morena¹, Pedro Martínez², Vicente Climent³, Mariano Valdés¹, Francisco Marín¹.

Title: PLASMA LEVELS OF VON WILLEBRAND FACTOR ARE INCREASED IN PATIENTS WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY.

1. Department of Cardiology. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

2. Department of Clinical Analysis. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.

3. Department of Cardiology. Hospital General de Alicante.

4. Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia.

REF. REVISTA/LIBRO: Thrombosis Research. 126(1): 46-50. Epub 2010 Feb 13.

NOTA: Artículos completos adjuntos al final.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

1. Seidman JG, Seidman C: The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001;104:557-567.
2. Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T: Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1997;16:379-382.
3. Mizuno R, Fujimoto S, Yamaji K, Yutani C, Hashimoto T, Nakamura S: Myocardial ultrasonic tissue characterization for estimating histological abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy: comparison with endomyocardial biopsy findings. *Cardiology* 2001;96:16-23.
4. Marian AJ, Roberts R: Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92:1336-1347.
5. Maron BJ, Piccininno M, Casey SA, Bernabo P, Spirito P: Relation of extreme left ventricular hypertrophy to age in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2003;91:626-628.
6. Gowda RM, Konka S, Khan IA: Hour-glass left ventricle:Midventricular hypertrophy and apical aneurysm in elderly hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Geriatr Cardiol* 2002;11:270-271.
7. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO: Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA* 1996;276:199-204.
8. Elliott P, McKenna WJ: Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004;363:1881-1891.
9. Stroumpoulis KI, Pantazopoulos IN, Xanthos TT: Hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *World J Cardiol* 2010;2:289-298.
10. Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R: Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92:1808-1812.
11. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M: Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-2232.
12. Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994;77:701-712.

13. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A: Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:411-417.
14. Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG, Seidman CE: Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2002;109:357-362.
15. Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van d, V, Furst DO, Vornwald A, von HE, Nurnberg P, Scheffold T, Dietz R, Osterziel KJ: Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;107:1390-1395.
16. Roberts R: A perspective: the new millennium dawns on a new paradigm for cardiology--molecular genetics. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:661-667.
17. Frey N, Luedde M, Katus HA: Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2012;9:91-100.
18. Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ: The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997;336:775-785.
19. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM: Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 1993;261:50-58.
20. Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruaud C, Gary F, Labeit S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagege AA, Trent RJ, Komajda M, Fiszman M, Schwartz K: Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1997;80:427-434.
21. Fujita H, Sugiura S, Momomura S, Omata M, Sugi H, Sutoh K: Characterization of mutant myosins of *Dictyostelium discoideum* equivalent to human familial hypertrophic cardiomyopathy mutants. Molecular force level of mutant myosins may have a prognostic implication. *J Clin Invest* 1997;99:1010-1015.
22. Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L, Sweeney HL: Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1995;95:1409-1414.
23. Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG: Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992;326:1108-1114.
24. Fananapazir L, Epstein ND: Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations. *Circulation* 1994;89:22-32.
25. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, Watkins H: Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:549-555.

26. Anan R, Shono H, Kisanuki A, Arima S, Nakao S, Tanaka H: Patients with familial hypertrophic cardiomyopathy caused by a Phe110Ile missense mutation in the cardiac troponin T gene have variable cardiac morphologies and a favorable prognosis. *Circulation* 1998;98:391-397.
27. Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ: Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:201-211.
28. Jacoby D, McKenna WJ: Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2012;33:296-304.
29. Brugada R, Kelsey W, Lechin M, Zhao G, Yu QT, Zoghbi W, Quinones M, Elstein E, Omran A, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R, Marian AJ: Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig Med* 1997;45:542-551.
30. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH: AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998;32:825-830.
31. Marian AJ: Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2000;355:58-60.
32. Orenes-Pinero E, Hernandez-Romero D, Jover E, Valdes M, Lip GY, Marin F: Impact of polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12:521-530.
33. Blauwet LA, Ackerman MJ, Edwards WD, Riehle DL, Ommen SR: Myocardial fibrosis in patients with symptomatic obstructive hypertrophic cardiomyopathy: correlation with echocardiographic measurements, sarcomeric genotypes, and pro-left ventricular hypertrophy polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Pathol* 2009;18:262-268.
34. Patel R, Lim DS, Reddy D, Nagueh SF, Lutucuta S, Sole MJ, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R, Marian AJ: Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2369-2377.
35. Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schroder D, Klues HG, Hanrath P, McKenna WJ: Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart* 2002;87:270-275.
36. Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ: Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2005;26:2457-2462.
37. Chen AH, Zhang WX, Li ZL, Tang XM, Lu Q, Qian XX, Li LY, Sun JZ: [Association between aldosterone synthase gene polymorphism and hypertrophic cardiomyopathy]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002;22:704-706.

38. Chai W, Hoedemaekers Y, van Schaik RH, van FM, Garrelds IM, Saris JJ, Dooijes D, ten Cate FJ, Kofflard MM, Danser AH: Cardiac aldosterone in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7:225-230.
39. Maron BJ: Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002;287:1308-1320.
40. Maron BJ, Tajik AJ, Ruttenberg HD, Graham TP, Atwood GF, Victorica BE, Lie JT, Roberts WC: Hypertrophic cardiomyopathy in infants: clinical features and natural history. *Circulation* 1982;65:7-17.
41. Maron BJ, Spirito P, Wesley Y, Arce J: Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1986;315:610-614.
42. Panza JA, Maris TJ, Maron BJ: Development and determinants of dynamic obstruction to left ventricular outflow in young patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1992;85:1398-1405.
43. Spirito P, Maron BJ: Relation between extent of left ventricular hypertrophy and age in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:820-823.
44. Spirito P, Bellone P: Natural history of hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994;72:S10-S12.
45. Spirito P, Maron BJ, Bonow RO, Epstein SE: Occurrence and significance of progressive left ventricular wall thinning and relative cavity dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1987;60:123-129.
46. Maron BJ: Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 1997;350:127-133.
47. Factor SM, Butany J, Sole MJ, Wigle ED, Williams WC, Rojkind M: Pathologic fibrosis and matrix connective tissue in the subaortic myocardium of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:1343-1351.
48. Davies MJ: The current status of myocardial disarray in hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 1984;51:361-363.
49. St John Sutton MG, Lie JT, Anderson KR, O'Brien PC, Frye RL: Histopathological specificity of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Myocardial fibre disarray and myocardial fibrosis. *Br Heart J* 1980;44:433-443.
50. Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC: Morphologic evidence for "small vessel disease" in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Z Kardiol* 1987;76 Suppl 3:91-100.
51. Varnava AM, Elliott PM, Sharma S, McKenna WJ, Davies MJ: Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart* 2000;84:476-482.
52. Ferrans VJ, Morrow AG, Roberts WC: Myocardial ultrastructure in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. A study of operatively excised left ventricular outflow tract muscle in 14 patients. *Circulation* 1972;45:769-792.

53. Factor SM, Butany J, Sole MJ, Wigle ED, Williams WC, Rojkind M: Pathologic fibrosis and matrix connective tissue in the subaortic myocardium of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:1343-1351.
54. Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y, Kawai C: Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 1986;55:575-581.
55. Orenes-Pinero E, Hernandez-Romero D, Jover E, de la Morena G, Valdes M, Marin F: An insight of novel pharmacological therapies in hypertrophic cardiomyopathy. *Med Chem* 2011;7:275-285.
56. Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC: Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:545-557.
57. Schwartzkopff B, Fassbach M, Pelzer B, Brehm M, Strauer BE: Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2002;4:439-4.
58. Suzuki H, Koba S, Katagiri T, Takeyama Y, Suwa Y: Ultrastructural changes of blood capillaries in patients with microvascular angina, hypertrophic cardiomyopathy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiovasc Pathol* 1995;5:19-26.
59. Takemura G, Takatsu Y, Fujiwara H: Luminal narrowing of coronary capillaries in human hypertrophic hearts: an ultrastructural morphometrical study using endomyocardial biopsy specimens. *Heart* 1998;79:78-85.
60. Maron BJ, Wolfson JK, Roberts WC: Relation between extent of cardiac muscle cell disorganization and left ventricular wall thickness in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1992;70:785-790.
61. Cambroner F, Marin F, Roldan V, Hernandez-Romero D, Valdes M, Lip GY: Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur Heart J* 2009;30:139-151.
62. Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K: Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 1998;83:580-593.
63. Blanchard E, Seidman C, Seidman JG, LeWinter M, Maughan D: Altered crossbridge kinetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1999;84:475-483.
64. Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J: A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998;102:1292-1300.
65. Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J: In vivo modeling of myosin binding protein C familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1999;85:841-847.
66. Tardiff JC, Factor SM, Tompkins BD, Hewett TE, Palmer BM, Moore RL, Schwartz S, Robbins J, Leinwand LA: A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic

- mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998;101:2800-2811.
67. Spindler M, Saupe KW, Christe ME, Sweeney HL, Seidman CE, Seidman JG, Ingwall JS: Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998;101:1775-1783.
 68. Crilley JG, Boehm EA, Blair E, Rajagopalan B, Blamire AM, Styles P, McKenna WJ, Ostman-Smith I, Clarke K, Watkins H: Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1776-1782.
 69. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H: Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet* 2003;19:263-268.
 70. Elliott K, Watkins H, Redwood CS: Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2000;275:22069-22074.
 71. Lin D, Bobkova A, Homsher E, Tobacman LS: Altered cardiac troponin T in vitro function in the presence of a mutation implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1996;97:2842-2848.
 72. Ho CY, Sweitzer NK, McDonough B, Maron BJ, Casey SA, Seidman JG, Seidman CE, Solomon SD: Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002;105:2992-2997.
 73. Frey N, McKinsey TA, Olson EN: Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 2000;6:1221-1227.
 74. Frey N, Olson EN: Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45-79.
 75. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA: Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004;109:1580-1589.
 76. DeAnda A, Jr., Komeda M, Moon MR, Green GR, Bolger AF, Nikolic SD, Daughters GT, Miller DC: Estimation of regional left ventricular wall stresses in intact canine hearts. *Am J Physiol* 1998;275:H1879-H1885.
 77. Wallace DC, Brown MD, Lott MT: Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999;238:211-230.
 78. Ashrafian H, McKenna WJ, Watkins H: Disease pathways and novel therapeutic targets in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2011;109:86-96.
 79. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 1995;92:785-789.
 80. McKenna WJ, Spirito P, Desnos M, Dubourg O, Komajda M: Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. *Heart* 1997;77:130-132.

81. Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, Casey SA, Lesser JR, Losi MA, Cecchi F, Maron BJ: Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003;348:295-303.
82. McKenna W, Deanfield J, Faruqui A, England D, Oakley C, Goodwin J: Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol* 1981;47:532-538.
83. Maron BJ, Casey SA, Poliac LC, Gohman TE, Almquist AK, Aeppli DM: Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy in a regional United States cohort. *JAMA* 1999;281:650-655.
84. McKenna WJ, Goodwin JF: The natural history of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol* 1981;6:1-26.
85. Maron BJ, Spirito P: Implications of left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;81:1339-1344.
86. Shirani J, Maron BJ, Cannon RO, III, Shahin S, Roberts WC: Clinicopathologic features of hypertrophic cardiomyopathy managed by cardiac transplantation. *Am J Cardiol* 1993;72:434-440.
87. Waller TA, Hiser WL, Capehart JE, Roberts WC: Comparison of clinical and morphologic cardiac findings in patients having cardiac transplantation for ischemic cardiomyopathy, idiopathic dilated cardiomyopathy, and dilated hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;81:884-894.
88. DiSessa TG, Childs W, Ti C, Friedman WF: Systolic anterior motion of the mitral valve in a one day old infant with D-transposition of the great vessels. *J Clin Ultrasound* 1978;6:186.
89. Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H, Williams WG: Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis* 1985;28:1-83.
90. de la Morena G, Ruiperez JA, Garcia GJ, Salas J, Jaen E, Lopez CJ: Hypertrophic myocardiopathy (I). The clinical and echocardiographic characteristics of a population of 72 patients. *Rev Esp Cardiol* 1991;44:11-17.
91. Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ: Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation* 2001;104:1380-1384.
92. Soman P, Swinburn J, Callister M, Stephens NG, Senior R: Apical hypertrophic cardiomyopathy: bedside diagnosis by intravenous contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2001;14:311-313.
93. Koga Y, Miyamoto T, Ohtsuki T, Toshima H: Natural history of hypertrophic cardiomyopathy: Japanese experience. *J Cardiol* 2001;37 Suppl 1:147-154.
94. Lattanzi F, Di B, V, Picano E, Caputo MT, Talarico L, Di MC, Landini L, Santoro G, Giusti C, Distante A: Normal ultrasonic myocardial reflectivity in athletes with increased left ventricular mass. A tissue characterization study. *Circulation* 1992;85:1828-1834.

95. Penas LM, Perez AL, Ricoy E: Atrioventricular stimulation in symptomatic obstructive hypertrophic cardiomyopathy: still too many questions. *Rev Esp Cardiol* 1996;49:823-825.
96. Alfonso F, Aragoncillo P: Anomalous papillary muscle in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2001;86:2.
97. Pastor-Perez FJ, Manzano-Fernandez S, Goya-Esteban R, Pascual-Figal DA, Barquero-Perez O, Rojo-Alvarez JL, Martinez-Espejo MD, Valdés-Chavarri M, Garcia-Alberola A: Comparison of detection of arrhythmias in patients with chronic heart failure secondary to non-ischemic versus ischemic cardiomyopathy by 1 versus 7-day holter monitoring. *Am J Cardiol* 2010;106:677-681.
98. Pujadas S, Carreras F, Arrastio X, Leta R, Vila M, Subirana MT, Bayes-Genis A, Pons-Llado G: Detection and quantification of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy by contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:10-14.
99. Moon JC: What is late gadolinium enhancement in hypertrophic cardiomyopathy?. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:1-4.
100. Romero-Puche A, Marin F, Gonzalez-Carrillo J, Garcia-Honrubia A, Climent V, Feliu E, Ruiz-Espejo F, Paya E, Gimeno-Blanes JR, de la Morena G, Valdes-Chavarri M: Gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance and exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:853-860.
101. Paya E, Marin F, Gonzalez J, Gimeno JR, Feliu E, Romero A, Ruiz-Espejo F, Roldan V, Climent V, de la Morena G, Valdes M: Variables associated with contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy: clinical implications. *J Card Fail* 2008;14:414-419.
102. Petrone RK, Klues HG, Panza JA, Peterson EE, Maron BJ: Coexistence of mitral valve prolapse in a consecutive group of 528 patients with hypertrophic cardiomyopathy assessed with echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:55-61.
103. Klues HG, Roberts WC, Maron BJ: Anomalous insertion of papillary muscle directly into anterior mitral leaflet in hypertrophic cardiomyopathy. Significance in producing left ventricular outflow obstruction. *Circulation* 1991;84:1188-1197.
104. Shirani J, Pick R, Roberts WC, Maron BJ: Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:36-44.
105. Kawana A, Imaoka C, Kanemoto N: Evolution of dilated cardiomyopathy from hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a case report. *J Cardiol* 1987;17:389-398.
106. McKenna WJ, Deanfield JE: Hypertrophic cardiomyopathy: an important cause of sudden death. *Arch Dis Child* 1984;59:971-975.
107. Takagi E, Yamakado T, Nakano T: Prognosis of completely asymptomatic adult patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:206-211.

108. Martin RD, Diaz D, I, Barba J, Diez J: Characteristics of hypertensive cardiomyopathy in a population of hypertensive patients never treated. *Med Clin (Barc)* 2005;125:321-324.
109. Maron BJ: Risk stratification and role of implantable defibrillators for prevention of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J* 2010;74:2271-2282.
110. Maron BJ: Sudden death in young athletes. Lessons from the Hank Gathers affair. *N Engl J Med* 1993;329:55-57.
111. Elliott PM, Poloniecki J, Dickie S, Sharma S, Monserrat L, Varnava A, Mahon NG, McKenna WJ: Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2212-2218.
112. Maron BJ, Olivotto I, Spirito P, Casey SA, Bellone P, Gohman TE, Graham KJ, Burton DA, Cecchi F: Epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy-related death: revisited in a large non-referral-based patient population. *Circulation* 2000;102:858-864.
113. Maron MS, Olivotto I, Zenovich AG, Link MS, Pandian NG, Kuvin JT, Nistri S, Cecchi F, Udelson JE, Maron BJ: Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. *Circulation* 2006;114:2232-2239.
114. Levine RA, Vlahakes GJ, Lefebvre X, Guerrero JL, Cape EG, Yoganathan AP, Weyman AE: Papillary muscle displacement causes systolic anterior motion of the mitral valve. Experimental validation and insights into the mechanism of subaortic obstruction. *Circulation* 1995;91:1189-1195.
115. Christiaans I, van EK, van L, I, Birnie E, Bonsel GJ, Elliott PM, Wilde AA: Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace* 2010;12:313-321.
116. Maron BJ, Olivotto I, Bellone P, Conte MR, Cecchi F, Flygenring BP, Casey SA, Gohman TE, Bongioanni S, Spirito P: Clinical profile of stroke in 900 patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:301-307.
117. Olivotto I, Cecchi F, Casey SA, Dolara A, Traverse JH, Maron BJ: Impact of atrial fibrillation on the clinical course of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001;104:2517-2524.
118. Nihoyannopoulos P, Karatasakis G, Frenneaux M, McKenna WJ, Oakley CM: Diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy: relation to exercise capacity. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:536-540.
119. Maron BJ, Spirito P, Green KJ, Wesley YE, Bonow RO, Arce J: Noninvasive assessment of left ventricular diastolic function by pulsed Doppler echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1987;10:733-742.
120. Bogdanov DV: Spherical remodeling of left atrium in hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy. *Kardiologia* 2012;52:49-52.

121. Spinale FG: Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87:1285-1342.
122. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, D'Alessandro G, Cacace A, Ciampi Q, Chiariello M: Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;108:1455-1460.
123. Roldan V, Marin F, Gimeno JR, Ruiz-Espejo F, Gonzalez J, Feliu E, Garcia-Honrubia A, Saura D, de la Morena G, Valdes M, Vicente V: Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2008;156:85-91.
124. Flett AS, Hayward MP, Ashworth MT, Hansen MS, Taylor AM, Elliott PM, McGregor C, Moon JC: Equilibrium contrast cardiovascular magnetic resonance for the measurement of diffuse myocardial fibrosis: preliminary validation in humans. *Circulation* 2010;122:138-144.
125. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio AL, Charron P, Gimeno-Blanes J, Helio T, Linhart A, Mogensen J, Pinto Y, Ristic A, Seggewiss H, Sinagra G, Tavazzi L, Elliott PM: Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2012 (Epub ahead of print).
126. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS: Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part IV: matrix metalloproteinases and biomarkers of platelet activation. *Circulation* 2006;113:e382-e385.
127. Roldan V, Marin F, Diaz J, Gallego P, Jover E, Romera M, Manzano-Fernandez S, Casas T, Valdes M, Vicente V, Lip GY: High sensitivity cardiac troponin T and interleukin-6 predict adverse cardiovascular events and mortality in anticoagulated patients with atrial fibrillation. *J Thromb Haemost* 2012;10:1500-1507.
128. Hernandez-Romero D, Garcia-Salas JM, Lopez-Cuenca A, Perez-Berbel P, Puche C, Casas T, Orenes-Pinero E, Manzano-Fernandez S, Valdes M, Marin F: High-sensitivity troponin T and copeptin in non-ST acute coronary syndromes: implications for prognosis and role of hsTnT and copeptin in non-STEACS. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:578616.
129. Wang RX, Guo T, Li XR: BNP/NT-proBNP and cardiac pacing: a review. *Pacing Clin Electrophysiol* 2009;32:794-799.
130. Levin ER, Gardner DG, Samson WK: Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339:321-328.
131. Thaman R, Esteban MT, Barnes S, Gimeno JR, Mist B, Murphy R, Collinson PO, McKenna WJ, Elliott PM: Usefulness of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels to predict exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2006;98:515-519.
132. Brito D, Matias JS, Sargento L, Cabral MJ, Madeira HC: Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a marker of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Port Cardiol* 2004;23:1557-1582.

133. Fahy GJ, McCreery CJ, O'Sullivan F, Keenan AK, Quigley PJ, Maurer BJ: Plasma atrial natriuretic peptide is elevated in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996;55:149-155.
134. Arteaga E, Araujo AQ, Buck P, Ianni BM, Rabello R, Mady C: Plasma amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide quantification in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2005;150:1228-1232.
135. Fahy GJ, McCreery CJ, O'Sullivan F, Keenan AK, Quigley PJ, Maurer BJ: Plasma atrial natriuretic peptide is elevated in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996;55:149-155.
136. Maron BJ, Tholakanahalli VN, Zenovich AG, Casey SA, Duprez D, Aeppli DM, Cohn JN: Usefulness of B-type natriuretic peptide assay in the assessment of symptomatic state in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109:984-989.
137. Magga J, Sipola P, Vuolteenaho O, Risteli J, Jaaskelainen P, Peuhkurinen K, Kuusisto J: Significance of plasma levels of N-terminal Pro-B-type natriuretic peptide on left ventricular remodeling in non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy attributable to the Asp175Asn mutation in the alpha-tropomyosin gene. *Am J Cardiol* 2008;101:1185-1190.
138. Manzano-Fernandez S, Januzzi JL, Boronat GM, Bonaque-Gonzalez JC, Munoz-Esparza C, baladejo-Oton MD, Pastor-Perez FJ, Pastor P, Valdes M, Pascual-Figal DA: Comparative prognostic value of plasma and urinary N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with acute destabilized heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:365-372.
139. Young B, Gleeson M, Cripps AW: C-reactive protein: a critical review. *Pathology* 1991;23:118-124.
140. Pearson TA, Bazzarre TL, Daniels SR, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, Goldstein LB, Hong Y, Mensah GA, Sallis JF, Jr., Smith S Jr, Stone NJ, Taubert KA: American Heart Association guide for improving cardiovascular health at the community level: a statement for public health practitioners, healthcare providers, and health policy makers from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science. *Circulation* 2003;107:645-651.
141. Ridker PM: C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem* 2009;55:209-215.
142. Ridker PM, Morrow DA: C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiol Clin* 2003;21:315-325.
143. Zen K, Irie H, Doue T, Takamiya M, Yamano T, Sawada T, Azuma A, Matsubara H: Analysis of circulating apoptosis mediators and proinflammatory cytokines in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: comparison between nonobstructive and dilated-phase hypertrophic cardiomyopathy. *Int Heart J* 2005;46:231-244.
144. Buzas K, Megyeri K, Hogue M, Csanady M, Bogats G, Mandi Y: Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:53-59.

145. Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekar Y: Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure--seeing hope in death. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:681-688.
146. Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS: Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart* 2008;94:e21.
147. Lamparter S, Grimm W: Predictive value of high-sensitivity C-reactive protein in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005;28 Suppl 1:S233-S236.
148. Simon A, Castro A, Kaski JC: Progress in the knowledge on endothelial dysfunction and its application in clinical practice. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:211-217.
149. Drexler H: Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39:287-324.
150. Kodama K, Shigematsu Y, Hamada M, Hiwada K, Kazatani Y, Matsuzaki K, Murakami E: The effect of coronary vasospasm on the direction of ST-segment deviation in patients with both hypertrophic cardiomyopathy and vasospastic angina. *Chest* 2000;117:1300-1308.
151. Camici PG, Crea F: Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med* 2007;356:830-840.
152. Dimitrow PP, Dubiel JS: Impairment of coronary microvascular flow in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2002;23:991.
153. Dimitrow PP, Krzanowski M, Grodecki J, Malecka B, Lelakowski J, Kawecka-Jaszcz K, Szczeklik A, Dubiel JS: Verapamil improves the pacing-induced vasodilatation in symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2002;83:239-247.
154. Knaapen P, Germans T, Camici PG, Rimoldi OE, ten Cate FJ, ten Berg JM, Dijkmans PA, Boellaard R, van Dockum WG, Gotte MJ, Twisk JW, Van Rossum AC, Lammertsma AA, Visser FC: Determinants of coronary microvascular dysfunction in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H986-H993.
155. Ruggeri ZM: Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003;1:1335-1342.
156. Chong AY, Lip GY, Freestone B, Blann AD: Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin. *Eur J Heart Fail* 2006;8:167-172.
157. Chong AY, Freestone B, Patel J, Lim HS, Hughes E, Blann AD, Lip GY: Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes. *Am J Cardiol* 2006;97:671-675.
158. Lip GY, Blann AD: von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. *Br Heart J* 1995;74:580-583.

159. Lip GY, Foster W, Blann AD: Plasma von Willebrand factor levels and surrogates of atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:659-661.
160. Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS: Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* 2007;59:715-720.
161. Varol E, Ozaydin M, Sahin M, Altinbas A, Kosar F: vWf levels as a circulating marker of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Indian Heart J* 2005;57:655-657.
162. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kubler W: Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:1349-1353.
163. Sato Y, Taniguchi R, Yamada T, Matsumori A: Measurements of serum cardiac troponin T in patients with heart failure. *Am Heart J* 2003;145:e18.
164. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buerge C, Potocki M, Noveanu M, Breidhardt T, Twerenbold R, Winkler K, Bingisser R, Mueller C: Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009;361:858-867.
165. Peacock WF, De MT, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, Wu AH: Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med* 2008;358:2117-2126.
166. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernandez S, Pastor F, Garrido IP, Casas T, Sanchez MJ, Ansaldo P, Martinez P, Valdes M: Troponin-T monitoring in outpatients with nonischemic heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:678-686.
167. Omland T, de Lemos JA, Sabatine MS, Christophi CA, Rice MM, Jablonski KA, Tjora S, Domanski MJ, Gersh BJ, Rouleau JL, Pfeffer MA, Braunwald E: A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;361:2538-2547.
168. Sato Y, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, Yamada T, Matsumori A, Takatsu Y: Measurements of cardiac troponin T in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2003;89:659-660.
169. Pop GA, Cramer E, Timmermans J, Bos H, Verheugt FW: Troponin I release at rest and after exercise in patients with hypertrophic cardiomyopathy and the effect of betablockade. *Arch Cardiol Mex* 2006;76:415-418.
170. Hudson MP, O'Connor CM, Gattis WA, Tasissa G, Hasselblad V, Holleman CM, Gaulden LH, Sedor F, Ohman EM: Implications of elevated cardiac troponin T in ambulatory patients with heart failure: a prospective analysis. *Am Heart J* 2004;147:546-552.
171. Mann DL, Taegtmeier H: Dynamic regulation of the extracellular matrix after mechanical unloading of the failing human heart: recovering the missing link in left ventricular remodeling. *Circulation* 2001;104:1089-1091.
172. De CM: The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:1-11.

173. Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, Breit SN: Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* 2006;66:4983-4986.
174. Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, Metz J, Kinscherf R: Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. *Cell Tissue Res* 2004;318:325-333.
175. Kempf T, Sinning JM, Quint A, Bickel C, Sinning C, Wild PS, Schnabel R, Lubos E, Rupprecht HJ, Munzel T, Drexler H, Blankenberg S, Wollert KC: Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: results from the AtheroGene study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:286-292.
176. Eggers KM, Kempf T, Lagerqvist B, Lindahl B, Olofsson S, Jantzen F, Peter T, Allhoff T, Siegbahn A, Venge P, Wollert KC, Wallentin L: Growth-differentiation factor-15 for long-term risk prediction in patients stabilized after an episode of non-ST-segment-elevation acute coronary syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:88-96.
177. Anand IS, Kempf T, Rector TS, Tapken H, Allhoff T, Jantzen F, Kuskowski M, Cohn JN, Drexler H, Wollert KC: Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial. *Circulation* 2010;122:1387-1395.
178. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, Hewett TE, Breit SN, Molkentin JD: GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res* 2006;98:342-350.
179. Heger J, Schiegnitz E, von WD, Anwar MM, Piper HM, Euler G: Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 2010;224:120-126.
180. Diez J, Hernandez M: Is the extracellular degradation of collagen type I fibers depressed in spontaneously hypertensive rats with myocardial fibrosis? *Circulation* 1996;94:2998.
181. Diez J, Laviades C: Monitoring fibrillar collagen turnover in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res* 1997;35:202-205.
182. Diez J, Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R: Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2:209-216.
183. Weber KT: Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 2004;22:47-50.
184. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.

185. Manabe I, Shindo T, Nagai R: Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002;91:1103-1113.
186. Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE: [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Rev Esp Cardiol* 2006;59:473-486.
187. Lopez B, Gonzalez A, Diez J: Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* 2010;121:1645-1654.
188. Jakob C, Zavrski I, Heider U, Bollow M, Schulz CO, Fleissner C, Eucker J, Michael R, Hamm B, Possinger K, Sezer O: Serum levels of carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen are elevated in patients with multiple myeloma showing skeletal manifestations in magnetic resonance imaging but lacking lytic bone lesions in conventional radiography. *Clin Cancer Res* 2003;9:3047-3051.
189. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Beaumont J, Arias T, Hermida N, Zudaire A, Diez J: Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res* 2009;81:509-518.
190. Diez J, Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL: Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 2002;105:2512-2517.
191. Querejeta R, Varo N, Lopez B, Larman M, Artinano E, Etayo JC, Martinez Ubago JL, Gutierrez-Stampa M, Emparanza JI, Gil MJ, Monreal I, Mindan JP, Diez J: Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* 2000;101:1729-1735.
192. Chalmers RJ, Kirby B, Smith A, Burrows P, Little R, Horan M, Hextall JM, Smith CH, Klaber M, Rogers S: Replacement of routine liver biopsy by procollagen III aminopeptide for monitoring patients with psoriasis receiving long-term methotrexate: a multicentre audit and health economic analysis. *Br J Dermatol* 2005;152:444-450.
193. Poulsen SH, Host NB, Jensen SE, Egstrup K: Relationship between serum amino-terminal propeptide of type III procollagen and changes of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:1527-1532.
194. Weber KT: From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway. *Hypertension* 2004;43:716-719.
195. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ: Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201-210.
196. Thomas JD, Adams DB, Devries S, Ehler D, Greenberg N, Garcia M, Ginzton L, Gorcsan J, Katz AS, Keller A, Khandheria B, Powers KB, Roszel C, Rubenson DS, Soble J: Guidelines and recommendations for digital echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:287-297.
197. Sanchis J, Bardaji A, Bosch X, Loma-Osorio P, Marin F, Sanchez PL, Nunez J, Carratala A, Barrabes JA: Usefulness of high-sensitivity troponin T for the

- evaluation of patients with acute chest pain and no or minimal myocardial damage. *Am Heart J* 2012;164:194-200.
198. Dumont CA, Monserrat L, Soler R, Rodriguez E, Fernandez X, Peteiro J, Bouzas B, Pinon P, Castro-Beiras A: Clinical significance of late gadolinium enhancement on cardiovascular magnetic resonance in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:15-23.
199. Khan K, Talwar S: Screening for familial hypertrophic cardiomyopathy using brain natriuretic peptide. *Eur Heart J* 1999;20:550.
200. Pieroni M, Bellocci F, Sanna T, Verardo R, Ierardi C, Maseri A, Frustaci A, Crea F: Increased brain natriuretic peptide secretion is a marker of disease progression in nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail* 2007;13:380-388.
201. Coats CJ, Gallagher MJ, Foley M, O'Mahony C, Critoph C, Gimeno J, Dawnay A, McKenna WJ, Elliott PM: Relation between serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide and prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013.
202. Wu AH, Smith A, Wiecezorek S, Mather JF, Duncan B, White CM, McGill C, Katten D, Heller G: Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003;92:628-631.
203. Mutlu B, Bayrak F, Kahveci G, Degertekin M, Eroglu E, Basaran Y: Usefulness of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide to predict clinical course in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2006;98:1504-1506.
204. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-843.
205. Ridker PM: Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med* 2000;45:391-418.
206. Lamparter S, Grimm W: Predictive value of high-sensitivity C-reactive protein in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005;28 Suppl 1:S233-S236.
207. Yin WH, Chen JW, Jen HL, Chiang MC, Huang WP, Feng AN, Young MS, Lin SJ: Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J* 2004;147:931-938.
208. Lamparter S, Grimm W: Predictive value of high-sensitivity C-reactive protein in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005;28 Suppl 1:S233-S236.
209. Senes M, Erbay AR, Yilmaz FM, Topkaya BC, Zengi O, Dogan M, Yucel D: Coenzyme Q10 and high-sensitivity C-reactive protein in ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:382-386.

-
210. Ishikawa C, Tsutamoto T, Fujii M, Sakai H, Tanaka T, Horie M: Prediction of mortality by high-sensitivity C-reactive protein and brain natriuretic peptide in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2006;70:857-863.
 211. Camici PG, Crea F: Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med* 2007;356:830-840.
 212. Paulinska P, Spiel A, Jilma B: Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hamostaseologie* 2009;29:32-38.
 213. Sato M, Suzuki A, Nagata K, Uchiyama S: Increased von Willebrand factor in acute stroke patients with atrial fibrillation. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006;15:1-7.
 214. Le TT, Susen S, Caron C, Millaire A, Marechaux S, Polge AS, Vincentelli A, Mouquet F, Ennezat PV, Lamblin N, de GP, Van BE, Deklunder G, Goudemand J, Bauters C, Jude B: Functional impairment of von Willebrand factor in hypertrophic cardiomyopathy: relation to rest and exercise obstruction. *Circulation* 2008;118:1550-1557.
 215. Knaapen P, Germans T, Camici PG, Rimoldi OE, ten Cate FJ, ten Berg JM, Dijkmans PA, Boellaard R, van Dockum WG, Gotte MJ, Twisk JW, Van Rossum AC, Lammertsma AA, Visser FC: Determinants of coronary microvascular dysfunction in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H986-H993.
 216. Heldin CH, Westermark B: Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1990;1:555-566.
 217. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F: Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991;69:209-215.
 218. Leitner GC, Schmetterer L, Kapiotis S, Jilma B: Effects of endothelin-1 and phenylephrine on plasma levels of von Willebrand factor and protein S. *Thromb Res* 2010;125:e5-e8.
 219. Peacock WF, De MT, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, Wu AH: Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med* 2008;358:2117-2126.
 220. Sato Y, Yamada T, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, Kataoka K, Ito H, Matsumori A, Sasayama S, Takatsu Y: Persistently increased serum concentrations of cardiac troponin t in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy are predictive of adverse outcomes. *Circulation* 2001;103:369-374.
 221. Pop GA, Cramer E, Timmermans J, Bos H, Verheugt FW: Troponin I release at rest and after exercise in patients with hypertrophic cardiomyopathy and the effect of betablockade. *Arch Cardiol Mex* 2006;76:415-418.
 222. Nagueh SF, Lakkis NM, Middleton KJ, Spencer WH, III, Zoghbi WA, Quinones MA: Doppler estimation of left ventricular filling pressures in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1999;99:254-261.

223. Sutton MG, Sharpe N: Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981-2988.
224. Cecchi F, Olivotto I, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Camici PG: Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003;349:1027-1035.
225. Kempf T, von HS, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, Ponikowski P, Filippatos GS, Rozentryt P, Drexler H, Anker SD, Wollert KC: Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1054-1060.
226. Karam R, Lever HM, Healy BP: Hypertensive hypertrophic cardiomyopathy or hypertrophic cardiomyopathy with hypertension? A study of 78 patients. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:580-584.
227. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH, III, Spirito P, Ten Cate FJ, Wigle ED: American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J* 2003;24:1965-1991.
228. Dimitrow PP, Czarnecka D, Kawecka-Jaszcz K, Dubiel JS: The frequency and functional impact of hypertension overlapping on hypertrophic cardiomyopathy: comparison between older and younger patients. *J Hum Hypertens* 1998;12:633-634.
229. Eggers KM, Kempf T, Allhoff T, Lindahl B, Wallentin L, Wollert KC: Growth-differentiation factor-15 for early risk stratification in patients with acute chest pain. *Eur Heart J* 2008;29:2327-2335.
230. Monserrat L, Elliott PM, Gimeno JR, Sharma S, Penas-Lado M, McKenna WJ: Non-sustained ventricular tachycardia in hypertrophic cardiomyopathy: an independent marker of sudden death risk in young patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:873-879.
231. Christiaans I, van EK, van L, I, Birnie E, Bonsel GJ, Elliott PM, Wilde AA: Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace* 2010;12:313-321.
232. Ho CY, Lopez B, Coelho-Filho OR, Lakdawala NK, Cirino AL, Jarolim P, Kwong R, Gonzalez A, Colan SD, Seidman JG, Diez J, Seidman CE: Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2010;363:552-563.
233. Kahveci G, Bayrak F, Mutlu B, Basaran Y: Determinants of elevated NT-proBNP levels in patients with hypertrophic cardiomyopathy: an echocardiographic study. *Heart Lung Circ* 2009;18:266-270.
234. Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA, Maisel AS, Barrett-Connor E: Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality

- risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Circulation* 2011;123:2101-2110.
235. Thaman R, Gimeno JR, Reith S, Esteban MT, Limongelli G, Murphy RT, Mist B, McKenna WJ, Elliott PM: Progressive left ventricular remodeling in patients with hypertrophic cardiomyopathy and severe left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:398-405.
236. Brilla CG, Rupp H, Maisch B: Effects of ACE inhibition versus non-ACE inhibitor antihypertensive treatment on myocardial fibrosis in patients with arterial hypertension. Retrospective analysis of 120 patients with left ventricular endomyocardial biopsies. *Herz* 2003;28:744-753.
237. Sipola P, Peuhkurinen K, Lauerma K, Husso M, Jaaskelainen P, Laakso M, Aronen HJ, Risteli J, Kuusisto J: Myocardial late gadolinium enhancement is associated with raised serum amino-terminal propeptide of type III collagen concentrations in patients with hypertrophic cardiomyopathy attributable to the Asp175Asn mutation in the alpha tropomyosin gene: magnetic resonance imaging study. *Heart* 2006;92:1321-1322.
238. Schwartzkopff B, Fassbach M, Pelzer B, Brehm M, Strauer BE: Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2002;4:439-4.
239. Nishikawa N, Yamamoto K, Sakata Y, Mano T, Yoshida J, Miwa T, Takeda H, Hori M, Masuyama T: Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res* 2003;57:766-774.
240. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG, .: Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995;75:913-918.
241. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J: Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 2000;106:857-866.
242. MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ: Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res* 2000;46:257-263.
243. Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Nishikawa N, Mano T, Yoshida J, Miwa T, Sugawara M, Yamaguchi Y, Ookawara T, Suzuki K, Hori M: Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart. *Cardiovasc Res* 2002;55:76-82.
244. Lin YH, Lin C, Lo MT, Lin HJ, Wu YW, Hsu RB, Chao CL, Hsu HC, Wang PC, Wu VC, Wang SS, Lee CM, Chien KL, Ho YL, Chen MF, Peng CK: The relationship between aminoterminal propeptide of type III procollagen and heart rate variability parameters in heart failure patients: a potential serum marker to evaluate cardiac autonomic control and sudden cardiac death. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1821-1827.

245. Stroumpoulis KI, Pantazopoulos IN, Xanthos TT: Hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *World J Cardiol* 2010;2:289-298.
246. Shim CY, Ha JW, Choi EY, Lee HJ, Moon SH, Kim JM, Rim SJ, Chung N: Relationship between serum biochemical markers of myocardial fibrosis and diastolic function at rest and with exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Korean Circ J* 2009;39:519-524.
247. Diez J, Panizo A, Gil MJ, Monreal I, Hernandez M, Pardo MJ: Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 1996;93:1026-1032.
248. Timonen P, Magga J, Risteli J, Punnonen K, Vanninen E, Turpeinen A, Tuomainen P, Kuusisto J, Vuolteenaho O, Peuhkurinen K: Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008;124:293-300.
249. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG: TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension* 2002;40:136-141.
250. Schwartzkopff B, Fassbach M, Pelzer B, Brehm M, Strauer BE: Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2002;4:439-4.
251. Lopez B, Querejeta R, Varo N, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL, Diez J: Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:286-291.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL PACIENTE EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DENOMINADO: MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA Y REMODELADO TISULAR. PAPEL DE LOS BIOMARCADORES.

La Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, establece en su artículo 58 que la obtención de muestras biológicas con fines de investigación biomédica podrá realizarse únicamente cuando se haya obtenido previamente el consentimiento escrito del sujeto fuente y previa información de las consecuencias y los riesgos que pueda suponer tal obtención para su salud.

De conformidad a lo previsto en el artículo 59 de la citada Ley, se le informa de los siguientes extremos:

a) La finalidad de la investigación es la siguiente:

La miocardiopatía hipertrófica es una enfermedad genética en la que el músculo del corazón es anormal sin una causa aparente. La característica principal es la presencia de un engrosamiento anormal del músculo cardíaco y si lo miramos al microscopio vemos que las fibras musculares no están alineadas y que hay mucha fibrosis entre éstas. No se conoce con exactitud bien cual es el mecanismo de la producción de esta enfermedad.

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo pretende estudiar diferentes marcadores de daño endotelial, fibrosis y apoptosis en sangre periférica y establecer correlaciones con las variables clínicas de la enfermedad.

b) Los beneficios esperados son los siguientes:

Sus muestras se utilizarán para realizar estudios de biomarcadores de los diferentes procesos implicados en esta enfermedad. Por otro lado utilizaremos muestras de tejidos obtenidos mediante miectomías realizadas por necesidad diagnóstica o de seguimiento para el estudio de la expresión de proteínas implicadas en los procesos antes mencionados. Recogeremos además los datos para la elaboración de su historia clínica con preguntas sobre sus síntomas y antecedentes clínicos así como la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular (tabaco, diabetes, hipertensión).

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo la caracterización de los procesos y marcadores relacionados con su enfermedad podrían beneficiar en un futuro a otros pacientes que la padecen y podría contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

c) Los posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra (solo si existe alguno, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras) son los que siguen:

-Dada la necesidad de las extracciones de sangre en el momento de la aspiración puede notar algo de dolor pero que después no le tiene que producir ninguna molestia. En la zona donde se le ha realizado la prueba, puede quedar un hematoma o cardenal pasajero. En cualquier caso, intentaremos aprovechar el momento en que a usted le hagan otras extracciones sanguíneas dentro de la práctica clínica habitual, necesarias para el correcto tratamiento de la patología que padece. Adicionalmente, existe la posibilidad de que se le contacte con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras, pero de manera excepcional.

d) Los responsables de la investigación son los Dres.

Francisco Marín Ortuño
Francisco Cambronero Sánchez
Diana Hernández Romero
Gonzalo de la Morena Valenzuela
Vicente Climent Payá
Juan Antonio Vílchez Aguilera
Pedro Martínez Hernández
Teresa Casas Pina
Eduardo Ortiz Ruíz
Antonio García Honrubia
Luis Caballero Jiménez
Anastasio Montero Argudo
M^a Carmen Bartual Olmos
Concepción Moro Serrano

e) El lugar de realización del análisis y destino de la muestra al término de la investigación será el laboratorio del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca”

f) Se garantiza la total confidencialidad de la información obtenida, únicamente accediendo a la información obtenida los Dres. Responsables de la Investigación.

g) Existe la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica

h) El presente proyecto de investigación ha obtenido con fecha 22-04-09 informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica del “Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca” para la obtención y utilización de muestras biológicas para investigación biomédica.

Se le informa igualmente que el presente consentimiento puede ser revocado, totalmente o para determinados fines, en cualquier momento. Cuando la revocación se refiera a cualquier uso de la muestra, se procederá a su inmediata destrucción, sin perjuicio de la conservación de los datos resultantes de las investigaciones que se hubiesen realizado con carácter previo.

D./D^a..... DNI

He leído y comprendido el presente documento y doy mi consentimiento expreso para que se obtengan las muestras biológicas referidas mediante la realización de los análisis y pruebas oportunas.

Fdo:
(paciente)
Fecha:



Regular Article

Plasma levels of Von Willebrand factor are increased in patients with hypertrophic cardiomyopathy

Francisco Cambroner^a, Juan Antonio Vilchez^b, Antonio García-Honrubia^c, Francisco Ruiz-Espejo^b, Victoria Moreno^a, Diana Hernández-Romero^a, Bárbara Bonacasa^a, Rocío González-Conejero^d, Gonzalo de la Morena^a, Pedro Martínez^b, Vicente Climent^c, Mariano Valdés^a, Francisco Marín^{a,*}

^a Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

^b Department of Clinical Analysis, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

^c Department of Cardiology, Hospital General Universitario de Alicante, Spain

^d Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, Murcia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2009

Received in revised form 29 November 2009

Accepted 13 January 2010

Available online 13 February 2010

Keywords:

endothelial function
hypertrophic cardiomyopathy
von Willebrand factor

ABSTRACT

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterised by inappropriate hypertrophy, small-vessel coronary artery disease, myocyte disarray and increased interstitial fibrosis. Microvascular dysfunction is a common finding in HCM and its extent has been proposed as an important prognostic marker. Plasma von Willebrand factor (vWf) is an established marker of endothelial damage or dysfunction; however it has scarcely been studied in HCM. We hypothesised that vWf could be raised in patients with HCM and be related to different variables associated with severity of HCM.

Methods: We included 124 HCM patients, 93 males, aged 48 ± 15 years, 59 healthy control subjects with similar age and sex and 20 patients with ischemic heart disease but clinical stability for the last 6 months. A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram, echocardiography, 24 hours ECG-Holter monitoring, and symptom limited treadmill exercise test. Risk factors for sudden death were evaluated. A blinded cardiac MRI was performed with late enhanced study with Gadolinium. Plasma vWf levels were assayed by commercial ELISA.

Results: Patients showed higher levels of vWf (140.0 ± 65.0 UI/ml vs 105.0 ± 51.0 UI/ml, $p < 0.001$) even after adjusting for ABO blood group. vWf levels were found raised in patients with severe functional class (168.4 ± 65.9 UI/mL vs 132.4 ± 60.7 UI/mL, $p = 0.020$), atrial fibrillation (175.8 ± 69.4 UI/mL vs 133.0 ± 59.0 UI/mL, $p = 0.005$), hypertension (161.4 ± 60.8 vs 128.9 ± 60.5 , $p = 0.010$) obstruction (153.9 ± 67.9 vs 128.2 ± 57.4 UI/mL, $p = 0.046$) and non sustained ventricular tachycardia (159.3 ± 59.1 vs 133.0 ± 63.0 , $p = 0.049$). vWf correlated with age ($r:0.26$; $p = 0.006$) and obstruction ($r:0.22$; $p = 0.021$).

Conclusions: We show, for the first time, patients with HCM present significantly raised levels of vWf. These are associated with different conditions related to the severity of the disease.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is defined by the presence of left ventricular hypertrophy, myocyte disarray and interstitial fibrosis. One of the less known characteristic of HCM is the existence of microvascular dysfunction with functional and morphological abnormalities in small intramural coronary arteries and subendocardial arteriola [1]. Functionally, the endothelium-dependent coronary vasodilatation is impaired with an abnormal vasoconstrictor response to acetylcholine [1], cold pressor test [2] and pacing stimulation [3]. In addition, hyperaemic myocardial blood flow as measured by PET scan

is severely blunted, with particularly pronounced hypoperfusion at the subendocardial layer, indicative of microvascular dysfunction [4,5]. The morphological substrate underneath the microvascular dysfunction consists of a thickening of the arteriolar wall and its intima with a consequent narrowing of the lumen, and an abnormal ultrastructure of endothelial cells [6–10]. These altered vessels are usually within the fibrous tissue or in close proximity to these areas.

The measurement of plasma biomarkers in HCM provides interesting information about abnormal pathophysiology and prognosis [11]. Microvascular dysfunction might be reflected by elevated levels of circulating biomarkers. In fact, Dimitrow et al. [12] have recently found that some endothelial dysfunction markers were elevated in HCM compared to healthy individuals, suggesting that endothelium in HCM could be functionally abnormal. However, von Willebrand factor (vWf), one of the classic and established

* Corresponding author. Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, El Palmar, Murcia. Tel./fax: +34 968 398115.
E-mail address: fcomarino@hotmail.com (F. Marín).

endothelial marker of damage/dysfunction [13,14], has recently been analysed in two, but small, studies comparing levels between HCM patients and age- and gender matched controls. The authors found no statistically significant differences between both groups [12,15].

Due to consistent data demonstrating the existence of a micro-vascular dysfunction in HCM, we hypothesised that vWf could be raised in patients with HCM and be related to different variables associated with severity of HCM. Hence, we have determined plasma levels of vWf in a larger population of complete studied HCM patients and compared it with healthy controls to assess whether vWf is increased in HCM and its relation with different variables associated with severity of the disease.

Patients and methods

Patients

We included 124 HCM consecutive patients from Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, and Hospital General Universitario de Alicante, Spain, both centres with a specific unit for the disease, and were compared to two control groups. The first of them consisted of 59 healthy subjects with similar age and sex without cardiovascular disease and the second control group consisted of 20 patients with previous ischaemic heart disease but clinical stability for the last 6 months. In the HCM group 91 (73%) were males and aged 48 ± 15 years. The diagnosis of HCM was based in the presence of a left ventricular wall thickness of at least 15 mm without any other cause that could lead to ventricular hypertrophy. Exclusion criteria were patients with concomitant neoplastic, infectious, connective tissue or inflammatory diseases, as these conditions have been associated with abnormal vWf levels. All recruited subjects gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the local Research Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, as amended in Edinburgh in 2000.

Design and procedures

A complete history and clinical examination were performed, including 12-lead electrocardiogram, echocardiography, symptom limited treadmill exercise test and 24 hours ECG-Holter monitoring. Exercise treadmill test was performed by Bruce's protocol. Maximal exercise was continued until patient exhaustion. MET values (metabolic equivalent units) were calculated. Risk factors for sudden death were evaluated (personal and family history of sudden death, recurrent unexplained syncope, maximal wall thickness 30 mm, left ventricular outflow tract gradient >30 mmHg, abnormal blood pressure response during effort test, and non-sustained ventricular tachycardia). Cardiac magnetic resonance was performed on a 1.5 T scanner (Intera; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands). A peripheral bolus injection of Gadolinium-DTPA (0.2 mmol/Kg) was administered and late contrast-enhanced images were acquired using a segmented inversion-recovery sequence. Gadolinium enhancement images were acquired in the left ventricular short-axis orientation.

Blood samples and laboratory assays

Venepuncture was performed in the morning on patients who had been fasting for >12 hours. Blood samples were drawn atraumatically. Citrated plasma and serum samples were obtained by centrifugation for 15 minutes at 3500 g. Aliquots were stored at -40 °C to allow batch analysis. Von Willebrand factor plasma levels were assayed by ELISA (Zymutest, Aniera Corporation, Mason, Ohio) following the instructions of the manufacturer. The inter-assay and intra-assay variations for vWf determining were 5–10% and 3–8% respectively, with lower detection limits ≤ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for vWf. Genetic identification of ABO blood group was performed essentially as described elsewhere [16].

Statistical analysis

Continuous variables were tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. The normal distributed continuous variables are shown as mean \pm standard deviation, and those non-parametrically distributed are shown as median (interquartile range). Categorical variables are presented as frequencies (percentages). Comparisons between groups for continuous variables were performed with the unpaired t test for independent samples or the Mann-Whitney U test (as appropriate). Comparisons of the groups for continuous variables were performed with the ANOVA test for independent samples or the Kruskal Wallis test (as appropriate). The comparison of discrete variables was done via the χ^2 test or the Fisher test (as appropriate). Correlation between two variables was performed by Pearson test (if relevant by Spearman test). Multiple linear regression analyses were also undertaken with the concentrations of vWf as dependent variables and clinical characteristics as independent variables. A two-side probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were carried out with SPSS version 15.0 software (Chicago, Illinois, USA).

Results

Table 1 shows the clinical and demographic characteristics of patients with HCM and both control groups. HCM patients showed higher levels of vWf as compared to healthy controls (139.6 ± 64.8 UI/mL vs 105.0 ± 51.0 UI/mL, $p < 0.001$) but there was only a trend as compared with the ischaemic group (139.6 ± 64.8 UI/mL vs 121.4 ± 36.6 UI/mL; $p: 0.077$). In the whole population of the study (controls and HCM patients), there were statistical differences in the levels of vWf between group 0 and group non 0 (group 0 116.2 ± 58.6 UI/ml vs group non 0 137.3 ± 58.4 , $p = 0.022$) but the distribution of ABO blood groups were similar in controls and HCM patients ($p = 0.411$). In linear regression analysis being a patient showed a significant although not very strong association with the concentration of vWf ($r^2: 0.084$; $p = 0.001$). However, ABO blood group showed no association ($p = 0.129$).

In regarding clinical characteristics associated with vWf levels in HCM patients the differences in vWf levels are resumed in Tables 2 and 3. Raised vWf concentration was found in patients with severe functional class (168.4 ± 65.9 UI/mL vs 132.4 ± 60.7 UI/mL, $p: 0.020$), atrial fibrillation (175.8 ± 69.4 UI/mL vs 133.0 ± 59.0 UI/mL, $p = 0.005$), hypertension (161.4 ± 60.8 UI/mL vs 128.9 ± 60.5 UI/mL, $p = 0.010$), significant obstruction (153.9 ± 67.9 UI/mL vs 128.2 ± 57.4 UI/mL, $p = 0.046$), non 0 blood group (152.9 ± 61.7 UI/mL vs 126.2 ± 64 UI/mL, $p = 0.035$) and non sustained ventricular tachycardia (159.3 ± 59.1 UI/mL vs 133.0 ± 63.0 UI/mL, $p = 0.049$). No differences between patients with angina or without it were found (143.5 ± 64.2 UI/mL vs 134.3 ± 63.5 UI/mL, $p = 0.466$). Atrial fibrillation does not seem to be the only variable responsible of the differences between HCM patients and healthy controls because when we compared HCM patients in sinus rhythm with healthy controls the differences in vWf plasma levels are still significant (133.0 ± 59.0 UI/mL vs 105.1 ± 51.2 , $p = 0.005$) (Fig. 1). These differences does not exist between HCM patients in sinus rhythm and ischaemic controls (133.0 ± 59.0 UI/mL vs 121.5 ± 36.6 , $p = 0.270$), another well known disease with endothelial dysfunction. There were no other significant associations between vWf levels and clinical variables.

Increased in blood levels of vWf had significant correlation with age ($r: 0.26$; $p = 0.006$) and left ventricular outflow tract systolic gradient ($r: 0.22$; $p = 0.021$). In the multivariate analysis (linear regression), adjusting by age, severe functional class, hypertension, atrial fibrillation, obstruction, ABO blood group and non sustained ventricular tachycardia, the concentration of vWf was associated with the proposed model ($r^2: 0.18$; $p = 0.001$). Atrial fibrillation ($p = 0.001$), ABO blood group ($p = 0.018$) and non sustained ventricular

Table 1
Baseline characteristics of the study population.

Clinical variables	Patients		Healthy controls	Ischemic controls
	(n: 124)		(n: 59)	(n: 20)
Male sex	93		32	16
Age	47.7 ± 14.8		47.8 ± 11.0	51.1 ± 7.9
NYHA	I	56	59	20
	II	48		
	III	20		
Hypertension	36		6	8
Diabetes mellitus	6		2	7
Familial sudden death	23		-	-
Syncope	22		-	-
Maximum LV wall thickness (mm)	20.6 ± 5.1		-	-
E/A relation	1.37 ± 0.64		-	-
LV outflow tract obstruction (≥30 mm)	43		-	-
Abnormal blood pressure response (n = 95)	35		-	-
METS	9.02 ± 3.29		-	-
Non-sustained ventricular tachycardia	31		-	-
Atrial fibrillation	21		-	-
LVEF (%)	67.7 ± 10.8		-	-
Clinical Angina, n (%)	57 (46%)		-	-
LGE, n (%)	84 (67%)		-	-
Months from diagnosis	141 ± 82		-	-

NYHA: New York Heart Association functional class.

LVEF: left ventricular ejection fraction.

E/A relation: ratio of the early and late waves of spectral Doppler of ventricular filling.

METS: Metabolic equivalents.

tachycardia ($p=0.041$) were the three variables that remained associated with the levels of this biomarker.

Discussion

Endothelial dysfunction is a common finding in HCM patients and its extent has demonstrated prognostic implications [4]. Plasma levels of VWF are raised in different states of endothelial damage and have therefore been proposed as useful markers of endothelial damage/dysfunction [13,14]. In the present study, we show for the first time that HCM patients present significantly raised plasma levels of vWf and they are associated with different conditions related to the severity of the disease. This is not the first biomarker of microvascular dysfunction found to be increased in HCM. In fact, Dimitrow et al., have shown that soluble thrombomodulin (sTM), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) are elevated in HCM compared to healthy individuals, indicating that endothelial dysfunction can be detected in peripheral blood. However, in two previous studies no

statistically significant differences in vWf have been found between HCM patients and age and gender matched controls [12,15]. Both studies included only small cohorts of patients, and this fact could have limited their results.

Increase in vWf plasma concentration has been identified in different entities such as hypertension, atherosclerosis, diabetes mellitus and atrial fibrillation [17]. They are associated with higher cardiovascular risk and worse outcomes [17–19]. Our results show that HCM patients with AF have also higher levels of vWf. Although raised levels of vWf in our cohort were also related with different comorbidities, as hypertension or atrial fibrillation, we demonstrated that endothelial damage/dysfunction is independently found in HCM. Moreover, the levels of vWf were related to different conditions linked to disease severity, which are severe functional class, obstruction and importantly, non sustained ventricular tachycardia.

We have shown that HCM patients with LVOT high gradient and obstruction have higher levels of vWf compared with patients without

Table 2
Differences in vWf value associated with clinical features.

Condition	vWF value		p value
	Yes	No	
NYHA class ≥ III/IV	168.4 ± 65.9	132.4 ± 60.7	$p=0.020$
AF	175.8 ± 69.4	133.0 ± 59.0	$p=0.005$
Male	141.9 ± 60.5	132.2 ± 70.3	$p=0.467$
Hypertension	161.4 ± 60.8	128.9 ± 60.5	$p=0.010$
Syncope	139.5 ± 56.6	139.1 ± 63.4	$p=0.979$
LVOTSG > 30 mmHg	153.9 ± 67.9	128.2 ± 57.4	$p=0.046$
ABPR (n = 95)	143.2 ± 61.1	135.5 ± 64.4	$p=0.567$
NSVT	159.3 ± 59.1	133.0 ± 63.0	$p=0.049$
LGE	138.7 ± 68.1	144.8 ± 56.1	$p=0.652$
Angina	143.5 ± 64.2	134.3 ± 63.5	$p=0.466$
ABO blood group	126.2 ± 64	152.9 ± 61.7	$p=0.035$

AF: History of paroxysmal, persistent or permanent atrial fibrillation.

LVOTSG: Left ventricular outflow systolic gradient.

ABPR: Abnormal blood pressure response to exercise.

NSVT: Non sustained ventricular tachycardia in Holter monitoring.

LGE: Late Gadolinium enhancement in cardiac resonance.

Table 3
Bivariate correlations of vWf (Pearson's correlation).

	r value	p value
Age	r: 0.26	$p=0.006$
LAV	r: 0.01	$p=0.968$
MLVT	r: -0.03	$p=0.761$
LVOTSG	r: 0.22	$p=0.021$
NT-proBNP	r: 0.02	$p=0.700$
LVEDD	r: 0.11	$p=0.267$
LVESD	r: 0.03	$p=0.730$
LVEF	r: 0.55	$p=0.570$
E/A ratio	r: 0.05	$p=0.618$
METS	r: -0.11	$p=0.280$

LAV: Indexed left atrial volume.

MLVT: Maximal left ventricular wall thickness.

LVOTSG: Left ventricular outflow tract systolic gradient.

NT-proBNP: N-terminal portion of pro B type natriuretic peptide.

LVEDD: Left ventricular end-diastolic diameter.

LVESD: Left ventricular end-systolic diameter.

LVEF: Left ventricular ejection fraction.

E/A ratio: ratio of the early and late waves of spectral Doppler of ventricular filling.

METS: Metabolic equivalent units.

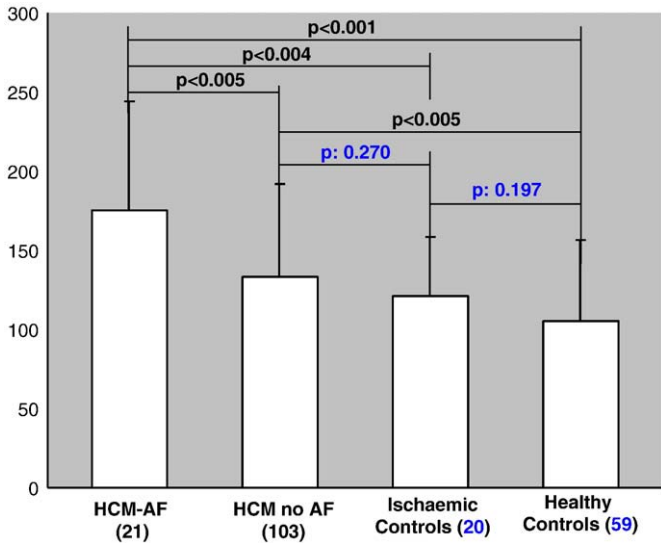


Fig. 1. Comparison by pairs of vWf plasma levels in two different subgroups of HCM patients and controls (in brackets number of patients of each group).

them. The accelerated flow due to LVOT obstruction may stimulate platelets or endothelial cells through an increase in shear stress that in turn increase the production of vWf and thrombin [20]. Apart from this increase, as demonstrated by Le Tourneau et al. [21], high shear forces enhance proteolysis of the largest vWf multimers, produces vWf function impairment and an acquired von Willebrand syndrome. This impairment of vWf function was independently associated with the magnitude of obstruction and its reduction was associated with an improvement in vWf function. However, major spontaneous bleeds are rare in HCM patients. In contrast HCM patients have much higher thromboembolic risk than healthy people [22]. The activation of thrombin and platelets compensate and even tip the balance to the other side making the risk of having an embolic event more likely than a haemorrhagic one.

The precise mechanisms of endothelial dysfunction in HCM are unknown. It is possible that a thickened ventricle could generate extravascular compressive forces that play a role in the microvascular dysfunction seen in HCM [5]. Another possibility is the existence of disturbed [23,24] or activated platelets [20] that produce platelet derived growth factor (PDGF). It is known that PDGF has the potential to induce the proliferation of vascular smooth muscle cells, fibroblasts, and endothelial cells [25,26].

Magnetic resonance is a very useful tool in patients with HCM. It allows differentiating subtypes of HCM, existence of wall motion anomalies, ejection fraction and the presence of mitral valve systolic anterior motion or mitral regurgitation [27]. Moreover, LGE (late gadolinium enhancement) images are becoming an established method to non-invasively assess the presence of fibrosis [28]. Extensive LGE reflects greater disease expression. It is associated with more severe myocardial damage and with adverse clinical outcomes [29]. Indeed, our group has recently demonstrated an association between LGE, non-sustained ventricular tachycardia and LVOT obstruction [30]. All these data suggest that it may be closely linked to prognosis. However, our data do not show a significant association between vWf and fibrosis, assessed by LGE.

The existence of microvascular dysfunction could get involved in the pathogenesis of the hypertrophy observed in HCM patients. It has been shown that endothelial dysfunction leads to the increased production of a potent vasoconstrictor mediator produced by vascular endothelial cells such as endothelin-1 [31]. Endothelin-1 (ET-1) has been found to be increased in HCM patients. ET-1 causes hypertrophy in cultured heart muscle cells [32], suggesting a role of ET-1 in the development of cardiac hypertrophy [33]. Also, recently published, it has been shown that ET-1 increases levels of vWf in humans [34]

producing a reciprocal interaction. Microvascular dysfunction increases ET-1 that in turn stimulates the production of vWf.

Conclusions

We show, for the first time, that patients with HCM present significantly raised levels of vWf. These are associated with different conditions related to the severity of the disease, that is, severe functional class, obstruction and non sustained ventricular tachycardia. Increased levels of vWf seem to be the result of microvascular dysfunction and not due to conditions related to HCM.

Conflict of interest statement

We confirm the following: 1) the paper is not under consideration elsewhere, 2) none of the paper's contents have been previously published, 3) all authors have read and approved the manuscript, and 4) the full disclosure of any potential conflict of interest has been made, and there none to declare. Dr Hernández-Romero holds a postdoctoral position funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Acknowledgments

We deeply appreciate the technical measurements by A Miñano and helpful in discussion of Dr. V. Roldán.

References

- [1] Kodama K, Shigematsu Y, Hamada M, Hiwada K, Kazatani Y, Matsuzaki K, et al. The effect of coronary vasospasm on the direction of ST-segment deviation in patients with both hypertrophic cardiomyopathy and vasospastic angina. *Chest* 2000;117:1300–8.
- [2] Dimitrow PP, Krzanowski M, Nizankowski R, Szczeklik A, Dubiel JS. Verapamil improves the response of coronary vasomotion to cold pressor test in asymptomatic and mildly symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999;13:259–64.
- [3] Dimitrow PP, Krzanowski M, Grodecki J, Malecka B, Lelakowski J, Kawecka-Jaszcz K, et al. Verapamil improves the pacing-induced vasodilatation in symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2002;83:239–47.
- [4] Camici PG, Crea F. Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med* 2007;356:830–40.
- [5] Knaapen P, Germans T, Camici PG, Rimoldi OE, ten Cate FJ, ten Berg JM, et al. Determinants of coronary microvascular dysfunction in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H986–93.
- [6] Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:545–57.
- [7] Schwartzkopff B, Mundhenke M, Strauer BE. Alterations of the architecture of subendocardial arterioles in patients with hypertrophic cardiomyopathy and impaired coronary vasodilator reserve: a possible cause for myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1089–96.
- [8] Suzuki H, Koba S, Katagiri T, Takeyama Y, Suwa Y. Ultrastructural changes of blood capillaries in patients with microvascular angina, hypertrophic cardiomyopathy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiovasc Pathol* 1995;5:19–26.
- [9] Takemura G, Takatsu Y, Fujiwara H. Luminal narrowing of coronary capillaries in human hypertrophic hearts: an ultrastructural morphometrical study using endomyocardial biopsy specimens. *Heart* 1998;79:78–85.
- [10] Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Matsuda M, Hamashima Y, et al. Quantitative analysis of narrowings of intramyocardial small arteries in normal hearts, hypertensive hearts, and hearts with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1987;75:1130–9.
- [11] Cambroner F, Marin F, Roldan V, Hernandez-Romero D, Valdes M, Lip GY. Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur Heart J* 2009;30:139–51.
- [12] Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS. Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* 2007;59:715–20.
- [13] Lip GY, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res* 1997;34:255–65.
- [14] Lip GY, Foster W, Blann AD. Plasma von Willebrand factor levels and surrogates of atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:659–61.
- [15] Varol E, Ozaydin M, Sahin M, Altinbas A, Kosar F. vWf levels as a circulating marker of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Indian Heart J* 2005;57:655–7.
- [16] Olsson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang* 1995;69:242–7.

- [17] Paulinska P, Spiel A, Jilma B. Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hamostaseologie* 2009;29:32–8.
- [18] Felmeden DC, Lip GY. Endothelial function and its assessment. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:1319–36.
- [19] Sato M, Suzuki A, Nagata K, Uchiyama S. Increased von Willebrand factor in acute stroke patients with atrial fibrillation. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006;15:1–7.
- [20] Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS. Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart* 2008;94:e21.
- [21] Le Tourneau T, Susen S, Caron C, Millaire A, Marechaux S, Polge AS, et al. Functional impairment of von Willebrand factor in hypertrophic cardiomyopathy: relation to rest and exercise obstruction. *Circulation* 2008;118:1550–7.
- [22] Maron BJ, Olivetto I, Bellone P, Conte MR, Cecchi F, Flygenring BP, et al. Clinical profile of stroke in 900 patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:301–7.
- [23] Yarom R, Lewis BS, Lijovetzky G, Havivi Y, Chandler JA. Platelet studies in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1982;16:324–30.
- [24] Riazanov AS, Gabbasov ZA, Iurenev AP. Platelet aggregation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Ter Arkh* 2000;72:36–8.
- [25] Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1990;1:555–66.
- [26] Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986;46:155–69.
- [27] Pohost GM, Hung L, Doyle M. Clinical use of cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 2003;108:647–53.
- [28] Moon JC. What is late gadolinium enhancement in hypertrophic cardiomyopathy? *Rev Esp Cardiol* 2007;60:1–4.
- [29] Dumont CA, Monserrat L, Soler R, Rodriguez E, Fernandez X, Peteiro J, et al. Clinical significance of late gadolinium enhancement on cardiovascular magnetic resonance in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:15–23.
- [30] Paya E, Marin F, Gonzalez J, Gimeno JR, Feliu E, Romero A, et al. Variables associated with contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy: clinical implications. *J Card Fail* 2008;14:414–9.
- [31] Vita JA, Treasure CB, Yeung AC, Vekshtein VI, Fantasia GM, Fish RD, et al. Patients with evidence of coronary endothelial dysfunction as assessed by acetylcholine infusion demonstrate marked increase in sensitivity to constrictor effects of catecholamines. *Circulation* 1992;85:1390–7.
- [32] Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, et al. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991;69:209–15.
- [33] Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, et al. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 1994;89:2198–203.
- [34] Leitner GC, Schmetterer L, Kapiotis S, Jilma B. Effects of endothelin-1 and phenylephrine on plasma levels of von Willebrand factor and protein S. *Thromb Res* 2010;125:e5–8.

Serum Levels of High-Sensitivity Troponin T: A Novel Marker for Cardiac Remodeling in Hypertrophic Cardiomyopathy

VICTORIA MORENO, MD,¹ DIANA HERNÁNDEZ-ROMERO, PhD,¹ JUAN ANTONIO VILCHEZ, MD,² ANTONIO GARCÍA-HONRUBIA, MD,³ FRANCISCO CAMBRONERO, MD, PhD,¹ TERESA CASAS, PhD,² JOSEFA GONZÁLEZ, MD,¹ PEDRO MARTÍNEZ, PhD,² VICENTE CLIMENT, MD, PhD,³ GONZALO DE LA MORENA, MD, PhD,¹ MARIANO VALDÉS, MD, PhD,¹ AND FRANCISCO MARÍN, MD, PhD¹

Murcia and Alicante, Spain

ABSTRACT

Background: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterized by inappropriate hypertrophy, small-vessel coronary artery disease, myocyte disarray, and increased interstitial fibrosis. High-sensitivity troponin T (hs-TnT) could be a reliable indicator of myocardial remodeling, a proposed prognostic marker in HCM. Therefore we hypothesized that increased hs-TnT levels are related to different variables associated with myocardial remodeling, such as the presence of fibrosis assessed with cardiac magnetic resonance imaging (MRI). **Methods and Results:** We included 95 hemodynamically stable HCM patients, 72 male, aged 45.7 ± 14.2 years, and 45 healthy control subjects with similar age and gender. A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram (ECG), echocardiography, 24-hour ECG-Holter monitoring, symptom-limited treadmill exercise test, and late gadolinium enhancement in cardiac MRI. Risk factors for sudden death were evaluated. A blinded cardiac MRI was performed with late gadolinium enhancement study. Serum hs-TnT levels were assayed. A high proportion (42%) of hemodynamically stable patients studied showed increased levels of hs-TnT. The hs-TnT levels were raised in patients with severe dyspnea: New York Heart Association (NYHA) functional class ≥ 3 ($P = .020$), outflow obstruction ($P = .013$), systolic dysfunction ($P = .037$), abnormal blood pressure response ($P = .036$), and presence of gadolinium enhancement ($P = .021$). The hs-TnT levels correlated positively with the maximum left ventricular wall thickness ($r = 0.47$; $P < .001$), left atrial diameter ($r = 0.36$, $P = .014$), and outflow gradient ($r = 0.28$; $P = .008$). **Conclusions:** A high proportion of hemodynamically stable patients show increased levels of hs-TnT. We observed that raised hs-TnT serum levels are associated with different conditions related to the severity of the disease. (*J Cardiac Fail* 2010;16:950–956)

Key Words: Hypertrophic cardiomyopathy, troponin and cardiac remodeling.

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) has been defined morphologically by unexplained hypertrophy in the absence of hemodynamic stress, and at the histological level by myocyte disarray, fibrosis, and abnormalities of the intramyocardial small vessels.¹ Serum concentration of cardiac troponin T (TnT) is a specific and high-sensitivity marker of myocardial injury and its diagnostic and prognostic values have been well established in acute coronary syndromes.²

On the other hand, patients with idiopathic dilated cardiomyopathy with particularly poor prognosis show increased serum concentrations of TnT in the absence of significant coronary stenoses.³ These elevated levels of TnT could be due to ongoing myocardial damage or leakage of myofibrillar components and may reflect the loss of viable cardiac myocytes characteristic of progressive heart failure.⁴ All of these studies, based on classic TnT

From the ¹Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain; ²Department of Clinical Analysis, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain and ³Department of Cardiology, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain.

Manuscript received February 23, 2010; revised manuscript received June 28, 2010; revised manuscript accepted July 2, 2010.

Reprint requests: Francisco Marín, MD, PhD, Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, El Palmar, Murcia, Spain. Tel/Fax: 0034-968-398115. E-mail: fcomarino@hotmail.com

Funding: Supported by an FIS PS09/00721 project for the Instituto de Salud Carlos III, and in part by Funding FEDER and by Roche Diagnostics. Dr Hernández-Romero holds a postdoctoral position funded by the Instituto de Salud Carlos III.

See page 955 for disclosure information.

1071-9164/\$ - see front matter

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.cardfail.2010.07.245

determination methods, reveal strong discrepancies among the number of TnT-positive patients, probably owing to the heterogeneous detection limit of the technique used (0.01–0.013 ng/mL, depending on the manufacturer and the generation of the assay) and the selected cutoff point. In addition, the hemodynamic state (acute or stable) of the patients at the moment of the TnT determination also adds difficulty to the evaluation of this biomarker in other cardiopathies different from acute coronary syndromes. Newly developed techniques, such as high-sensitivity (hs) TnT determination, have been shown to improve the diagnosis in acute coronary syndromes. The detection and quantification of TnT based on methods with increased sensitivity⁵ could help in the diagnosis of these pathologies. The role of troponin levels in patients with HCM is not clearly established. However, circulating troponin levels showed an association with a significantly lower shortening fraction and thicker interventricular septum.^{2–6}

In HCM, ischemia may occur due to severe hypertrophy, myocyte disarray, or small vessel disease.⁷ Severe microvascular dysfunction is a potent long-term predictor of left ventricular (LV) adverse remodeling and systolic dysfunction in HCM.⁷ Moreover, myocyte injury, coronary microvascular dysfunction, and fibroblast and collagen turnover also play an important role in cardiac remodeling. A continuous extracellular matrix remodeling takes place in HCM,⁸ undergoing increased interstitial fibrosis due to increased amounts of collagen type I/III deposition.⁹ Regions of myocardial late gadolinium enhancement assessed by cardiac magnetic resonance imaging (MRI) reflect increased myocardial collagen.¹⁰ We previously demonstrated an important association of several clinical variables and risk factors with late gadolinium enhancement in HCM patients.¹¹

We therefore hypothesized that an increase in hs-TnT levels could be related to different variables associated with ventricular remodeling in HCM. In this setting we explore the association with clinical variables (ie, age, gender, hypertension, sudden death family, angina syncope, atrial fibrillation, and functional class), echocardiographic variables (LV outflow tract obstruction, LV wall thickness, left atrial dilation,¹² and diastolic function indices¹³), other techniques' determinations (abnormal blood pressure response to exercise, nonsustained ventricular tachycardia in the Holter registry, or late gadolinium enhancement in MRI), or biomarkers of myocardial wall stress¹⁴ (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide [NT-proBNP]) or inflammation (hs C-reactive protein [CRP]).

Patients and Methods

We included 95 HCM stable patients attending a cardiology outpatient clinic for routine follow-up, from two referral hospitals in Spain (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, and Hospital General Universitario, Alicante), aged 45.7 ± 14.2 years old and 72 (75.8%) of them male. The criteria for diagnosis of HCM was the presence of a LV wall thickness of ≥ 15 mm

without any other cause that could lead to ventricular hypertrophy, and in the case of first-degree relatives of affected individuals, proposed familial criteria were used. Exclusion criteria were patients with concomitant neoplasm, infection, connective tissue disease, diabetes mellitus, secondary or refractory primary hypertension with need of two or more drugs, demonstrated ischemic heart disease, anticoagulant treatment, or inflammatory disease. A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram (ECG), echocardiography, symptom-limited treadmill exercise test and 24-hour ECG-Holter monitoring. Exercise treadmill test was performed by the Bruce protocol. Maximal exercise was continued until patient exhaustion. Metabolic equivalent (MET) units were calculated. Risk factors for sudden death were evaluated (personal and family history of sudden death, recurrent unexplained syncope, maximal wall thickness ≥ 30 mm, rest LV outflow tract gradient > 30 mm Hg, abnormal blood pressure response during effort test, and nonsustained ventricular tachycardia on 24-hour Holter monitoring). HCM patients were compared with 45 control subjects with similar age and gender. Control subjects were selected among working people within the two hospitals by using the same exclusion criteria as for patient recruitment. Each of the patients and control subjects gave his or her signed consent to participation. The Research Ethics Committee of the two centers approved the study.

Echocardiography Study

The following parameters were measured in the echocardiographic study: LV cavity size, interventricular septal and posterior wall thickness, maximal LV thickness, and ejection fraction were measured in accordance with European Society of Echocardiography recommendations. We defined systolic dysfunction as the value of the ejection fraction below the cutoff point of 50%. Left atrial volume (LAV) was measured from two orthogonal views. LAV was indexed to body surface area. Pulsed-wave Doppler tracings of mitral inflow were obtained by placing a sample volume at the tips of mitral valve from an apical view. Peak Doppler velocities were analyzed to determine early (E-wave) and late (A-wave) diastolic flow across the mitral valve. Doppler tissue imaging of the mitral annulus was obtained from the apical four-chamber view, and peak early tissue Doppler velocities of the medial mitral annulus (E' wave) were analyzed, E/E' ratio was calculated. Left ventricular outflow tract gradient was calculated from continuous-wave Doppler using the simplified Bernoulli equation.

Cardiac Magnetic Resonance Imaging Study

Cardiac MRI was performed on a 1.5-T scanner with a 6-element torso phased array coil and cardiology software (version 9.1, Intera; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands). Parallel imaging (SENSE) was used. Cine MRI was obtained in the cardiac short-axis, vertical long-axis, and horizontal long-axis planes using a breath-hold balanced fast field-echo sequence. A peripheral bolus injection of gadolinium-DTPA (0.2 mmol/kg) was administered and, 10 minutes after the injection, late contrast-enhanced images were acquired using a segmented inversion-recovery sequence. Gadolinium enhancement images were acquired in the LV short-axis orientation. Images were analyzed by a single MRI-experienced observer in a blinded manner without information about clinic findings or evolution of the included patients. The left ventricle was divided by following the model of 17 segments,¹⁵ and myocardial thickness, contractility,

and late gadolinium enhancement areas in each segment were analyzed. A qualitative analysis of the presence of late myocardial enhancement was done. Additionally, we analysed data using validated software (Mass Suite 6.1, Medis Medical Imaging Systems, Leiden, The Netherlands). Briefly, endocardial and epicardial borders were manually traced in each slice. Subsequently, we chose the late enhancement threshold looking at the baseline intensity in the bull's eye graph (a map with different intensity signals in each image of the heart). Using this threshold, we looked at all of the images, checking the gadolinium enhancement areas. If all of them were included, we accepted this threshold. If some of them were excluded, we changed the threshold until it was correct. We considered late gadolinium enhancement to be present when the intensity of the signal in a specific area was hyperintense and persisted in the same cut after the change in the codification of the phase to avoid aberrations.

Blood Samples and Laboratory Assays

Venipuncture was performed in the morning on patients and healthy control subjects who had been fasting for >12 hours. Blood samples were drawn atraumatically. Serum fractions were obtained by centrifugation for 15 minutes at 3500g. Aliquots were stored at -40°C to allow batch analysis. Serum levels of hs-TnT were assayed by a Cobas 6000 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The interassay variations for hs-TnT determination was 2.4%, with lower detection limit of 0.003 ng/mL. We also determined NT-proBNP, a biomarker of myocardial stress correlating with the presence of LV dysfunction and abnormal LV wall stress, using a Roche Diagnostics proBNP assay on an Elecsys 2010 analyzer (Roche Diagnostics,). Serum CRP, an established proinflammatory biomarker, was also quantified by kinetic nephelometry with an immunochemical system (Image; Beckman, Magburg, Germany).

Statistical Analysis

Continuous variables were tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. The normal distributed continuous variables are shown as mean \pm SD, and those nonparametrically distributed are shown as median (interquartile range). Categorical variables are presented as frequencies (percentages). Comparisons of the groups for continuous variables were performed with the unpaired *t* test for independent samples or the Mann-Whitney *U* test (as appropriate). The comparison of discrete variables was done via the χ^2 test or the Fisher test (as appropriate). Correlation between two continuous variables was performed by Pearson test (if relevant by Spearman test). An analysis of variance test (if relevant by Kruskal-Wallis test) was performed to assess the relation between biologic markers and the number of sudden death risk factors. Binary logistic regression analyses were also undertaken with the presence/absence of elevated hs-TnT levels as dependent variable (cutoff point ≥ 0.014 ng/mL) and different clinical and biologic factors as covariables. A two-sided probability value of $P < .05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were carried out with SPSS version 11.0 software (Chicago, IL).

Results

Clinical data of patients are presented in Table 1. Fifty-three patients (55.7%) showed impaired functional class (NYHA \geq II), and only six patients presented systolic

dysfunction (6.3%). Forty-three patients (45%) presented angina, and sixty-nine patients (72.6%) showed late gadolinium enhancement assessed by cardiac MRI.

hs-TnT Serum Levels in HCM: Association With Clinical Features

The level of hs-TnT was higher in HCM patients than in healthy control subjects. We found increased hs-TnT levels (above the cutoff point of 0.014 ng/mL) in 40 patients (42.1%) and in only two control subjects (4.4%; $P < .001$), both of them practicing frequent and intense sport activity, which could explain increased hs-TnT levels.¹⁶ Serum hs-TnT values of six patients remained below the lower detection limit of the assay (0.003 ng/mL), whereas only 13 control subjects showed hs-TnT levels above the detection limit.

The hs-TnT concentrations were increased in patients with dyspnea. 68.8% of patients with NYHA functional class \geq III showed elevated hs-TnT versus patients with NYHA functional class <III, where only 37.2% showed high hs-TnT levels ($P = .020$; Table 2): 0.014 (0.009–0.026) ng/mL in those patients presenting impaired functional class (NYHA \geq III) versus 0.010 (0.005–0.017) ng/mL ($P = .048$). Moreover, Fig. 1A shows a higher level of serum hs-TnT in patients with severe dyspnea (NYHA functional class ≥ 3) than in patients with no severe dyspnea (NYHA functional class <3; $P = .004$). Serum hs-TnT levels was associated with outflow obstruction ($P = .013$), systolic dysfunction ($P = .037$), and abnormal blood pressure response ($P = .036$; Table 2).

hs-TnT Serum Levels in HCM: Correlations With Echocardiographic Data and NT-proBNP

By bivariate correlations (Spearman method), LV end-diastolic diameter, LV end-systolic diameter, and LV ejection fraction did not correlate with serum concentrations of hs-TnT (Table 3). On the other hand, we did find significant positive correlations for the maximum LV wall thickness ($r = 0.47$; $P < .001$), indexed left atrial diameter ($r = 0.36$; $P < .001$), LV outflow tract systolic gradient ($r = 0.28$; $P = .008$), and the E/E' ratio (ratio of mitral peak velocity of early filling, E to early diastolic mitral annular velocity, E') with hs-TnT levels ($r = 0.32$; $P = .020$). Despite higher levels of NT-proBNP in patients (222 [117–500] pg/mL) than in control subjects (17 [11–41] pg/mL; $P < .001$), there was no significant association between hs-TnT and NT-proBNP levels ($r = 0.16$; $P = .132$). CRP also showed no significant correlation with hs-TnT ($r = 0.01$; $P = .99$).

hs-TnT Serum Levels in HCM: Association With the Cardiac MRI Study

The results of the cardiac MRI study in our patients revealed an interested association between hs-TnT serum levels and late gadolinium enhancement ($P = .021$; Table 2). In particular, we found higher hs-TnT levels in patients showing late gadolinium enhancement in the cardiac

Table 1. Baseline Characteristics of the Studied Patients and Control Subjects

Clinical Variable	Patients (n = 95)	Healthy Control Subjects (n = 45)	P Value
Male gender	72 (75.8%)	31 (68.9)	.387
Age	45.7 ± 14.2	46.4 ± 9.9	.771
NYHA functional class			
I	42 (44.3%)	—	
II	37 (38.9%)	—	
III	16 (16.8%)	—	
Hypertension	25 (26.3%)	8 (17.8)	.266
Familiar sudden death	23 (24.2%)	—	
Angina	43 (45%)	—	
Syncope	16 (16.8%)	—	
Maximum LV wall thickness (≥30 mm)	5 (5.3%)	—	
E/A ratio	1.30 (0.86–1.57)	—	
LVOTSG > 30 mmHg	38 (40.0%)	—	
AF	16 (16.8%)	—	
Abnormal blood pressure response (n = 85)	30 (35.3)	—	
METs	9.4 ± 3.3	—	
Systolic ventricular dysfunction	6 (6.3%)	—	
LVEF	67.3 ± 10.5	—	
Nonsustained ventricular tachycardia	27 (28.4%)	—	
MLVT	20.5 ± 5.1	—	
LVEDD	43.8 ± 6.8	—	
LEVSD	24.9 ± 6.5	—	
LAD	43.5 ± 6.8	—	
LGE	69 (72.6)	—	
hsTnT ng/mL	0.012 (0.007–0.018)	0.003 (0.003–0.004)	<.001
NT-proBNP pg/mL	228 (117–500)	17 (11–41)	<.001
CRP	0.150 (0.080–0.240)	0.100 (0.007–0.230)	.211

AF, atrial fibrillation; CRP, C-reactive protein; E/A ratio, ratio of the early and late waves of spectral Doppler of ventricular filling; hs-TnT, high-sensitivity troponin T; LAD, left atrial diameter; LGE, late gadolinium enhancement; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; LVOTSG, left ventricular outflow tract systolic gradient; METs, metabolic equivalents; MLVT, maximal left ventricular wall thickness; NYHA, New York Heart Association functional class; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide.

MRI study (0.013 [0.009–0.023] ng/mL) compared with patients without enhancement (0.009 [0.004–0.013] ng/mL; $P = .045$), these levels being even lower in control subjects (0.005 [0.004–0.006] ng/mL; $P = .013$). Figure 1B displays the difference between serum hsTnT levels between patients presenting fibrosis in the MRI, patients without fibrosis, and control subjects. We also observed that patients presenting elevated serum levels of hs-TnT showed significantly more

affected segments in the MRI than those with low hs-TnT levels (4 [0–7] vs 1 [0–5]; $P = .022$).

Univariate logistic regression analyses of the data (Table 4) corroborated the interesting and strong association between elevated hs-TnT levels and the presence of fibrosis in cardiac MRI study (odds ratio [OR] 3.24 [95% confidence interval (CI) 1.16–9.04]; $P = .025$). We also found significant association between the normalized number of affected segments (NNAS): 0 = 0 affected segments; 1 = 1–2 affected segments; 2 = ≥3 affected segments) in the MRI study and the elevation in hs-TnT levels (OR 1.5 [1.0–2.2]; $P = .038$).

Finally, severe dyspnea (3.72 [1.17–11.77]; $P = .026$), abnormal blood pressure response (2.63 [1.05–6.55]; $P = .038$), and the presence of LV outflow tract obstruction (2.90 [1.24–6.82]; $P = .014$) also showed significant association with elevated hs-TnT levels.

Discussion

This study showed that hs-TnT serum levels were elevated in up to 42% of our cohort of patients with HCM, and in only 4.4% of healthy paired control subjects. Importantly, the HCM patients were stable patients attending to routine follow-up in our referral outpatient clinics. This elevation may reflect a continuous myocyte loss due to a moderate range of necrosis, and it is associated with parameters of HCM severity as the functional class, systolic

Table 2. hs-TnT Serum Elevation in Relation to Comorbidities Associated With Cardiomyopathy Patients

Condition	TnT ≥0.014		P Value
	Yes (%)	No (%)	
Male gender	40.3	47.8	.523
Systemic arterial hypertension	36.0	44.3	.471
History of syncope	43.8	42.3	.915
Angina	46.5	42.5	.410
Sudden death in family	30.4	47.1	.160
History of atrial fibrillation	37.5	43.6	.654
LVOTSG > 30 mm Hg	57.9	32.1	.013
MLVT ≥30 mm	80.0	40.4	.102
Abnormal blood pressure response	60.0	36.4	.036
NSVT	51.9	39.1	.260
LGE	49.3	23.1	.021
Dyspnea ≥2	50.0	32.5	.090
Severe dyspnea ≥3	68.8	37.2	.020
Systolic dysfunction	83.3	39.8	.037

NSVT, Nonsustained ventricular tachycardia; other abbreviations as in Table 1.

Cutoff point for hs-TnT = 0.014 ng/mL.

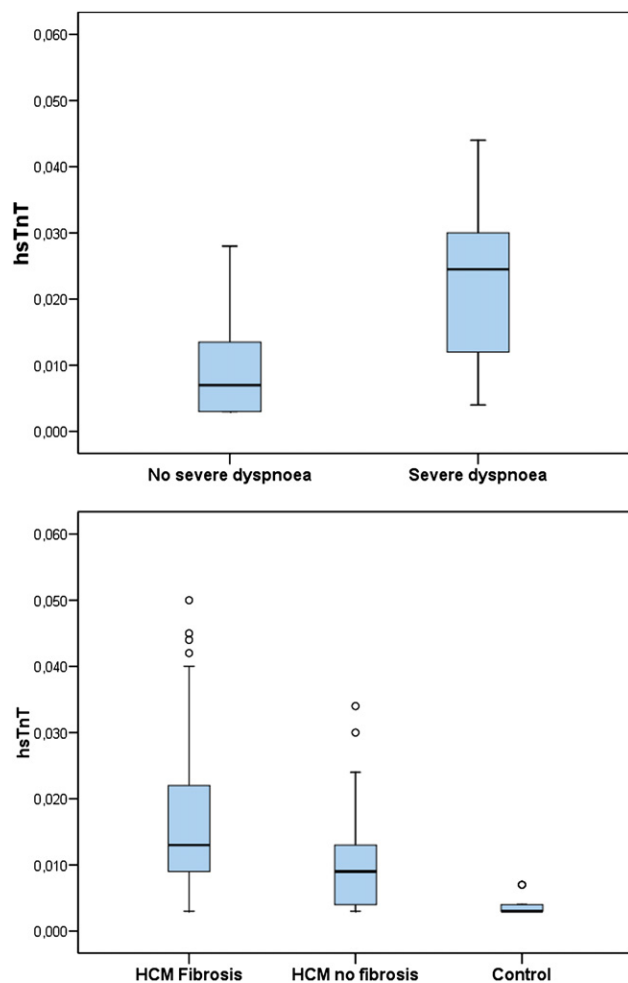


Fig. 1. (A) High-sensitivity troponin T (hs-TnT) levels in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) patients with different functional class ($P = .004$). (B) hsTnT levels in HCM patients presenting fibrosis or not ($P = .054$) and healthy control subjects ($P = .013$).

dysfunction, and fibrosis assessed by cardiac MRI. Therefore, we propose, for the first time, that hs-TnT could be an important biomarker in HCM, reporting the presence of myocardial damage in these patients.

Troponins I and T are very sensitive and specific indicators of cardiac myocyte injury, and they have been shown to be independent prognostic predictors in acute coronary syndromes.² In patients with acute decompensated heart failure, a positive cardiac troponin test is associated with higher in-hospital mortality, independently of other predictive variables.¹⁷ In outpatients with stable chronic heart failure of a nonischemic nature, the detection of TnT, even at low levels, means an increased risk of adverse cardiac events, which seems to be independent of other clinical, analytical, and ECG variables.¹⁸ A very recent publication by Omland et al¹⁹ describes a low but detectable increase in hs-TnT circulating levels in stable coronary artery disease patients by using the same methods described in the present study. Those authors presented the first report of hs-TnT elevation in patients with stable coronary artery

Table 3. Correlations Between hs-TnT and Echocardiographic Data (n = 95 > Patients)

	r Value	P Value
Age	0.098	.343
LAD	0.362	<.001
LAV	0.248	.052
MLVT	0.465	<.001
LVOTSG	0.276	.008
NT-proBNP	0.156	.132
CRP	0.002	.987
LVEDD	0.100	.339
LVEDS	0.134	.202
LVEF	0.005	.960
E/A ratio	0.156	.140
E/E' ratio	0.323	.020

E/E' ratio, ratio of mitral peak velocity of early filling (E) to early diastolic mitral annular velocity (E'); LAV, indexed left atrial volume; other abbreviations as in Table 1.

disease and its association with the incidence of cardiovascular death and heart failure. Here we have shown that HCM patients also presented higher levels of hs-TnT than control subjects, but, as expected, this increase was relatively low if than those observed in acute coronary processes. We demonstrated the relevance of the hs-TnT detection in nonacute processes also and showed how this high-sensitivity measurement can raise the percentage of TnT-positive patients up to 42%.

In earlier studies based on chronic stable patients, only <10% of patients showed elevated TnT when determined with classic methods.¹⁸ Even in acute heart failure patients, a large cohort study revealed that only 6.2% of patients were positive for classically measured troponins.¹⁷ Another study including 60 patients with dilated cardiomyopathy showed up to 28.3% of TnT-positive patients in samples taken in an acute or subacute moment.³ Pop et al²⁰ showed that troponin released above normal values may be present in patients with HCM without overt coronary heart disease.

Table 4. Association of Elevated hs-TnT Levels With Clinical Features

	OR	P Value
Age	1.01 (0.98–1.04)	.614
Male gender	0.74 (0.29–1.89)	.524
Systemic Arterial Hypertension	0.71 (0.28–1.82)	.472
Sudden death family	0.49 (0.18–1.34)	.165
History of syncope	1.06 (0.36–3.14)	.915
History of atrial fibrillation	1.29 (0.43–3.30)	.654
LVOTSG > 30 mm Hg	2.90 (1.24–6.82)	.014
MLVT ≥ 30 mm	5.89 (0.63–54.87)	.119
Abnormal blood pressure response	2.63 (1.05–6.55)	.038
NSVT	1.68 (0.68–4.16)	.262
LGE	3.24 (1.16–9.04)	.025
Dyspnoea ≥ 2	2.08 (0.89–4.86)	.092
Severe dyspnoea ≥ 3	3.72 (1.17–11.77)	.026
Systolic dysfunction	7.57 (0.85–67.6)	.070
NNAS	1.51 (1.0–2.2)	.038

NNAS, normalized number of affected segments in the magnetic resonance imaging study (0 = 0 affected segments; 1 = 1–2 affected segments; 2 = 3 or more affected segments); other abbreviations as in Table 1.

Univariate logistic regression analyses (n = 95 patients). Cutoff point for hs-TnT = 0.014 ng/mL.

Sato et al² demonstrated that HCM patients with increased serum TnT concentrations had a decrease in LV fractional shortening and ventricular septal thickness on echocardiogram during follow-up, and they suggested TnT as an indicator of subclinical myocyte injury and/or progression to dilated HCM. They found 50% TnT-positive patients in a small sample of 30 HCM patients, supporting our results.² Furthermore, we showed that hs-TnT levels are associated with severity parameters in a cohort of HCM patients. Longitudinal studies are necessary to determine whether hsTnT levels can be a reliable predictive biomarker in prognosis.

Diastolic dysfunction is a major pathophysiologic abnormality in HCM. Left ventricular filling pressures can be estimated with reasonable accuracy by measuring E velocity/flow propagation velocity or E/E'. These ratios also track changes in filling pressures.¹³ In earlier studies, these parameters identified patients with low exercise capacity.²¹ However, other studies show that the use of transmitral flows and mitral annular velocities correlate modestly with direct measurement of left atrial pressure in patients with HCM.^{22,23} Our study showed a low but significant association between E/E' ratio and increased hs-TnT levels. In a recent study by Kubo et al,²⁴ multivariate analysis revealed an independent relationship between cTnI and maximum LV wall thickness, E/E' ratio, and male gender.

Recently, LAV has been proposed as a good index of diastolic function; it is a marker of "pressure burden" and has been proposed as an excellent predictor of adverse cardiovascular outcomes. Left atrial size has become a valuable tool in the diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction. In HCM, left atrial remodeling has been shown to be associated with greater LV hypertrophy, more diastolic dysfunction, higher filling pressures, worse functional class, and higher risk of atrial arrhythmias.¹³ We found a strong correlation between TnT levels with the left atrial diameter, but we were unable to find a significant correlation with LAV.

The pathologic changes observed in cardiac myocytes and fibroblasts are important components of cardiac remodeling. Besides myocyte injury and apoptosis, fibroblasts and collagen turnover also play important roles in myocardial remodeling.^{25,26} Coronary microvascular dysfunction, severe hypertrophy, and myocyte disarray are associated with an unfavorable outcome in patients with HCM.⁷ They are determinants of ischemia and mismatch between oxygen demand and supply, which could be the explanation of the increased TnT levels in HCM patients. This ischemic state is the consequence, among other mechanisms, of the endothelial dysfunction due to abnormalities of small intramural coronary arteries that become significantly more common in tissue sections having considerable myocardial fibrosis than in those with no or mild fibrosis.²⁷ We have recently found increased levels of von Willebrand factor, an established marker of endothelial damage/dysfunction.²⁸ Cecchi et al²⁹ found that the severity of coronary microvascular dysfunction, assessed by proton emission tomography, was an independent predictor of long-term clinical

deterioration and death from cardiovascular causes in HCM patients. The microvascular dysfunction is a possible cause of elevated TnT levels. Therefore, those data support those obtained in the present study. The association between TnT concentration and fibrosis presence has been previously observed in idiopathic dilated cardiomyopathy and secondary cardiomyopathy groups, where a subgroup of patients with raised concentrations of serum collagen and TnT showed poor short-term prognosis. In line with the findings of the present study, something similar occurs in HCM patients, which would explain the association of hs-TnT levels with the degree of fibrosis assessed by MRI and LV systolic dysfunction.

The principal limitation of the present study lies in its purely cross-sectional design. We could perform only association analyses, but long-term follow-up of our patients would likely provide additional information to corroborate the proposed value of hs-TnT for predicting progression to poor clinical states. In addition, this observational study was based on an unselected patient cohort referred to the specialized participating clinics; therefore, it is subject to potential biases and interactions among the different variables studied. Thus, the sample characteristics were typical of those seen in specialized HCM clinics, with a more severe profile of the disease than that of the overall population of HCM patients.

In conclusion, based on the present results and those of earlier studies, our working hypothesis that an increase in hsTnT levels could be a reliable biomarker of cardiac remodeling in HCM as an indicator of subclinical ongoing myocyte damage and, consequently, could be important if functional status has been tested. We believe that the hs-TnT serum level could be a good novel marker to predict and/or indicate deteriorating clinical state, degree of fibrosis, and progression to LV systolic dysfunction in HCM.

Disclosures

None.

References

1. Varnava AM, Elliott PM, Sharma S, McKenna WJ, Davies MJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart* 2000;84:476–82.
2. Sato Y, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, Yamada T, et al. Measurements of cardiac troponin T in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2003;89:659–60.
3. Sato Y, Yamada T, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, et al. Persistently increased serum concentrations of cardiac troponin T in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy are predictive of adverse outcomes. *Circulation* 2001;103:369–74.
4. Hudson MP, O'Connor CM, Gattis WA, Tasissa G, Hasselblad V, Holleman CM, et al. Implications of elevated cardiac troponin T in ambulatory patients with heart failure: a prospective analysis. *Am Heart J* 2004;147:546–52.

5. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009;361:858–67.
6. Cambronero F, Marín F, Roldán V, Hernández-Romero D, Valdés M, Lip GY. Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur Heart J* 2009;30:139–51.
7. Olivetto I, Cecchi F, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Girolami F, et al. Relevance of coronary microvascular flow impairment to long-term remodeling and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1043–8.
8. Roldán V, Marín F, Gimeno J, Ruíz-Espejo F, Gonzalez J, Feliu J, et al. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic myocardial pathology. *Am Heart J* 2008;156:85–91.
9. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989;64:1041–50.
10. Moon JCC, Reed E, Sheppard MN, Elkington AG, Ho SY, Burke M, et al. The histologic basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2260–4.
11. Payá E, Marín F, Gonzalez J, Gimeno JR, Feliu E, Romero A, et al. Variables associated with contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy: clinical implications. *J Cardiac Fail* 2008;14:414–9.
12. Saura D, Marín F, Climent J, González J, Roldán V, Hernández-Romero D, et al. Left atrial remodeling in hypertrophic cardiomyopathy: relation with exercise capacity and biochemical markers of tissue strain and remodeling. *Int J Clin Pract* 2009;10:1465–71.
13. Nagueh SF, Lakkis NM, Middleton KJ, Spencer WH, Zoghbi WA, Quiñones MA. Doppler estimation of left ventricular filling pressures in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1999;99:254–61.
14. Maron BJ, Tholakanahalli VN, Zenovich AG, Casey SA, Duprez D, Aeppli DM, Cohn JN. Usefulness of B-type natriuretic peptide assay in the assessment of symptomatic state in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109:984–9.
15. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for health-care professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 2002;105:5439–42.
16. Middleton N, George K, Whyte G, Gaze D, Collinson P, Shave R. Cardiac troponin T release is stimulated by endurance exercise in healthy humans. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1813–4.
17. Peacock VF IV, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wyne J, Apple FS, et al. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med* 2008;358:2117–26.
18. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernández S, Pastor FJ, Garrido IP, Casas T, Sánchez Mas J, et al. Troponin-T monitoring in outpatients with nonischemic heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:678–86.
19. Omland T, de Lemos JA, Sabatine MS, Christophi CA, Rice MM, Jablonski KA, et al. A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;361:2538–47.
20. Pop GA, Cramer E, Timmermans J, Bosh H, Verheugt FW. Troponin I release at rest and after exercise in patients with hypertrophic cardiomyopathy and the effect of betablockade. *Arch Cardiol Mex* 2006;76:415–8.
21. Matsumura Y, Elliott PM, Virdee MS, Sorajja P, Doi Y, McKenna WJ. Left ventricular diastolic function assessed using Doppler tissue imaging in patients with hypertrophic cardiomyopathy: relation to symptoms and exercise capacity. *Heart* 2002;87:247–51.
22. Losi MA, Nistri S, Galderisi M, Betocchi S, Cecchi F, Olivetto I, et al. Echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy: usefulness of old and new techniques in the diagnosis and pathophysiological assessment. *Cardiovasc Ultrasound* 2010;8:1–19.
23. Geske JB, Sorajja P, Nishimura RA, Ommen SR. Evaluation of left ventricular filling pressures by Doppler echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy: correlation with direct left atrial pressure measurement at cardiac catheterization. *Circulation* 2007;116:2702–8.
24. Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Yamanaka S, Hirota T, Hoshikawa E, et al. Serum cardiac troponin I is related to increased left ventricular wall thickness, left ventricular dysfunction, and male gender in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 2010;33:E24–8.
25. Cohn JN, Ferrari R, Sharp N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569–82.
26. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981–8.
27. Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Robert WC. Intramural (“small vessel”) coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:545–57.
28. Cambronero F, Vilchez JA, García-Honrubia A, Ruiz-Espejo F, Moreno V, Hernández-Romero D, et al. Plasma levels of von Willebrand factor are increased in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Thromb Res* 2010;126:e46–50.
29. Cecchi F, Olivetto I, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Camiri PG. Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003;349:1027–35.

Letter to the Editor

Collagen peptides, interstitial remodelling and sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy

Juan A. Vílchez¹, Diana Hernández-Romero²,
Francisco Ruiz-Espejo¹, Antonio Garcia-Honrubia³,
Mariano Valdés², Pedro Martínez-Hernández¹ and
Francisco Marín^{2,*}

¹ Clinical Analysis Service, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

² Cardiology Service, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, University of Murcia, Spain

³ Cardiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

Keywords: collagen peptides; fibrosis; hypertrophic cardiomyopathy.

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterised by inappropriate hypertrophy, small-vessel coronary artery disease, myocyte disarray and increased interstitial fibrosis (1). A continuous extracellular matrix turnover appears in HCM, leading to an increase of interstitial fibrosis due to the higher amount of collagen type I/III deposited. The presence of late gadolinium enhancement (LGE), assessed by cardiac magnetic resonance (MRI), seems to reflect an increase in myocardial fibrosis (2, 3). We have recently read the interesting study by Lin et al. (4), exploring the interstitial remodelling, by measuring the serum levels of type III aminoterminal propeptide of procollagen (PIIINP) in heart failure (HF) patients. In this study, PIIINP is proposed as a serum biomarker of cardiac autonomic control and risk of sudden cardiac death (SCD). Interestingly, a recent report by Ho et al. (5), also studied different biomarkers of fibrosis and interstitial remodelling and revealed that serum type I carboxy-terminal propeptide of procollagen (PICP) seems to indicate increased myocardial collagen synthesis in sarcomere-mutation carriers without overt disease. They proposed that this profibrotic state precede the development of left ventricular hypertrophy or fibrosis visible on MRI (5). Fibrosis may provide electrical heterogeneity and a substrate for arrhythmogenicity, which may cause SCD, a feared first symptom that can appear at the onset of both pathologies (HF and HCM) (4, 6). The aim of the present study was to evaluate the collagen turnover in HCM by the serum collagen peptides and their relation with different clinical values of the severity of the disease.

*Corresponding author: Francisco Marín, MD, PhD, Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca Ctra. Madrid-Cartagena, El Palmar, Murcia, Spain
Phone/Fax: +34 968 398115, E-mail: fcomarino@hotmail.com

We included 95 HCM patients, 72 males, aged 45.7 ± 14.2 years and 45 healthy control subjects. A complete history and clinical examination were performed, including electrocardiogram, echocardiography, 24 h ECG-Holter monitoring and symptom limited treadmill exercise test performed Bruce protocol. Risk factors for sudden death were evaluated. A blinded cardiac MRI was performed with an LGE study. Serum levels of PIIINP were measured by radioimmunoassay and three peptides resulting from collagen I synthesis: PICP, type I aminoterminal propeptide of procollagen (PINP) and degradation C-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP), measured by commercial ELISA.

All recruited subjects gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the Local Research Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, as amended in Edinburgh in 2000.

Patients presented higher levels of ICTP than controls and higher levels of the ratio PICP/ICTP (Table 1). PICP levels were raised in HCM patients without hypertension (107.6 ± 32.2 vs. 130.6 ± 60.6 ng/mL; $p=0.021$) and in those with history of familiar SCD (144.7 ± 71.8 vs. 118.3 ± 47.5 ng/mL; $p=0.047$). PINP levels were increased in patients with severe maximal left ventricular wall thickness [$112.7(82.1-143.3)$ vs. $26.7(24.0-36.4)$ ng/mL; $p=0.001$]. PIIINP levels were raised in patients with history of recurrent syncope [$4.96(3.60-6.50)$ vs. $3.55(2.80-4.31)$ $\mu\text{g/L}$; $p=0.007$]. We did not find any significant association with non-sustained ventricular tachycardia, abnormal blood pressure response to effort test, severe functional class, atrial fibrillation, significant obstruction, or LGE observed in MRI. PICP ($r=-0.27$; $p=0.009$) and PINP ($r=0.55$; $p=0.001$) correlated with age. PINP correlated with maximal left ventricular wall thickness ($r=0.77$; $p=0.001$). ICTP correlated with left atrial diameter ($r=-0.237$; $p=0.023$). PIIINP correlated with effort capacity in metabolic equivalent units.

There are few studies investigating the role of collagen peptides in HCM. Lombardi et al. (7) also showed that collagen turnover was enhanced in HCM, presenting increased concentrations of PIIINP and ICTP compared to healthy controls. Also defended that collagen I synthesis prevails over degradation and correlated a passive dysfunction in HCM patients, as seen in other studies (8). Data presented by Ho et al. showed elevated levels of PICP in HCM patients without overt disease, reflecting an increased myocardial collagen synthesis on the early disease (5). We did not find that relation in our study population with developed HCM (72.6% of them presented fibrosis), however, we were able to find a higher ratio PICP/ICTP in patients compared to controls as Ho et al. and previous studies (5, 9). We propose the use of

Table 1 Baseline characteristics of the studied patients and controls.

Clinical variables	Patients (n: 95)	Healthy controls (n: 45)	p-Value
Male sex, %	72 (75.8)	31 (68.9)	0.387
Age	45.7 ± 14.2	46.4 ± 9.9	0.771
NYHA I, %	42 (44.3)		
NYHA II, %	37 (38.9)		
NYHA III, %	16 (16.8)		
(New York Heart Association functional class)			
Hypertension, %	25 (26.3)	8 (17.8)	0.266
Familiar sudden death, %	23 (24.2)	–	
Angina, %	43 (45.0)	–	
Unexplained recurrent syncope, %	16 (16.8)	–	
Atrial fibrillation, %	16 (16.8)	–	
Left ventricular E/A ^a ratio	1.30 (0.86–1.57)	–	
Left ventricular outflow tract systolic gradient > 30 mm Hg, %	38 (40.0)	–	
LVEF (left ventricular ejection fraction)	67.3 ± 10.5		
Maximal left ventricular wall thickness ≥ 30 mm, %	5 (5.3)	–	
Non-sustained ventricular tachycardia in Holter-ECG, %	27 (28.4)	–	
Abnormal blood pressure response, % (n=85)	30 (35.3)	–	
Late gadolinium enhancement, %	69 (72.6)	–	
PICP, ng/mL	124.5 ± 55.3	110.2 ± 43.2	0.145
PINP, ng/mL	27.3 (24.4–38.6)	33.2 (26.5–39.6)	0.937
ICTP, µg/L	2.35 (1.15–3.94)	1.78 (1.27–2.78)	0.041
PIIINP, µg/L	3.67 (2.83–4.55)	3.41 (2.81–4.19)	0.129
Ratio PICP/ICTP	48.0 (31–96.3)	46.8 (32.2–70.0)	0.026

^aE/A ratio, ratio of the early and late waves of spectral Doppler of ventricular filling.

the ratio PICP/ICTP as a synthesis-degradation marker of type I collagen turnover, to estimate the degree of interstitial fibrosis with a simple serum test in HCM. Moreover, HCM can lead to SCD, mainly due to ventricular tachycardia and it is known that HCM is the most common cause of SCD in young competitive athletes (10). We found higher PIIINP levels in patients with recurrent syncope and higher PICP levels in patients with familiar history of SCD. These data suggest a collagen remodelling involvement in the development of HF and SCD in our patients, as described by Lin et al. (4). The fact that we only found occasional associations of different peptides of collagen type I/III with clinical values and not with diastolic dysfunction assessed by Doppler echocardiography, the gradients of obstruction or the percentage of fibrosis assessed on MRI, highlights the need of deeper studies in order to establish their potential clinical use as biomarkers on HCM.

Acknowledgments

This study has been funded by an FIS PS09/00721 project for the Instituto de Salud Carlos III, and partially by Funding FEDER. Dr Hernández-Romero holds a postdoctoral position funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this

article. Research funding played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

- Varnava AM, Elliott PM, Sharma S, McKenna WJ, Davies MJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart* 2000;84:476–82.
- Paya E, Marin F, Gonzalez J, Gimeno JR, Feliu E, Romero A, et al. Variables associated with contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy: clinical implications. *J Card Fail* 2008;14:414–9.
- Weber KT. From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway. *Hypertension* 2004;43:716–9.
- Lin YH, Lin C, Lo MT, Lin HJ, Wu YW, Hsu RB, et al. The relationship between aminoterminal propeptide of type III procollagen and heart rate variability parameters in heart failure patients: a potential serum marker to evaluate cardiac autonomic control and sudden cardiac death. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48:1821–7.
- Ho CY, Lopez B, Coelho-Filho OR, Lakdawala NK, Cirino AL, Jarolim P, et al. Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2010;363:552–63.
- Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *J Am Med Assoc* 1996;276:199–204.

7. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, et al. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;108:1455–60.
8. Roldan V, Marin F, Gimeno JR, Ruiz-Espejo F, Gonzalez J, Feliu E, et al. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2008;156:85–91.
9. Shim CY, Ha JW, Choi EY, Lee HJ, Moon SH, Kim JM, et al. Relationship between serum biochemical markers of myocardial fibrosis and diastolic function at rest and with exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Korean Circ J* 2009;39:519–24.
10. Stroumpoulis KI, Pantazopoulos IN, Xanthos TT. Hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *World J Cardiol* 2010;2:289–98.



Original article

Growth differentiation factor-15, a novel biomarker related with disease severity in patients with hypertrophic cardiomyopathy

Silvia Montoro-García^a, Diana Hernández-Romero^a, Eva Jover^a, Antonio García-Honrubia^b, Juan A. Vilchez^c, Teresa Casas^c, Pedro Martínez^c, Vicente Climent^b, Luis Caballero^b, Mariano Valdés^a, Francisco Marín^{a,*}

^a Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, University of Murcia, Spain

^b Department of Cardiology, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

^c Department of Clinical Analysis, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2011

Received in revised form 1 August 2011

Accepted 19 August 2011

Available online 15 September 2011

Keywords:

GDF-15

HCM

Biomarker

Clinical features

Interstitial remodeling

ABSTRACT

Background: The growth differentiation factor 15 (GDF-15) has been shown up-regulated in stress conditions and to have regulatory actions in myocyte hypertrophy. We hypothesized that GDF-15 could be related to disease severity and functional status in patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM).

Methods and results: We performed a study which includes 102 consecutive outpatient HCM subjects, 73% males, aged 47.1 ± 14.6 years. A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram, echocardiography, symptom-limited treadmill exercise, 24-hour ECG-Holter monitoring, and magnetic resonance with Gadolinium. Several biomarkers, associated with myocardial remodeling and damage, were compared to GDF-15 levels. The assays were performed with commercial ELISAs or standardized methods when available. There was a significant association between GDF-15 levels and comorbidities, being higher in hypertension ($p = 0.001$), diabetes ($p = 0.030$), atrial fibrillation ($p = 0.012$), dyspnea ($p = 0.020$) and NYHA \geq II functional class ($p = 0.037$). GDF-15 levels were positively correlated with clinical variables (age, worse exercise capacity and mild renal dysfunction) and biomarkers of interstitial remodeling, such as metalloproteinase-2 ($r: 0.40$; $p = 0.009$), N-terminal pro-B-type natriuretic peptide ($r: 0.28$; $p = 0.049$), high-sensitivity troponin T ($r: 0.30$; $p = 0.003$) and von Willebrand factor ($r: 0.33$; $p = 0.001$). Multivariate analysis was assessed to estimate the involvement of these different factors in the GDF-15 levels, confirming the independent implication of severe dyspnea and functional status.

Conclusions: The present results show that higher levels of GDF-15 are associated to conditions of severe disease in HCM. Hence, GDF-15 is suggested as a novel marker related to the severity and could represent a further useful tool in monitoring functional capacity of HCM patients.

© 2011 European Federation of Internal Medicine. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Growth differentiation factor-15 (GDF-15) is a member of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily. This large family of related proteins can be subdivided into two main groups: the TGF- β /Activin and bone morphogenetic protein and the GDF branches, based on their sequence similarity [1]. These cytokines are involved in a wide variety of tissue differentiation and proliferation

processes [2]. Investigators have found GDF-15 expression in most epithelial tissues and brain in baseline conditions, but not in heart [3,4]. Nonetheless, clinical studies have shown that cardiovascular diseases such as ischemia [5], inflammation [6], or injury [7] notoriously up-regulate GDF-15 expression in the heart. These pathologic situations could indicate that this factor acts as a stress sign for the cardiomyocytes; however the real pathophysiological involvement is still an intriguing clue. In this regards, infusion of recombinant GDF-15 has been shown to repress pro-inflammatory cell recruitment after myocardial infarction in vivo [8], however, contrary data point out to GDF-15 as a stimulative cytokine of CCR2 in early and later atherosclerosis and therefore inducing an inflammatory state [9]. Indeed, several clinical and experimental reports have provided evidence of a link between GDF-15 and vascular disorders [10–12], additionally, increased levels of GDF-15 were associated with poor prognosis in acute coronary syndrome [13] and, more recently in heart failure [14]. Although it has not been formally demonstrated, these observations suggest

Abbreviations: GDF-15, growth differentiation factor-15; TGF- β , transforming growth factor β ; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; MET, metabolic equivalent; NYHA, New York Heart Association; cMRI, cardiac magnetic resonance imaging; NT-proBNP, amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; hs-TnT, high-sensitivity troponin T; vWF, von Willebrand factor; MIC-1, macrophage inhibitor cytokine-1.

* Corresponding author at: Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra Madrid-Cartagena s/n. Murcia, 30120, Spain.

E-mail address: fcomarino@hotmail.com (F. Marín).

that elevated GDF-15 levels identify high-risk patients across a broad spectrum of cardiovascular diseases [15] and that it might display a regulatory role in the process of hypertrophy [16,17].

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterized by an inappropriate hypertrophy, small vessel coronary artery disease, myocyte disarray and increased interstitial fibrosis. During the evolution of the hypertrophic disease, myocardium suffers a heterogeneous remodeling which includes enhancement of extracellular matrix but also active loss of myocytes [18]. The symptoms are related to diverse pathophysiological mechanisms including diastolic dysfunction, dyspnea, atrial fibrillation and eventually heart failure, besides increased risk of sudden death, mainly in young people [18]. The mechanisms of ongoing myocardium damage in the HCM are still poorly understood, however several pathways have been found directly implicated in the disease, such as the matrix metalloproteinase (MMP) system [19]. Moreover, our group has recently found that high-sensitivity Troponin T (hs-TnT) is increased in stable HCM patients compared to controls [20], and it is associated with late gadolinium enhancement, a newly proposed marker of bad prognosis [21]. Thus, the measurement of biomarkers in HCM seems to provide promising information about myocardial damage and prognosis [22]. In this sense, increasing attention has been arising towards GDF-15 as a marker of multiple stress pathways in myocardium; we therefore hypothesized a change in GDF-15 levels related to HCM disease severity.

2. Materials and methods

2.1. Study population

In order to evaluate whether GDF-15 levels were associated with parameters of severity of the disease, a study up to 102 consecutive HCM patients was performed, consisting of 73% males aged 47.1 ± 14.6 years old.

HCM patients were recruited from outpatient clinics of two hospitals in Spain (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca from Murcia and Hospital General Universitario from Alicante). The criteria for diagnosis of HCM were the presence of a left ventricular wall thickness of at least 15 mm without any other cause that could lead to ventricular hypertrophy [23]. In the case of first degree relatives of affected individuals, proposed familial criteria were used (mainly based on symptoms and echocardiographic screening) [24]. Exclusion criteria for eligible patients were concomitant neoplasm, infection, connective tissue disease, significant renal dysfunction as identified by creatinine level ≥ 2.0 mg/dL, thyroid dysfunction, demonstrated ischemic heart disease with no revascularization within the past 6 months, significant peripheral vascular disease, pacemaker, anticoagulant treatment, and inflammatory disease. Secondary or refractory essential hypertension with need of two or more drugs or with the requirement of a second drug within the past 6 months were also considered as exclusion criteria.

A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram, echocardiography, symptom-limited treadmill exercise test and 24-hour ECG-Holter monitoring. Exercise treadmill test was performed by Bruce's protocol. Maximal exercise was continued until patient exhaustion. Metabolic equivalent (MET) units were calculated, one MET is equivalent to a metabolic rate consuming 3.5 ml of oxygen per kilogram of body weight per minute. Patients underwent cMRI and administration of gadolinium-DTPA (0.2 mmol/Kg), as has already been described [20]. Then, using this threshold, we looked at all the images checking the gadolinium enhancement areas.

Risk factors for sudden death were evaluated (personal and family history of sudden death, recurrent unexplained syncope, maximal wall thickness >30 mm, rest left ventricular outflow tract gradient >30 mmHg, abnormal blood pressure response during effort test, and non-sustained ventricular tachycardia). Patients were classified according to symptoms to everyday activities in the New York Heart Association (NYHA) classification, class I presenting no limitations

of activities whereas class II and III presenting mild and marked limitations, respectively. Patients with marked limitations in rest (class IV) were not included in the present study. All patients and controls gave their signed consent to participate. The Research Ethics Committee of the two centers approved the study.

2.2. Laboratory analysis

Venous blood samples were collected in the morning on fasted patients and controls. Citrated plasma and serum fractions were obtained by centrifugation for 15 min at 3500 g, samples were stored frozen at -40 °C until further analysis. GDF-15 plasma levels were assayed by commercial ELISA (Biovendor, Modrice, Czech Republic). The minimum detectable concentration was ranged linear from 22 to 4480 pg/mL, intra-assay and inter-assay variabilities were 7.2% and 9.5%, respectively. Results exceeding plasma GDF-15 level of 4480 pg/mL were repeated at higher dilution. Plasma matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and von Willebrand factor (vWF) levels were also assayed by commercial ELISA (Biotrack, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden and Zymutest, Aniera Corporation, Mason, Ohio, USA, respectively). Serum N-terminal proB-type natriuretic peptide (NT-proBNP) was determined using a Roche Diagnostics proBNP assay on an Elecys 2010 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Serum hs-TnT was assayed by a Cobas 6000 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

2.3. Statistical analysis

Each categorical variable is expressed as frequency (percentage) of patients. Continuous variables were tested for normal distribution by the Kolmogorov–Smirnov test. The normal distributed continuous variables are shown as mean \pm SD, and those non-parametrically distributed (i.e. GDF-15 concentrations) are shown as median [interquartile range]. Differences between groups were assessed by the unpaired *t* test for independent samples, the Mann–Whitney *U* test (as appropriate) for continuous variables and the ANOVA or Kruskal–Wallis test (as appropriate) for more than two groups. Correlation was performed between two continuous variables by Spearman test. A two-side probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Multivariate analysis by linear regression was used to identify the factors associated to GDF-15 levels. Variables with $p < 0.15$ in the univariate analysis were included into the multivariate regression model. Statistical analyses were carried out with SPSS version 15.0 software (Chicago, Illinois, USA).

3. Results

3.1. Patient characteristics

Characteristics of the entire 102 HCM patient cohort are summarized in Table 1. The different clinical features and biomarkers were compared in the three NYHA groups in order to identify a relationship between GDF15 levels and disease severity. GDF-15 levels present a non parametric distribution with a median of 2978.9 pg/mL with 25th to 75th percentiles, 3039.5 to 3831.4 pg/mL. GDF-15 levels were considerably different within NYHA groups ($p = 0.006$), increasing with worse functional status (Table 1). There were significant differences in functional groups regarding baseline characteristics such as age, male sex, syncope ($p = 0.002$, $p = 0.022$ and $p = 0.034$, respectively), worse exercise capacity ($p < 0.001$), obstruction ($p = 0.001$) as well as increased biomarkers levels, such as MMP-2 ($p = 0.018$), NT-proBNP ($p = 0.001$) and a strong trend with hs-TnT ($p = 0.07$). Diminished kidney function, calculated through creatinine clearance, was also different between groups ($p = 0.003$). Markers of diastolic dysfunction were also shown altered with functional status, E/A ratio and IAV ($p = 0.022$ and $p \leq 0.001$, respectively).

Table 1
Characteristics of 102 patients in relation to NYHA classification (ANOVA or Kruskal–Wallis test).

	NYHA I (n = 45)	NYHA II (n = 42)	NYHA III (n = 15)	p value
Age	40.6 ± 13.9	47.8 ± 13.8	56.1 ± 10.37	0.002
Male sex	83.3%	71.4%	46.7%	0.022
Hypertension	23.1%	36.8%	35.7%	0.39
Diabetes mellitus	2.6%	5.1%	14.3%	0.26
Atrial fibrillation	12.8%	21.1%	42.9%	0.060
Syncope	7.9%	31.6%	20.0%	0.034
Dyspnea	5.1%	100%	100%	<0.001
Family history of sudden death	18.4%	13.2%	26.7%	0.51
MLVT (mm)	17.0 [17.1–21.3]	20.5 [19.9–23.5]	23.0 [20.0–25.4]	0.004
MLVT (≥30 mm)	10.5%	5.1%	0%	0.36
LVEDD (mm)	44.8 ± 5.7	43.6 ± 6.1	42.3 ± 9.3	0.25
LVESD (mm)	25.3 ± 5.2	24.7 ± 6.3	23.3 ± 9.7	0.53
LAD (mm)	40.8 ± 7.0	44.6 ± 7.3	46.5 ± 5.6	0.014
LVEF (%)	66.2 ± 10.8	66.4 ± 11.2	71.9 ± 13.4	0.26
E/A ratio	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.6	1.8 ± 1.0	0.022
IAV	23.7 [19.4–40.3]	35.0 [31.3–43.0]	45.7 [33.8–57.3]	<0.001
TEI index	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.51
Left ventricular outflow obstruction	17.9%	51.3%	66.7%	0.001
ABPR (n = 78)	35.3%	36.1%	42.9%	0.88
METs (n = 78)	11.7 ± 3.1	8.5 ± 2.8	6.7 ± 2.3	<0.001
NSVT	25.7%	33.3%	40.0%	0.58
LGE	61.4%	79.5%	86.7%	0.08
GDF-15 (pg/mL)	2878.2 [2290.7–3927.03]	3275.5 [2756.1–3203.0]	4159.1 [3634.2–7242.02]	0.006
MMP-2 (ng/mL)	1366.3 ± 593.7	1560.5 ± 701.4	2399.7 ± 1130.3	0.018
NT-proBNP (pg/mL)	326.0 [170.8–578.8]	312.0 [454.3–1202.8]	3087.5 [130.0–7685.1]	0.001
hs-TnT (ng/mL)	0.010 [0.006–0.013]	0.013 [0.007–0.048]	0.024 [0.014–0.027]	0.07
vWF (µg/mL)	115.4 ± 39.6	136.9 ± 61.0	170.8 ± 70.9	0.18
Creatinine clearance mL/min	125.9 ± 44.6	110.2 ± 33.8	81.5 ± 29.9	0.003

NYHA: New York Heart association functional class

MLVT: maximal left ventricular wall thickness

LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter

LVESD: left ventricular end-systolic diameter

LAD: left atrial diameter

LVEF: left ventricular ejection fraction

IAV: indexed atrial volume

TEI index: total ejection isovolume index.

E/A ratio: ratio of the early and late waves of spectral Doppler of ventricular filling

ABPR: Abnormal blood pressure response to exercise

METs: metabolic equivalents

NSVT: non sustained ventricular tachycardia

LGE: late gadolinium enhancement

GDF-15: growth differentiation factor-15

MMP-2: matrix metalloproteinase-2

NT-proBNP: aminoterminal pro-B natriuretic peptide.

hs-TnT: high-sensitivity troponin T

vWF: von Willebrand factor.

3.2. GDF-15 levels and disease severity

Although differences were not significant between class I and II ($p = 0.28$), GDF-15 levels were clearly increased in impaired functional class patients (NYHA class \geq II) compared to NYHA I ($p = 0.037$), and more strongly increased in NYHA class III ($p = 0.002$) (Table 2). Fig. 1A represents GDF-15 levels assessed in the three different functional classes of HCM, confirming a clear increased level in NYHA class III patients, compared to the other subgroups. The difference between those three groups was remarkably significant ($\chi^2: 10.35$, $p = 0.006$).

The presence of comorbidities such as hypertension, diabetes mellitus, dyspnea, and atrial fibrillation also increased GDF-15 levels ($p = 0.001$, $p = 0.030$, $p = 0.020$ and $p = 0.012$, respectively) (Table 2).

Significant correlations between GDF-15 levels and proposed biomarkers of ventricular remodeling were found, such as MMP-2 ($r: 0.40$, $p = 0.009$), NT-proBNP ($r: 0.28$, $p = 0.049$), or hs-TnT ($r: 0.30$; $p = 0.003$), and endothelial dysfunction as vWF ($r: 0.33$, $p = 0.001$) (Table 3). Increased levels of these biomarkers, such as hs-TnT, are associated with severe myocardium damage and, thus, with impaired functional class III. Accordingly, as shown in Fig. 1B, HCM patients which presented elevated levels of hs-TnT (above the cut-off point 0.014 ng/mL) were associated with higher levels of GDF-15 patients ($p = 0.021$). Moreover, GDF-15 levels were also found significantly

correlated with age ($r: 0.48$, $p \leq 0.001$), as well as a negative correlation with exercise capacity measured in METs ($r: -0.45$, $p \leq 0.001$) and creatinine clearance ($r: -0.30$, $p = 0.002$) (Table 3).

Table 2

Association of GDF-15 levels with clinical features in 102 HCM patients (Mann–Whitney test).

	Z Mann–Whitney	p value
Female gender	−1.66	0.096
NYHA I and II	−1.09	0.28
NYHA II and III	−2.57	0.01
NYHA I and III	−3.08	0.002
NYHA I and NYHA \geq II	−2.08	0.037
Hypertension	−3.25	0.001
Diabetes mellitus	−2.17	0.030
Dyspnea	−2.33	0.020
Atrial fibrillation	−2.50	0.012
Syncope	−1.18	0.24
Family history of sudden death	−0.85	0.40
Left ventricular outflow obstruction	−1.10	0.28
ABPR (n = 78)	−0.38	0.70
NSVT	−1.49	0.14
LGE	−0.98	0.32

Abbreviations are the same as in Table 1.

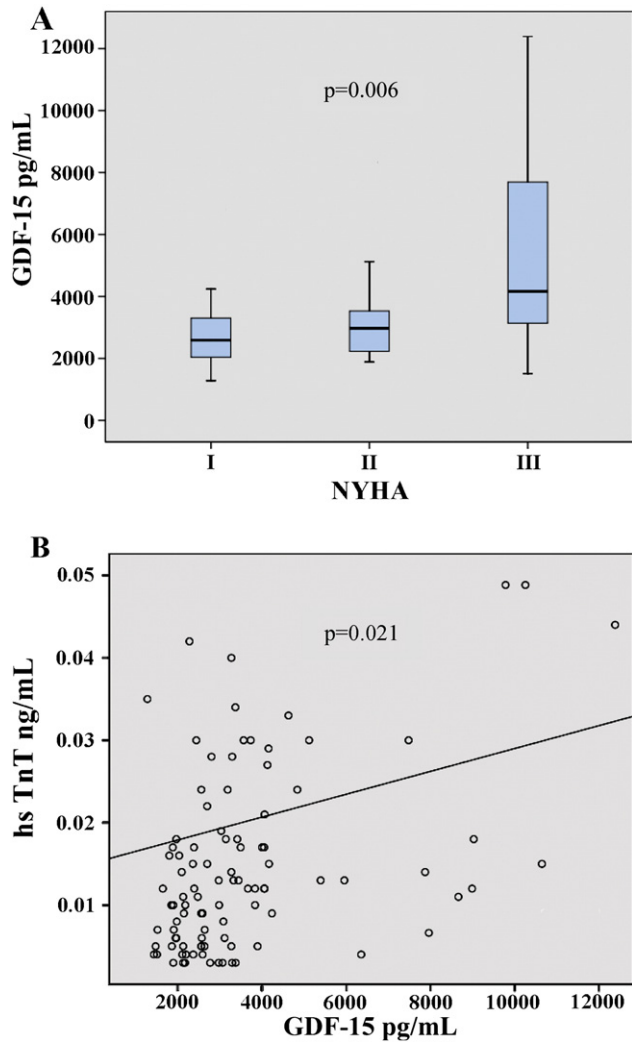


Fig. 1. A. GDF-15 levels (pg/mL) in 102 patients with HCM stratified according to NYHA functional class (Kruskal Wallis test). B. GDF-15 levels in the same patient's cohort with different hs-TnT levels (ng/mL). hs-TnT cutoff point <0.014 ng/mL for Mann Whitney test.

Table 3
Bivariate correlations of GDF-15 in 102 HCM patients (Spearman correlation).

	r value	p value
Age	0.48	<0.001
MLVT (mm)	0.03	0.81
LVEDD (mm)	0.003	0.98
LVESD (mm)	-0.04	0.66
LAD (mm)	0.15	0.16
LVEF (%)	0.018	0.86
E/A ratio	0.15	0.18
Septal E/E'	0.16	0.27
TEI index	0.11	0.44
IAV	0.25	0.050
METs (n = 78)	-0.45	<0.001
LGE	-0.1	0.33
MMP-2 (ng/mL)	0.40	0.009
NT-proBNP (pg/mL)	0.28	0.049
hs-TnT (ng/mL)	0.30	0.003
vWF (µg/mL)	0.33	0.001
Creatinine clearance (mL/min)	-0.30	0.002

Abbreviations are the same as in Table 1. Septal E/E': ratio of early diastolic transmitral flow velocity (E) to early diastolic mitral annular velocity (E') in the septal side.

Table 4
Multivariable analysis for the variables of GDF-15 levels in 102 HCM patients.

Factors	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients	t	p value
	B	SD	β		
(Constant)	1680.752	294.256		5.712	<0.001
NYHA III	2156.536	466.484	0.504	4.623	<0.001
Hypertension	1898.961	373.482	0.559	5.084	<0.001
Left ventricular outflow obstruction	1157.885	369.951	0.348	3.130	0.005
NSVT	1154.622	384.448	0.320	3.003	0.006

B: regression coefficient.

SD: standard deviation.

Rests of the abbreviations are the same as in Table 1.

3.3. Multiple regression analysis

In order to identify independent determinants of plasma GDF-15 levels, a bivariate test was initially performed in the entire cohort. The objective for the single parameter analysis was to screen variables and to exclude those which had no association with the GDF-15 levels ($p \leq 0.15$). Bivariate analysis showed that GDF-15 levels were more likely related to age, dyspnea, atrial fibrillation, lower renal function and METs, and higher levels of MMP-2, NT-proBNP and vWF (all $p \leq 0.01$, data not shown), in accordance with above associations. Table 4 shows the results of multivariate analysis model ($p < 0.001$); worse functional class (NYHA III), hypertension or obstruction (all $p \leq 0.005$) and non sustained ventricular tachycardia ($p = 0.006$) significantly influence GDF-15 levels. Biomarkers of ventricular remodeling do not seem to contribute to GDF-15 levels in the multivariate study.

We finally compared GDF-15 and other biomarker plasma levels in NYHA III patients with and without symptoms of NSVT (Fig. 2). While the common biomarkers did not show a significant increase with NSVT (data not shown), highest GDF-15 levels were observed in patients with NSVT ($p = 0.001$) although NT-proBNP also showed a clear trend ($p = 0.066$).

4. Discussion

4.1. Main findings

Recent studies have evaluated the association between GDF-15 levels and several cardiovascular pathologies, denoting a link with

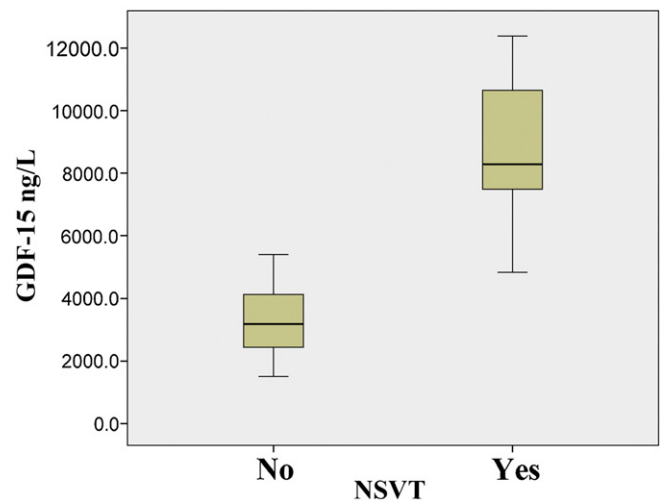


Fig. 2. Plasma GDF-15 levels (ng/L) quantified in NYHA III patients with NSVT. While other biomarkers remain unaltered, GDF-15 levels appeared increased in the presence of ventricular arrhythmia.

severity disease and even more, suggesting it as a new prognostic biomarker in heart failure [25]. HCM is associated with a decreased functional status; hence it was pertinent to compare GDF-15 levels and other severity factors in the three well-defined NYHA groups. As indicated by other reports [26], long-standing hypertension may be the most common secondary cause of hypertrophy. It is noteworthy to comment that since the study largely excluded patients with refractory arterial hypertension, the results correspond only to patients with HCM and sometimes overlapping hypertension, in the absence of any other etiology [23]. This condition additionally deteriorates functional status in younger individuals whereas in the older patients NYHA class, the difference between HCM with hypertension and HCM narrows and becomes insignificant [27].

In the present study, elevated GDF-15 levels are indeed associated with severe disease features in HCM patients, such as increased age, severe NYHA functional class (NYHA \geq II), comorbidities and poor outcomes predictors (hypertension, diabetes mellitus, dyspnea or atrial fibrillation), limited exercise capacity and a mild reduction in creatinine clearance. In line with the present results, Eggers et al. also reported that concentrations of GDF-15 were higher in different comorbidities such as hypertension or diabetes [12]. In addition, the multivariate analysis shows that GDF-15 levels are related to hypertension ($p \leq 0.001$) and NSVT ($p = 0.006$). As both comorbidities irretrievably aggravate remodeling and hypertrophy, GDF-15 levels might reflect pathophysiological changes occurring in left ventricular remodeling. NSVT has been proven to be a strong determinant of progressive heart failure and death in young patients with HCM; however in older patients (over 40 years old) NSVT is more related to a progressive myocyte loss and fibrosis [28]. The current cohort presents relatively old individuals aged of 47.1 years old, hence, the increase of GDF-15 levels and incidence of ventricular arrhythmia probably reflects worse functional status. Furthermore, plasma GDF-15 levels but not other biomarkers were associated with NSVT in NYHA III patient group (Fig. 2). To our knowledge, this is the first investigation testing GDF-15 in this severe symptom in HCM; this finding might allow the identification of more at-risk patients compared to current biomarkers.

4.2. Novel severity biomarker

Clinical studies have clearly shown that the stratification of patients is possible based on several factors that regulate the hypertrophic response of the myocardium [29]. Changes in severe HCM are independently associated with age and subsequent risk, which entail successive and worse alterations: expression levels of structural proteins, proliferation rate of fibroblast, deposition of extracellular matrix constituents or fibrosis, and hypertrophy of cardiac myocytes [30].

Although interpretative limitations of plasma biomarker profiles, the present study has found interesting correlations between GDF-15 plasma levels and biomarkers of disease severity (MMP-2, NT-proBNP, hs-TnT and vWF). Roldán et al. found changing levels of MMP-2 in overt HCM patients, suggesting the implication of the MMP system in the long-standing disease [19]. Also, plasma NT-proBNP levels in HCM are related to an increased risk of heart failure [31]. This peptide is secreted from the heart and associated with lasting cardiac injury, consistent with the present results of harsh damage. Elevated hs-TnT levels have been also associated with severe clinical features in HCM due to the continuous loss of myocytes; thus hs-TnT has been described as a biomarker of cardiac remodeling and depth damage [20]. Furthermore, higher plasma concentration of vWF in HCM patients was interestingly related with severe functional class [32]; in this report vWF is also correlated with GDF-15 levels. Several articles have defined GDF-15 as an aggravating or protective factor in hypertrophy, even not being a cardiac-specific cytokine. Xu et al. (2006) found that transgenic mice overexpressing GDF-15

support better pressure overload-induced hypertrophy [33]. They also reported that GDF-15 expression in cardiomyocyte cultures antagonized the agonist-induced hypertrophy in vitro [33], identifying this protein as an antihypertrophic factor that antagonizes the loss of ventricular performance. Therefore, the present correlations between GDF-15 plasma levels and blood-derived biomarkers in HCM patients suggest that GDF-15 could act within the cardioprotective cytokine network activated in hypertrophic remodeling.

On the other hand, according to the previous commentaries, greater biomarker influences in the multivariate analysis would have been expected for the GDF-15 levels, which would have denoted severe heart damage. However, the entire cohort was contemplated in this multivariate analysis and earlier stage patients might be more capable of adopting efficient methods for managing the disease, resulting in a lessening of their symptoms and biomarkers expression.

In accordance, the present data show only significantly increased levels in evolved pathological conditions and advanced functional class. NYHA I class patients, without a severe profile of the disease, present lower and moderate GDF-15 levels (Table 1), and thus these levels do not seem to be involved in HCM disease. Nonetheless, the fact that GDF-15 levels are not increased in stable patients (class I) confers a stronger power as a biomarker of changing status, since the cytokine would be only highly increased in worse functional class (Fig. 1A), which is useful to deduce myocardium depth damage. Indeed, GDF-15 levels of class II were slightly raised but notoriously increased in class III compared to functional class I patients (Fig. 1A), corroborating the present assumption. In the same line, an interesting report found that GDF-15 levels predicts noncardiovascular death in older patients alone or in combination of NT-proBNP [34], although different ages studies, the predictive value of this biomarker in younger populations requires further investigation.

Although the knowledge of physiological functions is limited, increased levels of GDF-15 could be related to the progression of the disease, as an apparent consequence of the remodeling activity. Similar associations were found between plasma GDF-15 levels and features of worse heart failure, renal function in the different Trials [14,35] providing strong prognostic information. Conversely, comparable correlations were reported with clinical predictor markers such as hs-TnT and NT-proBNP. Despite the relatively small number of patients, the present HCM study shows further correlations with novel biomarkers indicating thus its strong potential as biomarker of worse status.

4.3. Limitations

The principal limitation of the present study lies in its purely cross-sectional design. Although the GDF-15 levels are associated to several biomarkers related to the progression of the disease, a longitudinal study would be required to conclude the direct relationship between GDF-15 levels and disease evolution. In addition, obstruction to left ventricular outflow has been only analyzed under resting conditions and not related to physical activity. As was described by Maron et al. (2006) only exercise permitted the identification of a more severe profile of the disease than that of the overall population of HCM patients [36], in whom progressive heart failure symptoms are explained by latent exercise-induced obstruction.

5. Conclusions

In conclusion, we have observed increased plasma levels of GDF-15 in patients with a severe HCM profile. GDF-15 could allow a better characterization of patients with severe HCM and therefore a more effective use of specific therapeutic and prevention strategies. A long-term study of HCM patients would further assess whether GDF-15 is a reliable prognosis biomarker either alone or in combination with other clinical features and biomarkers.

Learning points

What is known on this topic:

- Growth differentiation factor 15 (GDF-15) has been shown upregulated in myocyte hypertrophy.
- GDF-15 has been shown to exhibit aggravating or protective effects in hypertrophy.
- This novel marker has been found associated with vascular disorders such as atherosclerosis, hypertension, and heart failure.

What this paper adds:

- GDF-15 has been shown associated with severe clinical features in patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM).
- GDF-15 levels are significantly correlated with other biomarkers of vascular damage and interstitial remodeling, mechanisms involved in the pathophysiology of the disease.
- GDF-15 levels are significantly increased in evolved pathological conditions and advanced functional class.
- GDF-15 might be useful to deduce myocardium depth damage in the clinical practice.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Dr. Montoro-García has a postdoctoral Grant of the Fundación Ramón Areces (Spain). Dr. Hernández-Romero holds a postdoctoral position funded by the Instituto de Salud Carlos III. E. Jover has a research grant by the Instituto de Salud Carlos III. Funding: supported by an FIS PS09/00721 project for the Instituto de Salud Carlos III, and in part by Funding FEDER and by Roche Diagnostics.

References

- [1] de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:1–11.
- [2] Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, et al. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* 2006;66:4983–6.
- [3] Bottner M, Laaff M, Schechinger B, Rappold G, Unsicker K, Suter-Crazzolara C. Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 1999;237:105–11.
- [4] Strelau J, Schober A, Sullivan A, Schilling L, Unsicker K. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15), a novel member of the TGF-beta superfamily, promotes survival of lesioned mesencephalic dopaminergic neurons in vitro and in vivo and is induced in neurons following cortical lesioning. *J Neural Transm Suppl* 2003:197–203.
- [5] Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou MF, et al. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 2002;21:4212–9.
- [6] Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, et al. Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. *Cell Tissue Res* 2004;318:325–33.
- [7] Hsiao EC, Koniariis LG, Zimmers-Koniariis T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol* 2000;20:3742–51.
- [8] Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtmann A, Rossaint J, et al. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med* 2011;17:581–8.
- [9] de Jager SC, Bermudez B, Bot I, Koenen RR, Bot M, Kavelaars A, et al. Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *J Exp Med* 2011;208:217–25.
- [10] Kempf T, Sinning JM, Quint A, Bickel C, Sinning C, Wild PS, et al. Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: results from the AtheroGene study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:286–92.
- [11] Nickel N, Kempf T, Tapken H, Tongers J, Laenger F, Lehmann U, et al. Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:534–41.
- [12] Eggers KM, Kempf T, Allhoff T, Lindahl B, Wallentin L, Wollert KC. Growth-differentiation factor-15 for early risk stratification in patients with acute chest pain. *Eur Heart J* 2008;29:2327–35.
- [13] Khan SQ, Ng K, Dhillon O, Kelly D, Quinn P, Squire IB, et al. Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009;30:1057–65.
- [14] Anand IS, Kempf T, Rector TS, Tapken H, Allhoff T, Jantzen F, et al. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial. *Circulation* 2010;122:1387–95.
- [15] Xu X, Li Z, Gao W. Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Biomarkers* 2011;16:466–75.
- [16] Heger J, Schiegnitz E, von Waldhausen D, Anwar MM, Piper HM, Euler G. Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 2010;224:120–6.
- [17] Wang X, Yang X, Sun K, Chen J, Song X, Wang H, et al. The haplotype of the growth-differentiation factor 15 gene is associated with left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2010;118:137–45.
- [18] Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002;287:1308–20.
- [19] Roldan V, Marin F, Gimeno JR, Ruiz-Espejo F, Gonzalez J, Feliu E, et al. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2008;156:85–91.
- [20] Moreno V, Hernandez-Romero D, Vilchez JA, Garcia-Honrubia A, Cambronero F, Casas T, et al. Serum levels of high-sensitivity troponin T: a novel marker for cardiac remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail* 2010;16:950–6.
- [21] O'Hanlon R, Grasso A, Roughton M, Moon JC, Clark S, Wage R, et al. Prognostic significance of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:867–74.
- [22] Cambronero F, Marin F, Roldan V, Hernandez-Romero D, Valdes M, Lip GY. Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur Heart J* 2009;30:139–51.
- [23] Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, et al. American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J* 2003;24:1965–91.
- [24] McKenna WJ, Spirito P, Desnos M, Dubourg O, Komajda M. Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. *Heart* 1997;77:130–2.
- [25] Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Ciccoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1054–60.
- [26] Karam R, Lever HM, Healy BP. Hypertensive hypertrophic cardiomyopathy or hypertrophic cardiomyopathy with hypertension? A study of 78 patients. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:580–4.
- [27] Dimitrow PP, Czarnačka D, Kawecka-Jaszcz K, Dubiel JS. The frequency and functional impact of hypertension overlapping on hypertrophic cardiomyopathy: comparison between older and younger patients. *J Hum Hypertens* 1998;12:633–4.
- [28] Monserrat L, Elliott PM, Gimeno JR, Sharma S, Penas-Lado M, McKenna WJ. Non-sustained ventricular tachycardia in hypertrophic cardiomyopathy: an independent marker of sudden death risk in young patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:873–9.
- [29] Christiaans I, van Engelen K, van Langen IM, Birnie E, Bonsel GJ, Elliott PM, et al. Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace* 2010;12:313–21.
- [30] Ho CY, Lopez B, Coelho-Filho OR, Lakdawala NK, Cirino AL, Jarolim P, et al. Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2010;363:552–63.
- [31] Kahveci G, Bayrak F, Mutlu B, Basaran Y. Determinants of elevated NT-proBNP levels in patients with hypertrophic cardiomyopathy: an echocardiographic study. *Heart Lung Circ* 2009;18:266–70.
- [32] Cambronero F, Vilchez JA, Garcia-Honrubia A, Ruiz-Espejo F, Moreno V, Hernandez-Romero D, et al. Plasma levels of von Willebrand factor are increased in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Thromb Res* 2010;126:e46–50.
- [33] Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Kleivitsky R, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res* 2006;98:342–50.
- [34] Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA, Maisel AS, Barrett-Connor E. Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Circulation* 2011;123:2101–10.
- [35] Bonaca MP, Morrow DA, Braunwald E, Cannon CP, Jiang S, Breher S, et al. Growth differentiation factor-15 and risk of recurrent events in patients stabilized after acute coronary syndrome: observations from PROVE IT-TIMI 22. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:203–10.
- [36] Maron MS, Olivetto I, Zenovich AG, Link MS, Pandian NG, Kuvlin JT, et al. Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. *Circulation* 2006;114:2232–9.