



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

Polimorfismos en Genes no Sarcoméricos,  
Influencia en el Remodelado Cardíaco e  
Implicaciones Pronósticas en Pacientes  
con Miocardiopatía Hipertrófica.

**D. Antonio García Honrubia**

2015



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

**POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS,  
INFLUENCIA EN EL REMODELADO CARDIACO E  
IMPLICACIONES PRONÓSTICAS EN PACIENTES  
CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**ANTONIO GARCÍA HONRUBIA**

Directores:

Dr. Francisco Marín Ortuño

Dra. Diana Hernández Romero

**Murcia, noviembre de 2015**

*A Mariluz, Marta y Ángel  
Sois mi vida*

## AGRADECIMIENTOS

*Mi primer agradecimiento es para mis directores por su esfuerzo y dedicación: Francisco Marín y Diana Hernández. Paco, mi deuda de gratitud contigo sigue creciendo aunque sabes que nunca podré pagarla, lo cual la multiplica por dos, gracias. Diana, he tenido mucha suerte al coincidir contigo, me has dejado una profunda huella, tu capacidad de trabajo me ha sido muy inspiradora, gracias. Gracias por el tiempo que os he robado.*

*Este trabajo ha precisado de la colaboración de muchas personas para llevarse a cabo en los distintos puntos del camino: José M. Andreu, Carmen Bartual, Luis Caballero, Teresa Casas, Sergio Cánovas, Vicente Climent, Gonzalo de la Morena, Eloísa Feliu, Miriam García, Noemí Garrigos, Josefa González, Eva Jover, Carlos M. Martínez, Marina Martínez, José A. Montero, Francisco Nicolás, Estaban Orenes, Miriam Quintana, Ana I. Romero, Ana Silvente, Andrea Veliz y Juan A. Vílchez. A todos gracias.*

*Quiero agradecer la especial colaboración con el Centro Inmunológico de Alicante.*

*También quiero agradecer el apoyo recibido de mis compañeros del HGU de Elche y del HGU de Alicante y el del Laboratorio de Genética Molecular del Hospital de Elche. Y en especial el de Fernando García de Burgos, gracias jefe.*

*A mi familia por su preocupación y comprensión, gracias.*

# INDICE

|   |    |
|---|----|
| ABREVIATURAS .....                        | 6  |
| INDICE DE TABLAS .....                    | 7  |
| INDICE DE FIGURAS .....                   | 8  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                     | 9  |
| 1.1 CONTEXTO HISTÓRICO.....               | 10 |
| 1.2 EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL..... | 12 |
| 1.3 ETIOLOGÍA .....                       | 15 |
| 1.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA .....             | 20 |
| 1.5 FISIOPATOLOGÍA .....                  | 22 |
| 1.5.1 Obstrucción del TSVI .....          | 22 |
| 1.5.2 Disfunción diastólica .....         | 25 |
| 1.5.3 Disfunción sistólica .....          | 25 |
| 1.5.4 Isquemia miocárdica .....           | 26 |
| 1.6 MANEJO CLÍNICO .....                  | 27 |
| 1.6.1 Diagnóstico .....                   | 27 |
| 1.6.1.1 Anamnesis.....                    | 28 |
| 1.6.1.2 Exploración física .....          | 29 |
| 1.6.1.3 Pruebas complementarias.....      | 29 |
| ELECTROCARDIOGRAMA.....                   | 29 |
| ECOCARDIOGRAFÍA.....                      | 30 |
| RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIACA .....       | 33 |

|  |    |
|--|----|
| CATETERISMO CARDIACO.....                              | 39 |
| ESTUDIO GENÉTICO.....                                  | 39 |
| 1.6.2 Manejo de los síntomas.....                      | 40 |
| 1.6.3 Cribado familiar.....                            | 44 |
| 1.6.4 Estratificación del riesgo de muerte súbita..... | 45 |
| 1.6.5 Fibrilación auricular.....                       | 47 |
| 1.7 ETIOPATOGENIA.....                                 | 49 |
| 1.8 RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL FENOTIPO.....      | 52 |
| 1.9 GENES MODULADORES.....                             | 55 |
| 1.9.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....     | 57 |
| 1.9.1.1 AGT.....                                       | 57 |
| 1.9.1.2 ACE.....                                       | 58 |
| 1.9.1.3 AGTR1.....                                     | 58 |
| 1.9.1.4 AGTR2.....                                     | 59 |
| 1.9.1.5 CYP11B2.....                                   | 60 |
| 1.9.1.6 CMA.....                                       | 61 |
| 1.9.2 Otros genes no-sarcoméricos.....                 | 62 |
| 1.9.2.1 COL1A1.....                                    | 62 |
| 1.9.2.2 RETN.....                                      | 63 |
| 1.9.2.3 ADRB1.....                                     | 64 |
| 1.9.2.4 PGC1- $\alpha$ .....                           | 65 |
| 1.9.2.5 NOS3.....                                      | 66 |
| 1.9.2.6 CALM3.....                                     | 67 |

|  |    |
|--|----|
| 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....     | 69 |
| 3. OBJETIVOS.....                                | 72 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS.....                       | 74 |
| 4.1 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.....                 | 75 |
| 4.2 PACIENTES Y CONTROLES .....                  | 75 |
| 4.3 EVALUACIÓN CLÍNICA .....                     | 76 |
| 4.4 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS .....                | 78 |
| 4.4.1 Electrocardiograma de 12 derivaciones..... | 79 |
| 4.4.2 Ecocardiografía transtorácica .....        | 79 |
| 4.4.3 Ergometría .....                           | 81 |
| 4.4.4 Holter-ECG .....                           | 83 |
| 4.4.5 Resonancia magnética cardiaca.....         | 83 |
| 4.5 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS .....    | 85 |
| 4.5.1 Recogida de muestras biológicas.....       | 85 |
| 4.5.2 Genotipado de polimorfismos .....          | 85 |
| 4.5.3 Determinación de resistina .....           | 86 |
| 4.5.4 Determinación de aldosterona .....         | 87 |
| 4.5.5 Estudio anatomopatológico.....             | 87 |
| 4.6 SEGUIMIENTO Y EVENTOS.....                   | 88 |
| 4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                   | 89 |
| 4.8 ASPECTOS ÉTICOS.....                         | 91 |
| 4.9 FINANCIACIÓN.....                            | 92 |
| 5. RESULTADOS.....                               | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....  | 94  |
| 5.1.1 Características clínicas .....   | 94  |
| 5.1.2 Ecocardiografía.....   | 96  |
| 5.1.3 Ergometría .....   | 96  |
| 5.1.4 Resonancia magnética cardiaca.....   | 97  |
| 5.1.5 Tratamiento farmacológico .....  | 97  |
| 5.1.6 Tratamiento no farmacológico .....   | 98  |
| 5.2 GENOTIPO.....  | 98  |
| 5.2.1 Mutaciones en genes sarcoméricos .....   | 98  |
| 5.2.2 Polimorfismos en genes no sarcoméricos .....   | 99  |
| 5.3 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS<br>EN LA FIBROSIS CARDIACA EN PACIENTES CON MCH.....  | 101 |
| 5.3.1 Asociación de los polimorfismos con el grado de fibrosis miocárdica<br>mediante resonancia magnética cardiaca utilizando RTG. ....               | 101 |
| 5.3.1.1 Valores de resistina y polimorfismo RETN -420C>G .....   | 104 |
| 5.3.2 Implicación de los polimorfismos en el grado de fibrosis miocárdica en<br>tejidos miocárdicos de pacientes con MCH obtenidos por miectomía. .... | 105 |
| 5.4. EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS<br>EN LA INCIDENCIA DE FA EN PACIENTES CON MCH.....  | 107 |
| 5.4.1 Niveles de aldosterona y el polimorfismo CYP11B2 (-344T>C) .....   | 111 |
| 5.5 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS<br>EN LA INCIDENCIA DE INGRESO HOSPITALARIO URGENTE EN PACIENTES<br>CON MCH.....              | 112 |
| 6. DISCUSIÓN .....   | 118 |



|  |     |
|--|-----|
| 6.1 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA FIBROSIS CARDIACA EN PACIENTES CON MCH.....                           | 119 |
| 6.2 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA INCIDENCIA DE FA EN PACIENTES CON MCH.....                            | 123 |
| 6.3. EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA INCIDENCIA DE INGRESO HOSPITALARIO URGENTE EN PACIENTES CON MCH..... | 127 |
| 6.4 LIMITACIONES .....   | 130 |
| 6.5 IMPLICACIONES FUTURAS .....  | 131 |
| 7. CONCLUSIONES .....  | 132 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA .....  | 134 |
| 9. ANEXOS .....  | 156 |

# ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| <b>ABC</b>   | Área bajo la curva                                  |
| <b>ADN</b>   | Ácido desoxirribonucleico                           |
| <b>AI</b>    | Aurícula izquierda                                  |
| <b>AIT</b>   | Accidentes isquémico transitorio                    |
| <b>ARN</b>   | Ácido ribonucleico                                  |
| <b>ATP</b>   | Adenosina trifosfato                                |
| <b>CCS</b>   | <i>Canadian Cardiovascular Society</i>              |
| <b>DAI</b>   | Desfibrilador automático implantable                |
| <b>DE</b>    | Desviación estándar                                 |
| <b>DM</b>    | Diabetes mellitus                                   |
| <b>ECG</b>   | Electrocardiograma                                  |
| <b>EEUU</b>  | Estados Unidos de América                           |
| <b>ELISA</b> | <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>            |
| <b>FA</b>    | Fibrilación auricular                               |
| <b>FEVI</b>  | Fracción de eyección del ventrículo izquierdo       |
| <b>FRMS</b>  | Factores de riesgo de muerte súbita                 |
| <b>HTA</b>   | Hipertensión arterial                               |
| <b>HVI</b>   | Hipertrofia del ventrículo izquierdo                |
| <b>IECA</b>  | Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina |
| <b>MCH</b>   | Miocardiopatía hipertrófica                         |
| <b>mm</b>    | Milímetros  |
| <b>mmHg</b>  | Milímetros de mercurio                              |
| <b>MP</b>    | Marcapasos  |
| <b>MS</b>    | Muerte súbita                                       |
| <b>n</b>     | Número  |
| <b>NYHA</b>  | <i>New York Heart Association</i>                   |
| <b>RATA</b>  | Respuesta anómala de la TA (ergometría)             |
| <b>RIC</b>   | Rango intercuartílico                               |
| <b>RMC</b>   | Resonancia magnética cardiaca                       |
| <b>RTG</b>   | Realce tardío con gadolinio                         |
| <b>SAM</b>   | Systolic anterior motion                            |
| <b>SF-1</b>  | <i>Steroidogenic factor 1</i>                       |
| <b>Sp1</b>   | <i>Specificity protein 1</i>                        |
| <b>SRAA</b>  | Sistema renina-angiotensina-aldosterona             |
| <b>TA</b>    | Tensión arterial                                    |
| <b>TDE</b>   | Tiempo de desaceleración de la onda E               |
| <b>TSVI</b>  | Tracto de salida del ventrículo izquierdo           |
| <b>TV</b>    | Taquicardia ventricular                             |
| <b>TVNS</b>  | Taquicardia ventricular no sostenida                |
| <b>TVS</b>   | Taquicardia ventricular sostenida                   |

# INDICE DE TABLAS

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>TABLA 1.1</b>  | GENES ASOCIADOS CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.....   | 17  |
| <b>TABLA 1.2</b>  | GENES ASOCIADOS CON HIPERTROFIA CARDIACA.....  | 19  |
| <b>TABLA 1.3</b>  | CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DE LA MCH .....   | 20  |
| <b>TABLA 1.4</b>  | MODULADORES DE LA OBSTRUCCIÓN DINÁMICA DEL TSVI.....   | 24  |
| <b>TABLA 1.5</b>  | VARIABLES PREDICTORAS DE MS EN MCH .....   | 46  |
| <b>TABLA 1.6</b>  | LISTADO DE GENES MODULADORES .....   | 56  |
| <b>TABLA 4.1</b>  | VARIABLES RECOGIDAS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA .....   | 77  |
| <b>TABLA 4.2</b>  | VARIABLES RECOGIDAS EN LAS EXPLORACIONES<br>COMPLEMENTARIAS. ....  | 78  |
| <b>TABLA 4.3</b>  | VARIABLES RECOGIDAS DURANTE EL SEGUIMIENTO .....   | 89  |
| <b>TABLA 5.1</b>  | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES DE LOS PACIENTES. ....  | 95  |
| <b>TABLA 5.2</b>  | VARIABLES PREDICTORAS CONVENCIONALES DE MS EN MCH. ..  | 95  |
| <b>TABLA 5.3</b>  | ECOCARDIOGRAFÍA DE LOS PACIENTES CON MCH.....  | 96  |
| <b>TABLA 5.4</b>  | DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LOS<br>SEGMENTOS CON RTG.....                                | 97  |
| <b>TABLA 5.5</b>  | FÁRMACOS EMPLEADOS EN LOS PACIENTES CON MCH. ....  | 98  |
| <b>TABLA 5.6</b>  | POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LOS<br>PACIENTES CON MCH.....                                  | 100 |
| <b>TABLA 5.7</b>  | ANÁLISIS DE REGRESIÓN: VARIABLES CLÍNICAS Y RTG. ....  | 101 |
| <b>TABLA 5.8</b>  | ANÁLISIS DE REGRESIÓN: POLIMORFISMOS Y RTG. ....   | 103 |
| <b>TABLA 5.9</b>  | ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIVARIADO: RTG. ....  | 103 |
| <b>TABLA 5.10</b> | ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS Y LA FIBROSIS<br>MIOCÁRDICA EN MUESTRAS PROCEDENTES DE MIECTOMÍA..... | 106 |
| <b>TABLA 5.11</b> | ANÁLISIS DE REGRESIÓN: VARIABLES CLÍNICAS Y FA. ....   | 108 |
| <b>TABLA 5.12</b> | ANÁLISIS DE REGRESIÓN: POLIMORFISMOS Y FA. ....  | 110 |
| <b>TABLA 5.13</b> | ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIVARIADO: DESARROLLO DE FA<br>.....  | 111 |
| <b>TABLA 5.14</b> | INGRESOS HOSPITALARIOS URGENTES DURANTE EL<br>SEGUIMIENTO. ....  | 113 |
| <b>TABLA 5.15</b> | ANÁLISIS DE REGRESIÓN: VARIABLES CLÍNICAS E INGRESO<br>HOSPITALARIO URGENTE. ....                        | 114 |
| <b>TABLA 5.16</b> | ANÁLISIS DE REGRESIÓN: POLIMORFISMOS E INGRESO<br>HOSPITALARIO URGENTE. ....                             | 115 |
| <b>TABLA 5.17</b> | ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIVARIADO: INGRESO URGENTE  | 116 |

# INDICE DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 1:</b> Sarcómero cardíaco y MCH .....  | 16  |
| <b>Figura 2:</b> Fibrosis miocárdica.....  | 21  |
| <b>Figura 3:</b> Displasia de arteria intramural.....  | 21  |
| <b>Figura 4:</b> Esquema de manejo de los pacientes con MCH.....   | 27  |
| <b>Figura 5:</b> Mecanismo del RTG.....  | 34  |
| <b>Figura 6:</b> Patrones de RTG.....  | 35  |
| <b>Figura 7:</b> Cuantificación del RTG.....   | 36  |
| <b>Figura 8:</b> Miectomía .....   | 42  |
| <b>Figura 9:</b> Ablación septal alcohólica .....  | 43  |
| <b>Figura 10:</b> Esquema del tratamiento sintomático de la MCH .....  | 44  |
| <b>Figura 11:</b> Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona.....   | 57  |
| <b>Figura 12:</b> Mutaciones en genes sarcoméricos de los pacientes del estudio.....   | 99  |
| <b>Figura 13:</b> Número de segmentos con RTG en función de la presencia del<br>polimorfismo RETN.....                                       | 102 |
| <b>Figura 14:</b> Concentración de resistina en función de la presencia del polimorfismo<br>RETN .....                                       | 104 |
| <b>Figura 15:</b> Grado de infiltración del tejido conectivo.....  | 105 |
| <b>Figura 16:</b> Curva ROC del diámetro AI para la predicción de desarrollo de FA. ....   | 107 |
| <b>Figura 17:</b> Curvas de supervivencia en función de la presencia de FA previa y de un<br>diámetro de la AI $\geq 42$ mm. ....            | 109 |
| <b>Figura 18:</b> Curvas de supervivencia en función de la presencia del polimorfismo<br>CYP11B2 -344T y del polimorfismo COL1A1 2046T. .... | 110 |
| <b>Figura 19:</b> Concentración de aldosterona en función de la presencia del polimorfismo<br>CYP11B2 -344T>C. ....                          | 112 |
| <b>Figura 20:</b> Curvas de supervivencia en función de la presencia del polimorfismo<br>COL1A1 2046T y de homocigosis ADBR1 1165C.....      | 116 |

# **1. INTRODUCCIÓN**

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es la más común de las enfermedades cardiovasculares genéticas. Presenta un patrón de herencia autosómica dominante con una penetrancia y expresividad variables (1,2). Esta patología presenta una alta prevalencia: se estima que afecta a 1 de cada 500 personas. Macroscópicamente se define por la presencia de hipertrofia miocárdica en ausencia de una causa suficiente que justifique el grado de hipertrofia (3–5). A nivel microscópico se caracteriza por hipertrofia de los miocitos, desorganización de las fibras miocárdicas, fibrosis y alteraciones de los vasos miocárdicos (6). Y a nivel molecular se objetiva mutaciones en genes que codifican proteínas relacionadas con el sarcómero (7–9). La MCH es una enfermedad cardíaca compleja con una gran heterogeneidad morfológica, fisiopatológica y clínica (10).

## **1.1 CONTEXTO HISTÓRICO**

Las primeras descripciones de la apariencia clásica de hipertrofia asimétrica del septo interventricular las realizaron a finales del siglo XIX dos anatomopatólogos franceses. En 1869, Henri Liouville, describió el caso clínico de una mujer de 75 años con síntomas de insuficiencia cardíaca y un soplo inusual. En la autopsia se encontró un corazón endurecido y rígido, con 4 cm de grosor de la pared ventricular, músculos papilares grandes y un anillo 1 cm por debajo de la válvula aórtica (11). Ese mismo año, François Hallepeau describió el caso de un hombre de 69 años con palpitaciones, mareos y disnea, en el que se detectaba un pulso irregular y un soplo inusual. El paciente falleció súbitamente. En la autopsia se apreciaba una protrusión muscular en el tracto de salida del ventrículo izquierdo y un velo anterior mitral severamente esclerosado y retraído (12).

La primera descripción de la obstrucción funcional del ventrículo izquierdo se atribuye a Russel Claude Brock, cirujano del Guy's Hospital de Londres, quien en 1957 publicó el caso de una mujer de 58 años que desarrolló disnea, angina y síncope en la edad media de la vida. Presentaba signos de estenosis aórtica severa y un electrocardiograma de sobrecarga del ventrículo izquierdo. Durante la intervención quirúrgica se objetivaron unos gradientes severos, con una válvula aórtica normal y una estenosis subvalvular (13).

Un año después, Donald Teare, patólogo forense del St George's Hospital de Londres, en una única comunicación describió la mayoría de las características clave de esta enfermedad. Describió ocho casos de hipertrofia asimétrica en adultos jóvenes, de los que siete murieron súbitamente. Entre las manifestaciones clínicas presentaban palpitations, mareos y síncope. En cinco de ellos había evidencias de insuficiencia cardíaca. Y a nivel anatomopatológico presentaban haces musculares en orientaciones diferentes, separados por tejido conjuntivo. Además, propuso un patrón familiar, al presentar un hermano de uno de los casos una muerte súbita y unos hallazgos anatomopatológicos similares a los de su hermana (14).

Entre 1958 y 1968 los trabajos de Eugene Braundwald y Andrew Glenn Morrow permitieron constituir esta miocardiopatía como una entidad clínica única. Este trabajo culminó con la publicación de un número monográfico en *Circulation* de más de 200 páginas sobre esta entidad, donde se describía la enfermedad en un grupo de 64 pacientes (15) y su manejo farmacológico y quirúrgico (16).

Cuando esta patología centró el interés de la comunidad científica a partir de los años 50, se propusieron distintas potenciales etiologías, como tumores benignos,

exceso de activación catecolaminérgica, trastornos del desarrollo de la cresta neural y procesos inmunológicos (17).

Existía evidencia de la agregación familiar de la MCH en la primera descripción moderna de la enfermedad (14). Sin embargo, la base genética no fue demostrada hasta 1989 con el estudio de una familia francocanadiense de más de 100 miembros. Había centrado el interés de la comunidad científica por una alta incidencia de MS. Tal era ésta que los lugareños la denominaban la “maldición de Coaticook” (18). El estudio de ligamiento permitió identificar la asociación de un locus en el cromosoma 14q1 con la MCH (19). Y poco después se identificó el gen responsable, MYH7, que codifica la cadena pesada de la  $\beta$  miosina (20).

El conocimiento sobre esta patología continuó creciendo. La necesidad de extender este conocimiento a la práctica clínica en una patología tan prevalente llevó a la redacción de un documento de consenso. Éste fue publicado en 2003 por sociedades científicas a ambos lados del atlántico y estaba centrada en el manejo de esta patología (3). Posteriormente, ha sido revisada, aunque ahora por separado, en 2011 por las Sociedades Americanas (4) y en 2014 por la Sociedad Europea de Cardiología (5).

## **1.2 EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL**

La prevalencia de MCH ha sido documentada en distintos países y grupos étnicos. Inicialmente fue estimada a partir de datos de grupos seleccionados como pacientes remitidos a unidades de cardiología, estudios de autopsias o datos hospitalarios sobre altas y mortalidad. Pocos estudios han examinado la prevalencia de la MCH en la población general para evitar los sesgos que se pudieran introducir en



grupos tan seleccionados. Además han utilizado diferentes métodos y criterios diagnósticos. Aun así, la mayoría de estos estudios apuntan a una prevalencia en población general cercana a uno de cada 500 (200/100.000) adultos en diferentes grupos étnicos.

En un estudio epidemiológico de la población del Condado de Olmsted, Minnesota, empleando una base de datos que recogía los datos de todas las atenciones sanitarias de esa población en el periodo de 1975 a 1984 obtuvieron una prevalencia de 19,7/100.000 (21). Como reconocían los propios autores en el artículo original estos datos están basados principalmente en pacientes sintomáticos que acudían a recibir atención sanitaria. En 1995 BJ Maron et al. publicaron datos procedentes del estudio CARDIA (22) diseñado para observar prospectivamente el efecto del estilo de vida y otras variables en los factores de riesgo coronario en personas jóvenes (23-35 años) contactadas al azar en 4 poblaciones urbanas de Estados Unidos entre 1987 y 1988. Revisando los datos ecocardiográficos y clínicos del ensayo de 4111 ciudadanos no emparentados, encontraron una prevalencia de MCH del 0,17% (170/100.000) (23). En 1987, Hada et al. en base a un cribado ecocardiográfico en 12841 trabajadores japoneses, mostraron una prevalencia de 170/100.000 (24). En 2004 se publicaron los datos de un estudio epidemiológico de base poblacional realizado en China. En este estudio se seleccionó al azar, estratificando por sexo y edad, en diferentes localidades. Incluyó 8080 ciudadanos y mostró una prevalencia del 0,16% (160/100.000) (25). Ese mismo año, BJ Maron publicó datos de una cohorte de 13 comunidades tribales de indios americanos del estudio Strong Heart Study (26) cuya finalidad era el estudio de la prevalencia, la incidencia y los factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular. Se incluyó a 3501 sujetos con edades comprendidas entre 51 y 70 años y mostró una prevalencia del 0,23% (230/100.000) (27).

Estos estudios fueron realizados entre 10 y 20 años en el pasado y estaban basados en la ecocardiografía. En este tiempo el conocimiento de esta patología ha ido progresando. Ha dejado de ser una enfermedad rara e intratable para tener una visibilidad mayor. Esto ha traído de la mano una mayor experiencia clínica, un mejor conocimiento de su sustrato molecular y genético, unas técnicas de imagen más precisas y programas de cribado familiares que a la postre pueden permitir diagnosticar casos que antes quedaban ocultos. De hecho, en 2012 Seidman et al. obtuvieron una presencia de mutaciones patogénicas en 8 genes sarcoméricos del 0,6% en 3600 individuos procedentes de las cohortes del Framingham Heart Study y del Jackson Heart Study (28). Así se añadiría a la prevalencia de MCH un grupo de pacientes con genotipo positivo y fenotipo negativo y otro con mínima expresión fenotípica sólo detectable con las actuales técnicas de imagen que requerirán su propio manejo clínico y que en conjunto establecerían la prevalencia de MCH en uno de cada 200 adultos.

La hipertrofia ventricular se desarrolla en los periodos de rápido crecimiento, en algunos casos durante el primer año de vida, pero en general se produce durante la adolescencia (29). Sin embargo, es una patología con el potencial de presentarse en cualquier etapa de la vida (30).

Las mujeres parecen estar infradiagnosticadas, ser más mayores, presentar síntomas más severos, mayor obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo y mostrar una mayor riesgo de progresión a insuficiencia cardíaca y muerte sin mayor riesgo de muerte súbita (MS) (31,32).

En un primer momento se consideró que la MCH tenía muy mal pronóstico con una mortalidad en torno al 5% anual (33), probablemente derivado de un sesgo debido a la referencia de casos a centros especializados donde los pacientes poco sintomáticos

o ancianos estaban muy poco representados. Estudios más recientes de pacientes de edad media muestran una mortalidad en torno al 0,5-1% anual, similar a la población general (34,35). Esta dramática reducción es debido en parte al manejo sistemático que se está alcanzando (fármacos, cirugía, dispositivos) en esta patología.

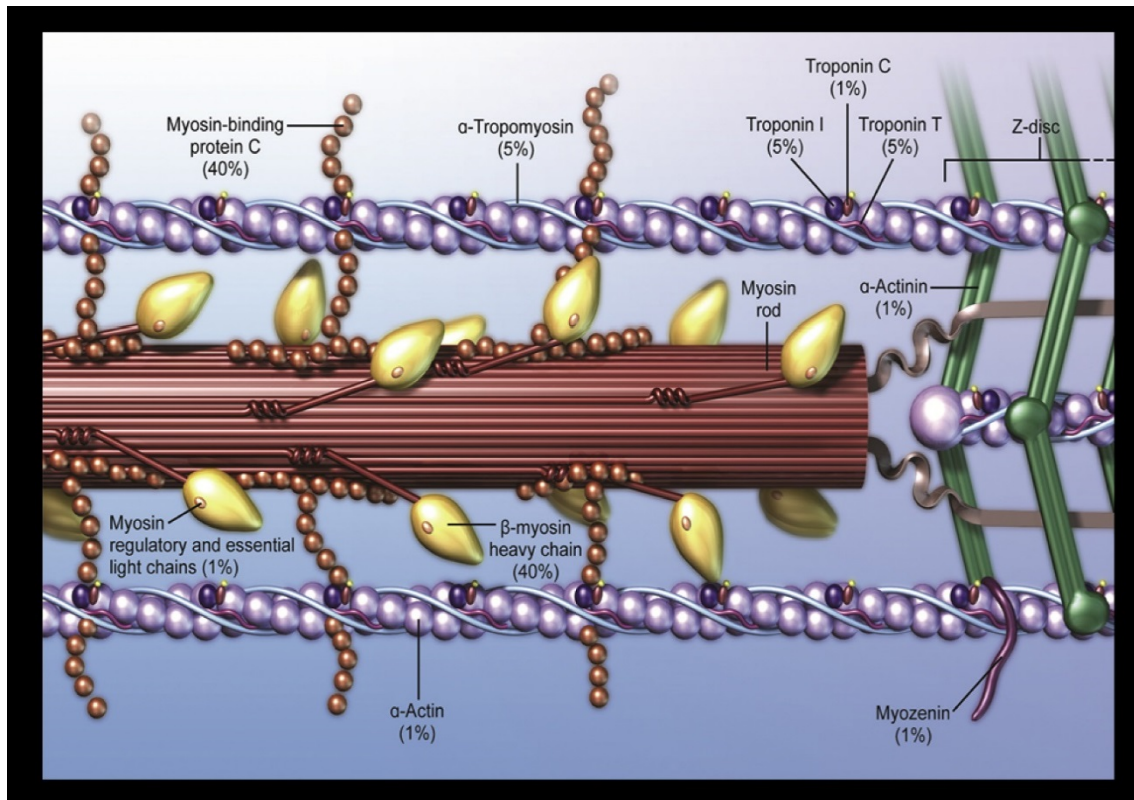
La enfermedad tiene un curso clínico general más favorable de lo que se consideraba inicialmente. Muchos pacientes consiguen alcanzar una expectativa de vida normal, con escasa o ninguna limitación y sin necesidad de intervenciones terapéuticas importantes. Sin embargo, existen subgrupos de pacientes que importantes complicaciones por la enfermedad y muerte prematura. Entre estos subgrupos encontramos a los que presentan una muerte súbita inesperada, síntomas progresivos de insuficiencia cardiaca, disfunción sistólica y remodelado ventricular acompañado de insuficiencia cardiaca terminal y finalmente un subgrupo que padecerá las complicaciones de la fibrilación auricular.

### **1.3 ETIOLOGÍA**

Actualmente sabemos que la MCH se hereda como un rasgo autosómico dominante en la mayoría de casos y es causada por mutaciones en genes que codifican proteínas del sarcómero cardiaco o estrechamente asociadas con él (4). La primera mutación responsable fue identificada en el gen de la cadena pesada de la  $\beta$  miosina (20) y publicada en 1990.

Desde entonces se han publicado más de 1400 mutaciones asociadas con la enfermedad. La mayoría de estas mutaciones afectan a los miofilamentos o a los discos

Z del sarcómero (Tabla 1.1), lo que ha permitido describir a la MCH como una enfermedad del sarcómero (Figura 1).



**Figura 1:** Sarcómero cardíaco y MCH. Representación del sarcómero cardíaco mostrando la localización de las proteínas afectadas por mutaciones asociadas a la MCH. Adaptado de (36).

Se identifican mutaciones consideradas patológicas en el 50-60% de los casos familiares y en un 30-40% de los casos esporádicos (38). La mayoría de las mutaciones se consideran privadas, al estar limitadas a una o unas pocas familias. Además, estudios de haplotipo han permitido demostrar que mutaciones que comparten familias no relacionadas se produjeron en eventos mutacionales distintos. A pesar de que no se crea que la MCH afecte de forma sustancial a la reproducción, otros factores como la muerte súbita en jóvenes y la aparición temprana de comorbilidades como los tromboembolismos, los ictus o la insuficiencia cardíaca podrían favorecer la pérdida de estas mutaciones de la población. Por otro lado, más recientemente se ha identificado

**TABLA 1.1 GENES ASOCIADOS CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.**

| Proteína                                     | Gen    | Localización | MIM gen | Frecuencia |
|--|--------|--------------|---------|------------|
| <b>Miofilamentos</b>                         |        |              |         |            |
| Cadena pesada de la $\beta$ -miosina         | MYH7   | 14q11.2      | 160760  | 10–20%     |
| Proteína C de fijación a la miosina cardíaca | MYBPC3 | 11p11.2      | 600958  | 15–30%     |
| Troponina cardíaca T                         | TNNT2  | 1q32.1       | 191045  | 3–5%       |
| Troponina cardíaca I                         | TNNI3  | 19q13.42     | 191044  | <5%        |
| Cadena de la tropomiosina $\alpha$ 1         | TPM1   | 15q22.2      | 191010  | <5%        |
| Titina                                       | TTN    | 2q31.2       | 188840  | <5%        |
| Cadena ligera reguladora de la miosina       | MYL2   | 12q24.11     | 160781  | <2%        |
| Cadena ligera esencial de la miosina         | MYL3   | 3p21.31      | 160790  | 1%         |
| Actina, $\alpha$ 1, músculo cardíaco         | ACTC1  | 15q14        | 102540  | 1%         |
| Troponina cardíaca C                         | TNNC1  | 3p21.1       | 191040  | <1%        |
| Cadena pesada de la $\alpha$ -miosina        | MYH6   | 14q11.2      | 160710  | <1%        |
| <b>Discos Z</b>                              |        |              |         |            |
| Proteína 3 unión dominio LIM (cypher)        | LBD3   | 10q23.2      | 605906  | 1-5%       |
| Proteína 3 rica en cisteína y glicina        | CSRP3  | 11p15.1      | 600824  | <1%        |
| Actina, $\alpha$ 2, músculo cardíaco         | ACTN2  | 1q43         | 102573  | <1%        |
| Teletonina                                   | TCAP   | 17q12        | 604488  | <1%        |
| Vinculina/Metavinculina                      | VCL    | 10q22.2      | 193065  | <1%        |
| Miozenina                                    | MYOZ2  | 4q26         | 605602  | <1%        |
| Nexilina                                     | NEXN   | 1p31.1       | 613121  | <1%        |
| <b>Manejo del calcio</b>                     |        |              |         |            |
| Phospholamban                                | PLN    | 6q22.31      | 172405  | <1%        |
| Calsequestrina                               | CASQ2  | 1p13.1       | 114251  | <1%        |
| Junctofilina 2                               | JPH2   | 20q13.12     | 605267  | <1%        |

Adaptado de (5,38,39).

algunas mutaciones que están presentes en muchas familias no relacionadas entre ellas con un origen común (9). Estas mutaciones fundadoras mantenidas a través de las sucesivas generaciones ponen de manifiesto que no todas las mutaciones tienen los mismos efectos deletéreos. Para poder ser transmitida a la descendencia debe tener un efecto neutro sobre la selección en la evolución humana con impacto mínimo o tardío en la supervivencia de los individuos.

Las mutaciones patogénicas frecuentemente son mutaciones con sentido erróneo o contrasentido (*missense*) en las que se produce el cambio en un único nucleótido que origina un codón no sinónimo y da lugar a un cambio en un aminoácido en la proteína. En otras ocasiones la mutación da lugar a un cambio más radical en la proteína o al truncamiento de ésta, como las mutaciones desfase o cambio de marco (*frameshift*) producidas por la inserción o delección de un número de nucleótidos no múltiplo de 3 en la región codificante, las mutaciones sin sentido (*nonsense*) que dan lugar a la terminación precoz de la transcripción de la proteína o las mutaciones que afectan a la zona de corte y empalme (*splicing*) del ARN mensajero. Estas mutaciones son capaces de dar lugar a proteínas levemente modificadas, francamente acortadas o incluso a la ausencia de la proteína (haploinsuficiencia) debido al rápido deterioro del ARN mensajero o de la proteína en el citoplasma.

De todos los posibles genes implicados, las mutaciones en los genes MYH7 y MYBPC3 representan más del 70% de los casos. Mientras el resto de genes representa en torno a 1-5% cada uno (5). No parece que pueda establecerse claras diferencias fenotípicas (edad de presentación, máxima hipertrofia, pronóstico) en base al gen mutado (40).

Existe un grupo de enfermedades poco frecuentes que afectan al metabolismo y al depósito miocárdico que presentan HVI con un patrón y extensión que imita a la MCH, incluso con agregación familiar. A este grupo de enfermedades se las suele denominar “*fenocopias*” de MCH, si bien no es una aplicación *sensu stricto* del término al no deberse esta expresión fenotípica al efecto de factores ambientales, sino genéticos. Así, al realizar un estudio genético, nos encontramos con que no portan mutaciones en genes sarcoméricos ni relacionados con éstos, sino en otras localizaciones (Tabla 1.2).

**TABLA 1.2 GENES ASOCIADOS CON HIPERTROFIA CARDIACA**

| Proteína  | Gen    | Fenotipos asociados                | Transmisión/<br>Frecuencia |
|---|--------|------------------------------------|----------------------------|
| Proteína quinasa activada por AMP subunidad gamma 2 | PRKAG2 | Sd. Wolff– Parkinson– White        | Dominante/raro             |
| Proteína 2 asociada a la membrana lisosomal         | LAMP2  | Danon                              | Dominante/raro             |
| Galactosidasa alfa                                  | GLA    | Fabry                              | Ligado al X/1 – 2% varones |
| Cuatro y medio dominios LIM 1                       | FHL1   | Enfermedades relacionadas con FHL1 | Ligado al X /raro          |
| Transtiretina                                       | TTR    | Amiloidosis                        | Dominante                  |
| Glucosidasa alfa                                    | GAA    | Pompe                              | Recesivo/raro              |
| Fosfotirosina fosfatasa no receptora tipo 11        | PTPN11 | Noonan                             | Dominante/raro             |
| Frataxina   | FXN    | Friedreich                         | Recesivo/raro              |

Adaptado de (38)

La identificación de estas “*fenocopias*” tiene una importancia crucial ya que presentan patrones de herencia, histología, fisiopatología, historia natural y manifestaciones extracardíacas distintas, y en algunos casos opciones de tratamiento distintas. Una adecuada valoración clínica del paciente y su familia, y la valoración genética guiada permite identificar precozmente a estos pacientes y ofrecerles las opciones de tratamiento y seguimiento más adecuadas (41). En otras ocasiones, es el

estudio genético en un paciente con HVI es el que va a poder permitir diferenciar a estos pacientes y permitir opciones de tratamiento que influyan en su pronóstico (42).

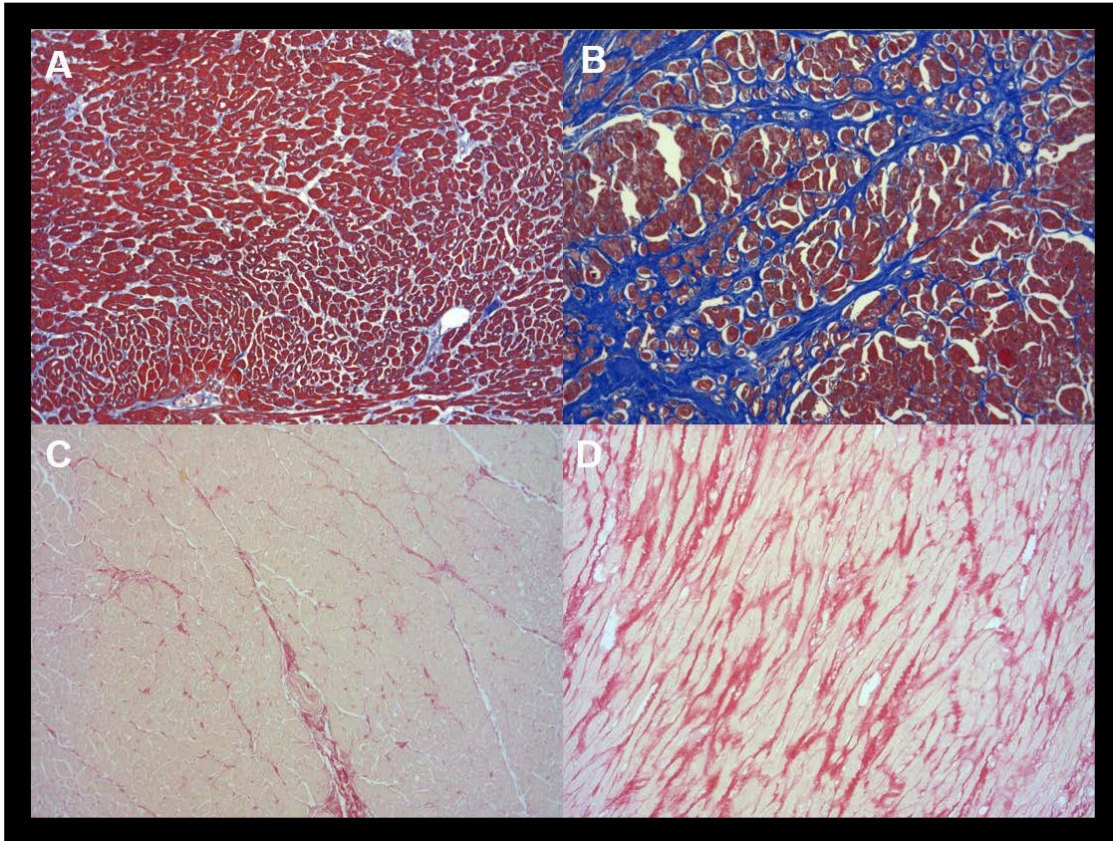
## 1.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA

La MCH se caracteriza (Tabla 1.3) por la presencia de hipertrofia miocárdica con aumento de la masa y en combinación con cavidades ventriculares pequeñas o no dilatadas. Las aurículas suelen estar dilatadas y generalmente hipertrofiadas. Entre los hallazgos microscópicos destacan la hipertrofia de las fibras miocárdicas y desorganización de las fibras musculares (*disarray*). La fibrosis intersticial es importante e incluso puede observarse áreas macroscópicas de cicatrices (Figura 2). Las coronarias intramiocárdicas también presentan anomalías estructurales de forma habitual (Figura 3).

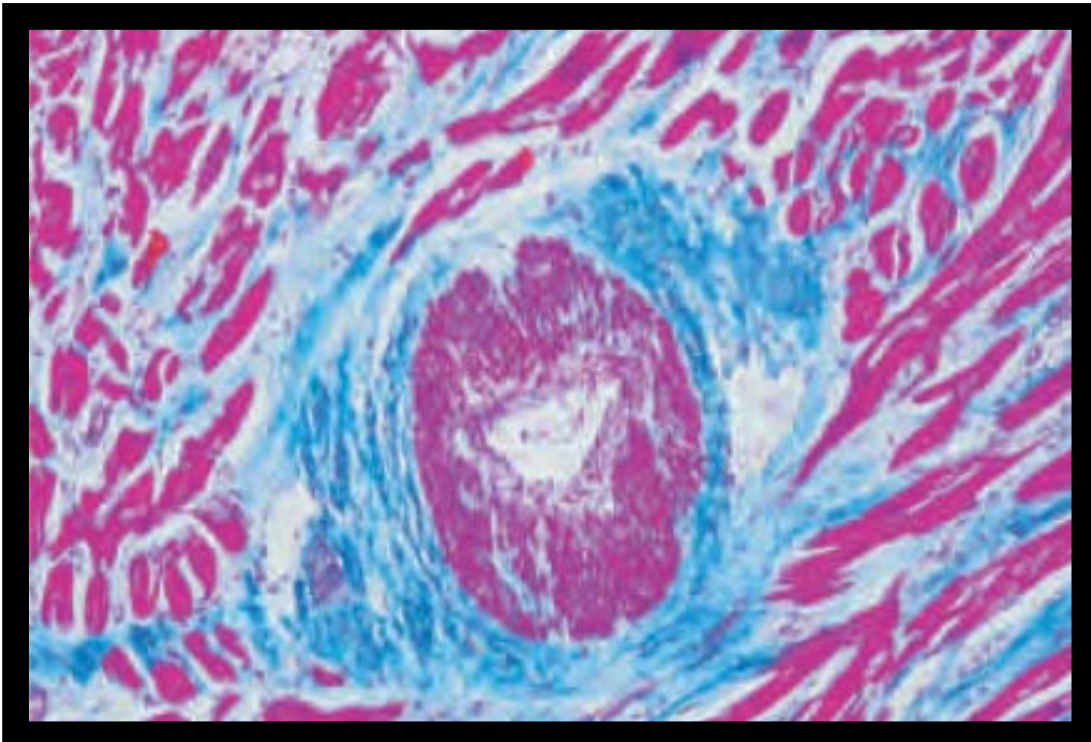
**TABLA 1.3 CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DE LA MCH**

|  |
|--|
| A nivel macroscópico podemos encontrar:  |
| Hipertrofia cardíaca (con un peso que puede superar los 500 gramos).   |
| Hipertrofia preponderante del ventrículo izquierdo.  |
| La hipertrofia del ventrículo izquierdo adopta distintas localizaciones.   |
| Trabéculas y músculos papilares prominentes.   |
| Aspecto arremolinado del miocardio.  |
| Focos cicatriciales blanquecinos de distribución variable (no siguen una distribución vascular).   |
| Placa de fibrosis endocárdica subaórtica en la zona de contacto del velo anterior mitral con el septo.   |
| Dilatación del ventrículo en fase terminal.  |
| A nivel microscópico se caracteriza por:   |
| Hipertrofia de los miocitos, con aumento del diámetro transversal y núcleos hiper cromáticos.  |
| Desorganización de las fibras miocárdicas ( <i>disarray</i> ), que se disponen formando ángulos o adoptando aspecto arremolinado o fascículos dispuestos perpendicularmente. |
| Fibrosis intersticial  |
| Arterias intramiocárdicas con paredes engrosadas por hipertrofia y desorden de la capa media y fibrosis intimal.   |





**Figura 2:** Fibrosis miocárdica. Distintos grados de fibrosis intersticial en imágenes microscópicas (x100) de muestras miocárdicas de pacientes con MCH. A y B, fibrosis intersticial teñida de azul con la tinción tricrómica de Masson. C y D, fibrosis intersticial teñida de rojo con la tinción de rojo de Picrosirio.



**Figura 3:** Displasia de arteria intramural con pared engrosada y alteración de la media. Adaptado de (43)..

La presencia de este *disarray* no es patognomónica, lo que es característico es su amplia distribución (44,45). Se ha sugerido que el *disarray* es un efecto primario generado por las mutaciones relacionadas con el sarcómero y que la fibrosis y las alteraciones en las arterias intramiocárdicas son fenómenos secundarios no relacionados con el *disarray* (46).

## **1.5 FISIOPATOLOGÍA**

En la fisiopatología de la MCH intervienen en distinto grado la obstrucción del TSVI, la disfunción diastólica, la disfunción sistólica y la isquemia miocárdica.

### **1.5.1 Obstrucción del TSVI**

Se considera que existe obstrucción clínicamente significativa cuando el gradiente es superior a 30 mmHg y probablemente mayor de 50 mmHg. De hecho, se emplea este último valor para aceptar un tratamiento invasivo en un paciente sintomático con obstrucción (5). En torno a un 30% de los pacientes presenta en reposo una obstrucción dinámica causada por el movimiento sistólico anterior de los velos mitrales. Es bien conocido que pacientes sin evidencia de obstrucción en reposo pueden desarrollarla mediante ejercicio o fármacos que disminuyan el volumen telediastólico del ventrículo izquierdo o que aumenten su contractilidad. Esta obstrucción dinámica muestra una variabilidad espontánea, y hasta un 35% de los pacientes considerados sin obstrucción por ecocardiografías previas presentan obstrucción en las posteriores (47). De modo que se estima que en torno a un 70% de los pacientes con MCH presentan obstrucción en reposo o con ejercicio (48).

En la inmensa mayoría de los pacientes la obstrucción se produce por el movimiento sistólico anterior de los velos mitrales (en inglés SAM, *systolic anterior motion*). Inicialmente se consideraba que era debido a que la contracción ventricular originaba un chorro de alta velocidad a través de un TSVI estrechado por la hipertrofia septal que succionaba los velos mitrales hacia el septo. De modo que la válvula mitral tenía un papel pasivo secundario al efecto Venturi que aumentaba la obstrucción. Sin embargo, a medida que crece el conocimiento, el mecanismo que genera el SAM se perfila más complejo y parece resultar de la interacción del septo interventricular, una anatomía valvular mitral anormal y un flujo alterado en la cavidad ventricular (49). Se había observado como el SAM se iniciaba antes de la apertura de la válvula aórtica, cuando el efecto Venturi debía ser mínimo. Esto sugiere que la posición de los velos mitrales respecto al tracto de salida son los principales determinantes de la obstrucción. En algún paciente se aprecia un desplazamiento anterior de los músculos papilares que favorece que la zona de coaptación esté más anterior. Esto unido a unos velos mitrales elongados configura a la válvula mitral cerrada como una vela a la espera de un flujo ventricular. Este flujo incide sobre la válvula, más que paralela a ella, con lo que es arrastrada hacia el TSVI.

En la mayoría de los pacientes, este SAM genera una insuficiencia mitral de grado variable con un chorro dirigido posteriormente en la AI. Si el chorro está dirigido central o anterior en la AI, hay que sospechar una afectación intrínseca de la válvula. Su identificación y severidad puede tener importantes implicaciones a la hora de elegir la mejor opción terapéutica de la obstrucción.

Otra causa de obstrucción del TSVI en estos pacientes es la inserción anómala del músculo papilar directamente en el velo anterior mitral. Su identificación no siempre es sencilla y tiene importantes implicaciones en la elección del tipo de técnica quirúrgica

que pudiera requerir el paciente (50). En algunos casos la obstrucción se genera a nivel medioventricular asociado a la obliteración de la cavidad (51).

El grado de obstrucción que exhibe un paciente puede llegar a ser muy variable. Se conoce una serie de factores moduladores que pueden afectar a esta variabilidad a través de su efecto sobre la precarga, la postcarga y la contractilidad (Tabla 1.4).

**TABLA 1.4 MODULADORES DE LA OBSTRUCCIÓN DINÁMICA DEL TSVI**

| <b>Aumentan la obstrucción</b>      | <b>Disminuyen la obstrucción</b>    |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Disminuyen la precarga</b>       | <b>Aumentan la precarga</b>         |
| Frecuencia cardiaca elevada         | Frecuencia cardiaca disminuida      |
| Hipovolemia/Deshidratación/Diuresis | Repleción de volumen                |
| Maniobra de Valsalva                | Maniobra de Müller                  |
| Ponerse de pie                      | Ponerse de cuclillas                |
| Ambiente cálido                     | Ambiente frío                       |
| Estado postprandial                 | Elevación de piernas                |
| <b>Disminuyen las postcarga</b>     | <b>Aumentan la postcarga</b>        |
| Fármacos vasodilatadores            | Fármacos vasoconstrictores          |
|                                     | Presión manual isométrica           |
| <b>Aumentan la contractilidad</b>   | <b>Disminuyen la contractilidad</b> |
| Fármacos inotropos positivos        | Fármacos inotropos negativos        |

Adaptado de (49)

La obstrucción dinámica del TSVI es característica de la MCH pero no patognomónica. Puede encontrarse en estados de hipercontractilidad, hiperactividad simpática, reducción de precarga, hipertrofia ventricular de otra causa, calcificación del anillo mitral a nivel posterior, transposición de los grandes vasos e infiltración del septo.

### 1.5.2 Disfunción diastólica

Los síntomas en pacientes con MCH no obstructiva son causados frecuentemente por alteraciones en la función diastólica. En la función diastólica normal encontramos una relación presión-volumen en el ventrículo en la que aumentos fisiológicos del llenado no se asocian con un aumento de la presión telediastólica ni de las presiones de llenado. En la MCH nos encontramos con un tiempo de relajación isovolumétrica aumentado, la fase de llenado rápido está prolongada y se asocia con una disminución de la velocidad y del volumen de llenado, existe un incremento compensatorio de la contracción auricular al llenado y una presión telediastólica aumentada. Entre las causas de esta disfunción diastólica se encuentran la anormal geometría ventricular, la hipertrofia de los miocitos y la desorganización de las miofibrillas, la fibrosis intersticial, el metabolismo intracelular anormal del calcio y la isquemia miocárdica (52,53).

### 1.5.3 Disfunción sistólica

Los síntomas de insuficiencia cardiaca congestiva son frecuentes en los pacientes con MCH con mediciones normales de la función sistólica con las técnicas habituales (FEVI). Sin embargo, mediante técnicas de Doppler tisular y *strain* se ha

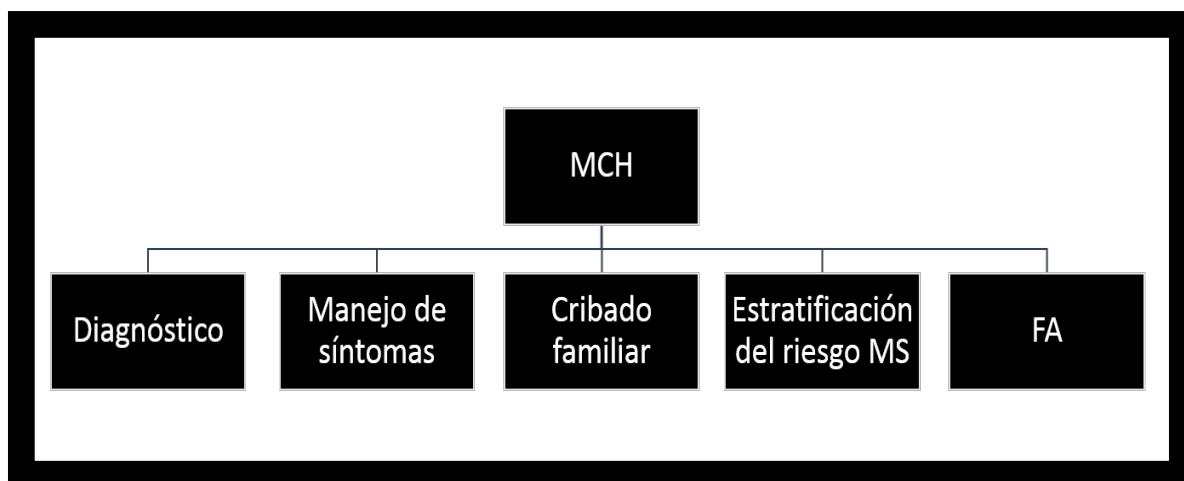
objetivado la presencia de alteraciones sistólicas como un acortamiento longitudinal reducido, o variaciones regionales en ésta así como alargamiento sistólico paradójico (54,55). Por otro lado, la presencia de una FEVI reducida no es muy frecuente en este colectivo (2-3%). Si bien, ésta se asocia con una mayor probabilidad de adelgazamiento de la pared ventricular, dilatación de la cavidad ventricular, deterioro de la capacidad funcional (NYHA), muerte y trasplante cardiaco (56). La insuficiencia cardiaca constituye una de las principales causas de muerte en estos pacientes, especialmente en edades avanzadas. Entre los predictores de muerte por insuficiencia cardiaca encontramos el tamaño de la AI, el diámetro telediastólico del VI, la presión telediastólica del VI y una mala capacidad funcional en la evaluación inicial (57,58).

#### **1.5.4 Isquemia miocárdica**

Los pacientes con MCH presentan una disminución del flujo coronario de reserva y evidencia metabólica de isquemia inducida por la estimulación por marcapasos o farmacológica (59). Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar esta isquemia se encuentran la enfermedad de pequeño vaso, una densidad capilar disminuida, la compresión de las arterias epicárdicas y un aumento de las demandas de oxígeno. La presencia de esta isquemia se objetiva en ausencia de lesiones obstructivas en las arterias epicárdicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta la presencia de comorbilidades en estos pacientes. De modo que la presencia de aterosclerosis coronaria en estos pacientes no es infrecuente, tanto en estudios antiguos como recientes (60–62), y que se asocia con un peor pronóstico frente a los pacientes con MCH sin estas lesiones (63).

## 1.6 MANEJO CLÍNICO

La MCH ha dejado de ser una patología poco frecuente y con un mal pronóstico, para convertirse en un entidad que se presenta con creciente visibilidad no sólo en las consultas y unidades especializadas, sino también en atención primaria. En este proceso han contribuido tanto el mayor conocimiento de la enfermedad por los clínicos y el desarrollo de las técnicas diagnósticas como el interés de la sociedad general por esta patología y su asociación con la MS. El desafío clínico que implica requiere tener en consideración una serie de tareas:



**Figura 4:** Esquema de manejo de los pacientes con MCH.

### 1.6.1 Diagnóstico

Es el punto de partida y tiene una importancia excepcional debido a que la primera manifestación en un paciente asintomático puede ser una MS. Cualquier contacto con un paciente puede ser una oportunidad para detectar un caso y diagnosticarlo de MCH.

### 1.6.1.1 Anamnesis

Muchos pacientes con MCH permanecen asintomáticos durante toda su vida o durante gran parte de ésta. Sin embargo, otros pacientes presentan síntomas incluso antes de que se hagan evidentes las alteraciones electrocardiográficas o ecocardiográficas. Entre los pacientes sintomáticos, la disnea y la angina con el esfuerzo, son los síntomas más frecuentes, y habitualmente tienen una intensidad que varía cada día. Un grupo más reducido de los pacientes refieren clínica de síncope o presíncope. Y otros pueden aquejar episodios de palpitaciones causados por contracciones cardiacas sintomáticas o ectopia ventricular. Los episodios de palpitaciones más prolongados se encuentran frecuentemente relacionados con arritmias supraventriculares.

Característicamente, es frecuente que los pacientes refieran que las comidas, especialmente si son abundantes, les desencadenen o intensifiquen los síntomas y que se vean obligados a guardar reposo durante unas horas. Esto se detecta en torno a un tercio de los pacientes, y además se asocia con peor clase funcional (NYHA III-IV), peor calidad de vida percibida y presíncope (64). Se ha comprobado que la ingesta produce una disminución de las resistencias vasculares periféricas totales y un aumento de la frecuencia cardiaca que es el responsable del aumento del gasto cardiaco en esta situación (65). La ingesta de alcohol también puede intensificar los síntomas. Se ha podido comprobar por ecocardiografía como la ingesta de alcohol produce un descenso de la TA, un aumento del SAM y un aumento del gradiente en TSVI obtenido por Doppler (66).



### 1.6.1.2 Exploración física

La exploración física de muchos pacientes puede ser normal. Muchos de los signos exploratorios dependen de la presencia de obstrucción del TSVI y ésta, al ser variable, puede dar lugar a una exploración normal o con signos poco evidentes. A la palpación el impulso apical se encuentra frecuentemente desplazado a la izquierda y es más fuerte y difuso. El pulso venoso yugular puede mostrar una *onda a* prominente, que refleja también la falta de distensión del ventrículo derecho. La palpación carotídea puede mostrar un pulso *bisferens* con un rápido y enérgico ascenso inicial seguido por una caída mesosistólica y un segundo pico. A la auscultación, el segundo ruido puede presentar un desdoblamiento paradójico en ventrículos con una obstrucción significativa que retrase el cierre de la válvula aórtica. Un 4º ruido puede estar presente en pacientes en ritmo sinusal, en los que la aurícula eyecta sangre en un ventrículo poco distensible. Se puede oír dos tipos de soplos. Un soplo mesosistólico en ápex irradiado a axila, producido por la insuficiencia mitral que genera el SAM. Y un soplo mesosistólico áspero creciente-decreciente que se aprecia mejor en el borde esternal izquierdo y simula una estenosis aórtica, aunque habitualmente no se irradia a carótidas. Modificando la precarga y la postcarga (Tabla 1.4) podemos intentar diferenciar las dos entidades. Además, el pulso *parvus et tardus* de la estenosis aórtica severa puede ayudarnos en este punto.

### 1.6.1.3 Pruebas complementarias

#### ELECTROCARDIOGRAMA

El electrocardiograma es una técnica muy accesible y barata. Un alto porcentaje de los pacientes presenta algún tipo de anormalidad, especialmente los pacientes

sintomáticos. Aunque estas anormalidades no son específicas. Típicamente se puede apreciar grandes voltajes acompañados de amplias alteraciones de la repolarización. En otras ocasiones encontramos ondas Q prominentes en cara inferior y lateral, desviación del eje del QRS a la izquierda, alteraciones en la onda P y una morfología inicial del QRS que simula una onda delta. No es infrecuente encontrar signos de crecimiento de la AI y de afectación biventricular. También pueden asociar trastornos de la conducción aurículo-ventricular con bloqueos de distinto grado. Las onda T gigantes en derivaciones precordiales medias son características de la MCH que afecta a los segmentos apicales y es más frecuente en pacientes japoneses (67,68), pero dicho patrón puede encontrarse en pacientes de raza blanca. Los amplios voltajes se correlacionan pobremente con la magnitud de la HVI medida por ecocardiografía y no permiten diferenciar las formas obstructivas de las no obstructivas (69).

## ECOCARDIOGRAFÍA

Hasta este punto con la anamnesis, la exploración física y el electrocardiograma podremos sospechar una MCH. Pero para establecer el diagnóstico es necesario objetivar un grosor ventricular  $\geq 15$  mm con una técnica de imagen (5). En familiares de pacientes con diagnóstico establecido se aceptan valores menores para asentar el diagnóstico. Además, estas técnicas de imagen nos ayudan a excluir otras posibles causas de hipertrofia ventricular, para poder establecer el diagnóstico.

La ecocardiografía es la técnica de imagen más empleada en los pacientes con MCH por su amplia distribución y accesibilidad así como por su inocuidad. Resulta fundamental tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y además arroja información pronóstica en estos pacientes. Una de sus principales ventajas es que nos

permite explorar el ventrículo, las válvulas y la obstrucción del TSVI durante maniobras de provocación (Valsalva) y durante el ejercicio.

La información que es capaz de proporcionar la podemos agrupar en los siguientes apartados:

► *Valoración de la hipertrofia ventricular.*

Es la característica ecocardiográfica cardinal. Aunque lo más frecuente es encontrar una afectación de los segmentos septales, también suele afectarse la pared lateral y el ápex.

► *Valoración de la obstrucción del TSVI.*

Mediante el empleo del Doppler continuo, Doppler pulsado, Doppler color podemos obtener medidas precisas del gradiente ventricular. La presencia de un gradiente basal  $\geq 30$  mmHg se asocia de forma independiente con el desarrollo de síntomas de insuficiencia cardíaca, con una menor supervivencia global y una mayor incidencia de MS (70,71). Además, en pacientes sin gradiente basal, es importante descartar un gradiente provocable, mediante una maniobra de Valsalva, por ejemplo. Por otro lado, nos va a permitir objetivar el SAM mediante modo M ó 2D, así como identificar otras alteraciones relacionadas como un gradiente medioventricular o la inserción de un músculo papilar en el velo anterior mitral.

► *Valoración de la insuficiencia mitral.*

Mediante distintas técnicas Doppler podremos identificar su presencia y valorar su severidad teniendo en cuenta su variabilidad dependiendo de las condiciones hemodinámicas. Además nos permitirá sospechar una afectación intrínseca de la válvula ante chorros no dirigidos hacia la pared posterior.

► *Tamaño de la aurícula izquierda.*

Su volumen está determinado por la presencia de disfunción diastólica e insuficiencia mitral por el SAM. Su dimensión lineal (diámetro anteroposterior) se ha asociado de forma independiente con el pronóstico a largo plazo de estos pacientes (MS y riesgo de tromboembolismo) (72,73). Se recomienda calcular e indexar su volumen. Un volumen indexado  $>27$  ml/m<sup>2</sup> es predictivo eventos cardiovasculares (74). La dilatación de la AI también se relaciona con una peor clase funcional de la NYHA y con una peor capacidad de ejercicio en la ergometría en pacientes con MCH (75). En este mismo estudio, el volumen de la AI se correlacionó con los niveles de NT-proBNP, MMP-2 y proteína C reactiva y por tanto con la presión intraventricular, el remodelado intersticial y el estado inflamatorio.

► *Valoración de la función sistólica.*

La función sistólica global medida mediante la FEVI es normal o está incluso aumentada en muchos pacientes. Sin embargo, la detección de su deterioro tiene importantes implicaciones pronósticas como se ha comentado previamente. En cuanto a la función sistólica regional, mediante técnicas de Doppler tisular y *speckle tracking* permiten identificar alteraciones a este nivel con mayor frecuencia (76). Aunque su utilidad clínica no está firmemente establecida.

► *Valoración de la función diastólica.*

Muchos pacientes presentan disfunción diastólica pese a presentar o no síntomas u obstrucción. En la valoración de la función diastólica se aboga por una aproximación integral de los datos en conjunto que incluye patrones doppler, el flujo en las venas pulmonares, la presión sistólica de la arteria pulmonar y el tamaño de la aurícula (77). Los pacientes con MCH y patrón de llenado restrictivo ( $E/A >2$ ,  $TDE <150$

ms) presentan una mayor incidencia de efectos adversos, incluso cuando tienen la FEVI conservada. La dilatación de la AI también se puede considerar como un marcador de disfunción diastólica con importantes implicaciones pronósticas como se ha comentado previamente. La estimación no invasiva de las presiones de llenado mediante Doppler correlaciona de forma modesta con las mediciones invasivas. Sin embargo, una relación  $E/e' > 12-15$  se ha correlacionado de forma independiente con la capacidad de ejercicio y el pronóstico en estos pacientes (5).

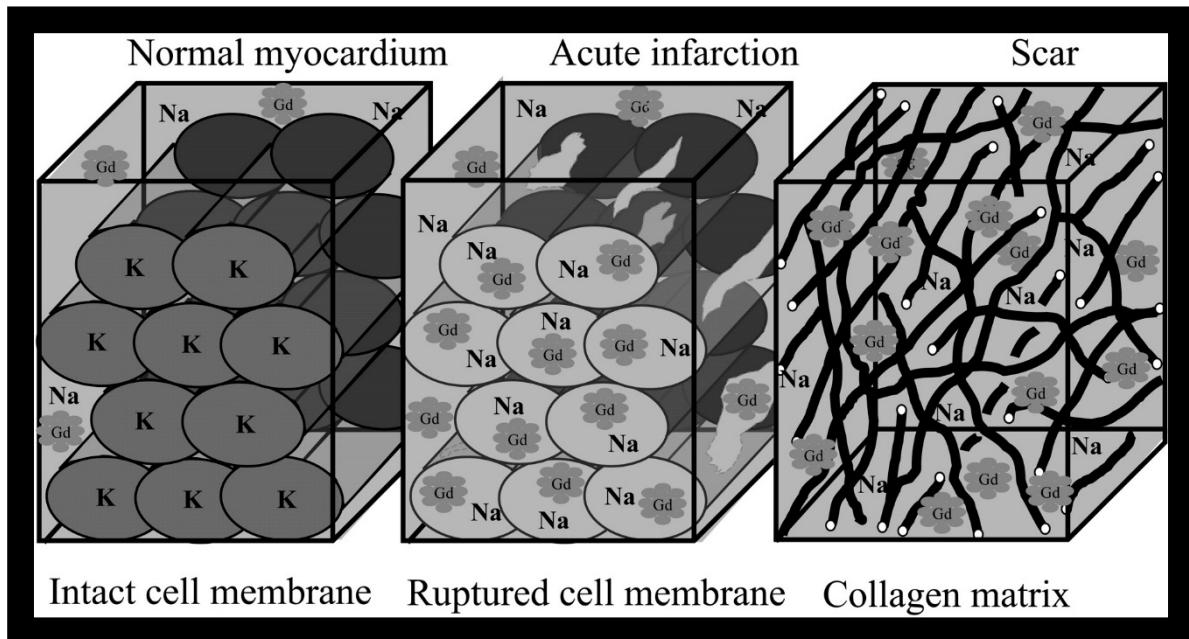
## RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIACA

La resonancia magnética cardíaca (RMC) se ha establecido como una modalidad de imagen no invasiva capaz de proporcionar imágenes de alta resolución del corazón en cualquier plano requerido y sin radiación ionizante. Consta de varias técnicas que nos proporcionan información sobre morfología y función (cine), perfusión tisular (realce de primer paso de contraste) y caracterización tisular no invasiva (realce tardío con gadolinio, RTG).

Tras 10-20 minutos de su administración intravenosa, el gadolinio persiste en la matriz extracelular y se acumula en zonas de fibrosis (78) y posiblemente en menor grado, en zona con importantes desestructuración (79,80). Esto nos permite estudiar la fibrosis in vivo.

El mecanismo del RTG se basa en dos hechos. Por un lado, los quelatos de gadolinio son agentes de contraste extracelular, inertes, que no atraviesan la membrana celular de los miocitos. Y por otro lado, el miocardio normal presenta fibras miocárdicas densamente apuestas. De forma que el miocardio normal presenta poco volumen de

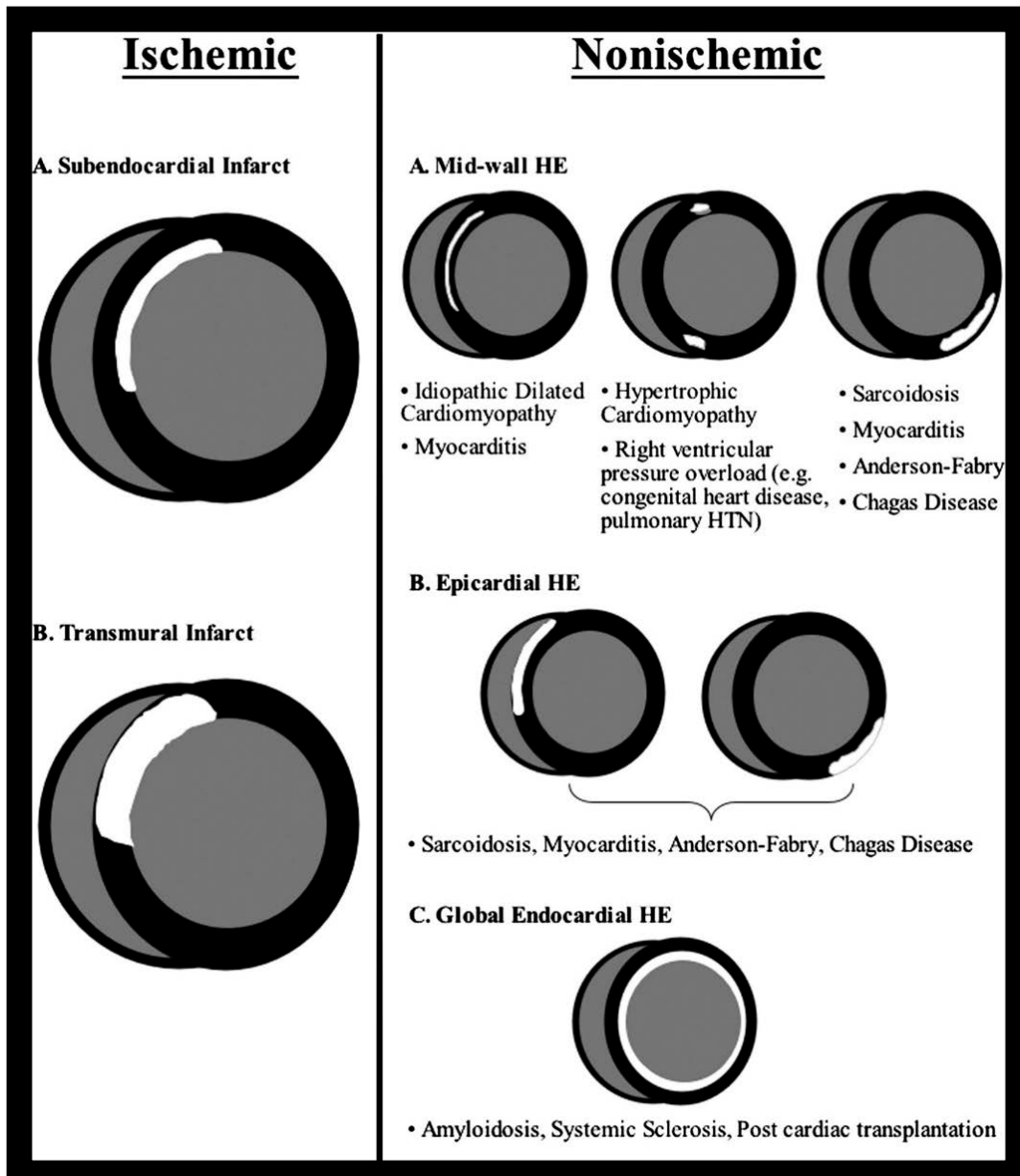
distribución para el gadolinio y la cantidad de moléculas de éste que puede albergar es pequeña. Esta situación cambia en el contexto de ruptura de membranas durante un infarto agudo de miocardio o en el caso de expansión del espacio intersticial por fibrosis en el caso de una cicatriz en un infarto crónico (Figura 5).



**Figura 5:** Mecanismo del RTG. Adaptado de (81).

Los distintos patrones en el RTG están demostrando una gran utilidad en la diferenciación entre la miocardiopatía isquémica y la no isquémica, así como en la identificación de distintas etiologías en las miocardiopatías no isquémicas (Figura 6).

La correlación histológica entre el RTG y fibrosis en la MCH se ha llevado a cabo de manera menos robusta que en el infarto de miocardio, pero varios estudios han aportado evidencia. Moon *et al* en el estudio de un único corazón explantado para trasplante observaron una fuerte correlación entre el RTG y la fibrosis miocárdica (colágeno miocárdico) (79). En una serie de 29 pacientes a los que se les realizó una miectomía, Moravsky *et al* demostraron una buena correlación entre la cuantificación histológica de fibrosis y el RTG (81).

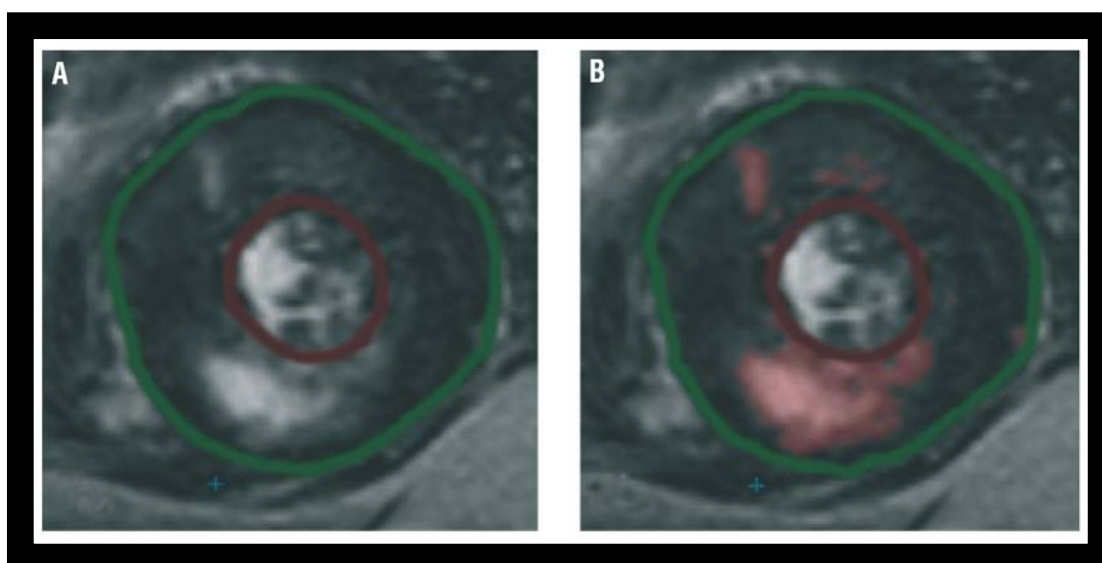


**Figura 6:** Patrones de RTG. Adaptado de (81).

El RTG está presente en la mayor parte de los pacientes con MCH (50-80%). Además, presenta un patrón peculiar: aparece sólo en las zonas hipertrofiadas, afecta principalmente al tercio medio de la pared ventricular y lo hace de forma parcheada (82,83). La afectación transmural no es infrecuente (84). Y como media, afecta a un 10% del volumen miocárdico. Además puede afectar al ventrículo derecho y a los músculos papilares.

El RTG se asocia con una peor capacidad de esfuerzo en los pacientes con MCH (85) y con un mayor grosor ventricular (86) y cada vez se está haciendo más patente su valor pronóstico. De hecho, el RTG se asocia con una mayor progresión de los síntomas de insuficiencia cardiaca, con la presencia de TV no sostenida y con una mayor agrupación de factores de riesgo de MS y muerte cardiovascular (83,86). Esto sugiere que el RTG identifica un sustrato arritmogénico responsable de arritmias ventriculares en estos pacientes. Así, en un reciente metaanálisis que ha incluido más de 3000 pacientes, seguidos prospectivamente durante un promedio de 3 años, el RTG se ha asociado de forma significativa con el riesgo de MS, la mortalidad cardiovascular y la mortalidad por todas las causas (87).

Sin embargo, un marcador de muerte súbita con una prevalencia tan alta (50-80% de los pacientes presentan RTG) no puede ser un marcador práctico de MS. Probablemente sea más útil su extensión (Figura 7). En un estudio multicéntrico, recientemente publicado, que incluyó 1293 pacientes, seguidos durante más de 3 años, fue la extensión la que se asoció a la MS (HR: 1,46/10% incremento de RTG). En este



**Figura 7:** Cuantificación del realce tardío con gadolinio. A, imagen de RMN en eje corto del VI, se delimita el borde epicárdico (línea verde), el borde endocárdico (línea roja) y las áreas de RTG (blanco intramiocárdico). B, misma imagen, procesada por un software que permite la identificación automática del RTG (área rosa) y su cuantificación respecto a la masa miocárdica total. Adaptado de (85).



estudio, un porcentaje >15% de RTG respecto a la masa miocárdica total se asociaba con el doble de riesgo de MS en pacientes considerados de bajo riesgo con los métodos habituales (88). Aparte de la MS, en otro estudio de pacientes con MCH y función sistólica deprimida (FEVI<50%) la extensión de la fibrosis, valorada por RTG, fue un mejor predictor que la propia FEVI de eventos durante el seguimiento (muerte cardiovascular, arritmia letal, ictus cardioembólico e ingreso urgente) (89).

La información más relevante que es capaz de proporcionar la RMC la podemos agrupar en los siguientes apartados:

► *Caracterización del fenotipo*

Permite una clara delimitación del borde epicárdico y el borde endocárdico sin las limitaciones habituales de imprecisión generadas por la ventana acústica de la ecocardiografía (especialmente en la pared anterolateral). Esta medición precisa del grosor ventricular tiene importantes implicaciones en la identificación del riesgo de MS.

La RMC ha permitido identificar la zona de confluencia del segmento anterior basal y septoanterior basal como la más frecuentemente hipertrofiada (70%). Por ecocardiografía se consideraba al segmento septoanterior basal. La mayoría de los pacientes presenta una afectación difusa con hipertrofia en más del 50% del miocardio. Y un grupo importante (12%) presenta hipertrofia localizada en 1 ó 2 segmentos (90,91).

La identificación de aneurismas apicales se ha visto favorecida con esta técnica ya con ecocardiografía eran difíciles de detectar (igual que la hipertrofia apical). Además, están formados principalmente por fibrosis que se extiende hacia el septo y la pared

libre y representa un sustrato favorecedor de arritmias. Esto parece relacionarse con el aumento del riesgo de MS y ACV que presentan estos pacientes y tiene implicación directa con el manejo clínico de los pacientes sobre la necesidad de implantar un DAI o iniciar anticoagulación (92).

La RMC ha demostrado que la elongación de los velos mitrales es una expresión fenotípica primaria de la enfermedad, independiente de la edad, grosor ventricular y la presencia de obstrucción. Y ha permitido identificar anomalías en la morfología de los músculos papilares como una expresión frecuente de la enfermedad (93).

A nivel del ventrículo derecho, que habitualmente es difícil de caracterizar de forma precisa por ecocardiografía, la presencia de alteraciones morfológicas, se aprecia datos de hipertrofia ( $\geq 8\text{mm}$ ) en un tercio de los pacientes, habitualmente en las zonas de unión con el septo interventricular (94).

► *Identificación de pacientes sin fenotipo patológico evidente (Genotipo positivo y Fenotipo negativo)*

Existe un grupo de pacientes que son portadores de una mutación asociada a la enfermedad, se haya identificado ésta o no (porque no tengan acceso a las pruebas genéticas o éstas mutaciones no se hayan identificado todavía) y que no muestran las manifestaciones habituales de la enfermedad (clínicas, electrocardiográficas o ecocardiográficas). La RMC puede ayudar a identificar a este colectivo mediante la identificación de criptas miocárdicas, de elongación de los velos mitrales y de la presencia de RTG y mediante la medición de la convexidad septal (95,96). Estas alteraciones estructurales más sutiles permiten identificar pacientes con una expresividad menor de la enfermedad o en fases más precoces.

► *Diagnóstico diferencial*

La RMC puede desempeñar un papel en el diagnóstico diferencial del paciente con enfermedades infiltrativas y metabólicas (amiloidosis y Fabry) por su patrón de RTG. La mayor resolución espacial permite identificar casos de miocardiopatía no compactada especialmente a nivel apical. Y también puede tener utilidad en la diferenciación de la cardiopatía hipertensiva y del corazón de atleta.

► *Cirugía*

Puede desempeñar un papel importante en la valoración preoperatoria de algunos casos. La identificación de anomalías en el TSVI, los velos mitrales y el aparato subvalvular permite planificar mejor la intervención.

## **CATETERISMO CARDIACO**

Se empleaba en el pasado para establecer el diagnóstico pero fue desplazado por la ecocardiografía. En la actualidad está indicado para descartar la presencia de aterosclerosis coronaria y en algunos casos para planear una intervención quirúrgica (insuficiencia mitral) o la ablación septal alcohólica.

## **ESTUDIO GENÉTICO**

En la mayor parte de los casos la MCH es una enfermedad que se hereda con un patrón autosómico dominante, por lo que se transmite al 50% de la descendencia. Los estudios genéticos consiguen identificar una mutación causal en el 60% de los

casos (9). La identificación de una mutación causal facilita la identificación de portadores asintomáticos entre los familiares, el seguimiento clínico y el consejo reproductivo. Actualmente se recomienda realizar este estudio genético para permitir un cribado familiar en cascada. La relación genotipo-fenotipo no está suficientemente asentada como para tener un gran impacto en el manejo clínico de estos pacientes.

Para poder considerar una mutación como patogénica debe presentar alguno de los criterios establecidos (97): a) la mutación debe cosegregar con el fenotipo de la enfermedad en los miembros de la familia; b) la existencia de evidencia previamente publicada de su patogenicidad; c) la ausencia de la mutación en amplias cohortes de pacientes sanos; d) la estructura y función de la proteína debe estar francamente alterada; y e) la mutación afecta a una secuencia de aminoácidos altamente conservada entre especies.

Sin embargo la aplicación de estos criterios no es siempre sencilla y no se puede establecer claramente la implicación de algunas mutaciones detectadas en la patogenia de la MCH. Así quedan englobadas en lo que se denomina “**variantes de significado incierto**” y representan un problema creciente en el manejo de estos pacientes. Es probable que a medida que aparezca nueva información relevante, estas variantes puedan ser reasignadas como patogénicas o liberadas de culpa.

## 1.6.2 Manejo de los síntomas

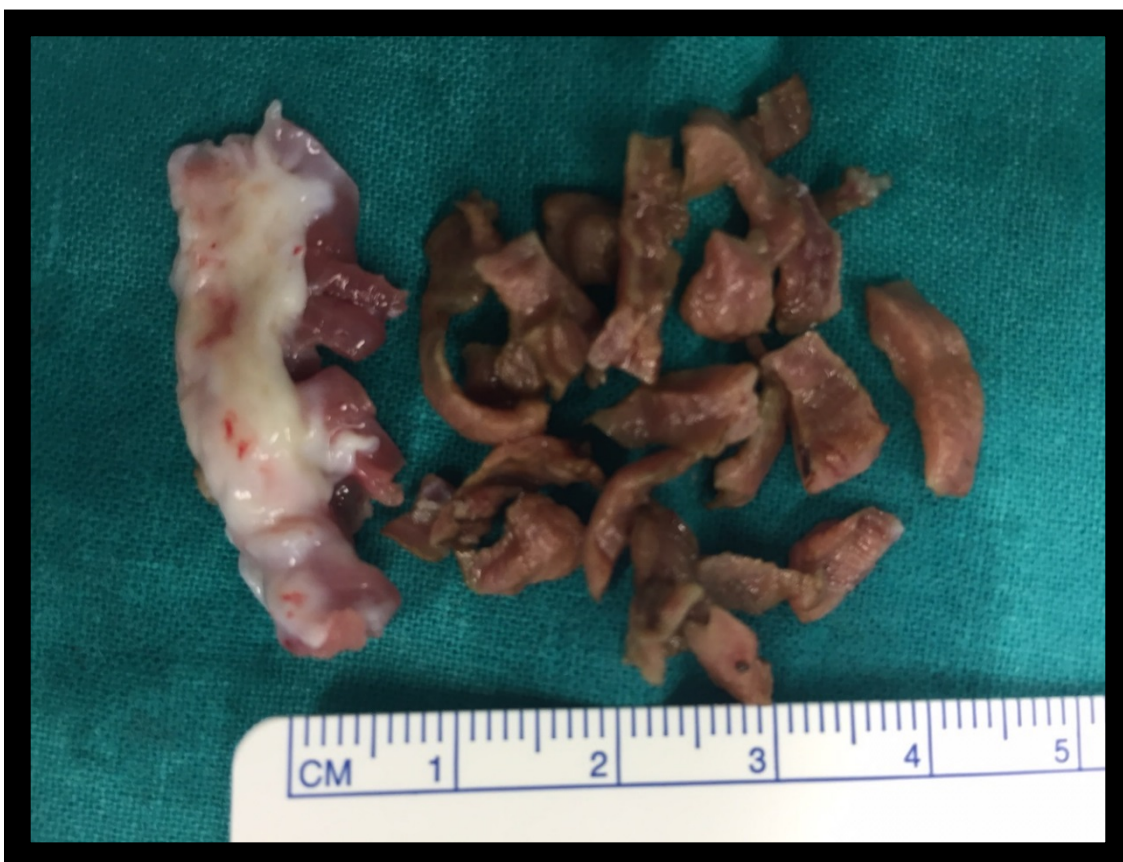
Éste incluye cambios en el estilo de vida, fármacos, técnicas de reducción septal y manejo de la insuficiencia cardiaca.

Los pacientes deben ser instruidos sobre su enfermedad para mitigar en lo posible los síntomas y reducir el riesgo de MS. Deben evitar la depleción de volumen, especialmente en situaciones de intenso calor o enfermedades concurrentes (gastroenteritis por ejemplo). El ejercicio físico puede desencadenar un síncope o una MS. Los pacientes deben evitar los deportes competitivos, excepto los de baja intensidad. Además deben conocer el efecto de las comidas y la ingesta de alcohol sobre sus síntomas.

En cuanto a las recomendaciones del **tratamiento farmacológico**, desafortunadamente existe poca evidencia científica basada en ensayos clínicos (98). Los betabloqueantes se consideran el tratamiento de elección en pacientes sintomáticos, tanto en los pacientes con obstrucción como en los que no. Se acepta que los betabloqueantes no vasodilatadores pueden tener un perfil más beneficioso. Su efecto en el alivio de los síntomas se media a través de una reducción de la frecuencia cardíaca y del inotropismo. Por los mismos efectos podemos emplear calcioantagonistas no dihidropiridínicos (verapamilo y diltiazem) cuando los betabloqueantes están contraindicados o no son tolerados. La disopiramida ha demostrado reducir los gradientes en TSVI y mejorar los síntomas en pacientes con obstrucción. Se emplea en combinación con un betabloqueante o verapamilo. Sin embargo sus frecuentes y limitantes efectos anticolinérgicos (sequedad de mucosas, estreñimiento, retención urinaria) y la prolongación del intervalo QTc limitan su uso. Debe evitarse su uso en caso de prostatismo o glaucoma. Los diuréticos pueden emplearse para aliviar la disnea empleándolos con precaución para evitar la hipovolemia.

Tras agotar las opciones farmacológicas para el control de los síntomas, aquellos pacientes con gradientes  $\geq 50$ mmhg pueden beneficiarse de la reducción septal realizada mediante miectomía o mediante ablación con alcohol.

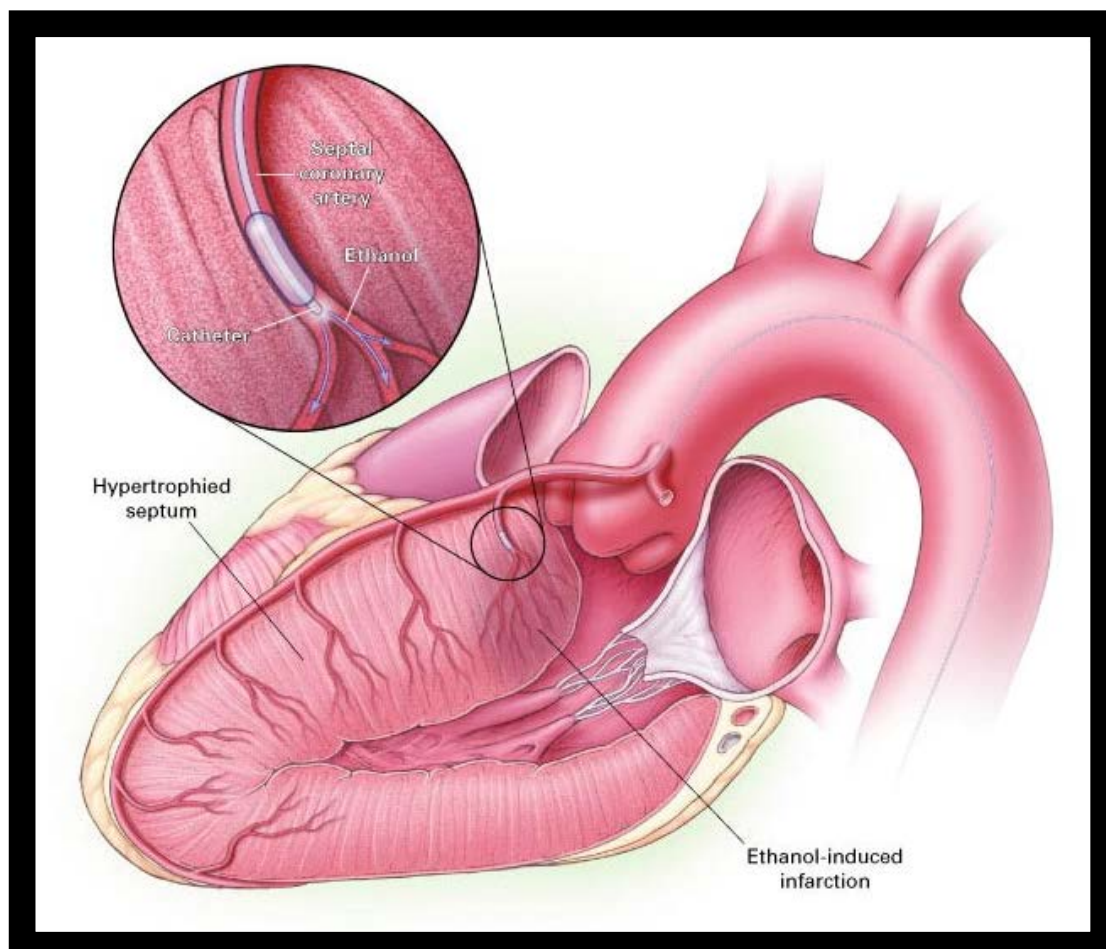
La **miectomía** consiste en una resección transaórtica de parte del septo interventricular (Figura 8). Reduce de forma muy marcada el gradiente en TSVI, incluso hasta hacerlo desaparecer, mejora la insuficiencia mitral generada por el SAM, mejora la capacidad de ejercicio y se acompaña de una mejora dramática de los síntomas en la mayoría de casos. La supervivencia a largo plazo tras la intervención es comparable con la de la población general. Se requiere un intervención concomitante en la válvula mitral en un 10-20% de los casos (99). Entre las principales complicaciones encontramos la comunicación interventricular, el bloqueo AV y la insuficiencia aórtica. Si bien, estas complicaciones son poco frecuentes en centros experimentados y la mortalidad perioperatoria se encuentra en torno al 1% para la miectomía aislada y del 3-4% cuando se asocia cirugía sobre la válvula mitral. Según los datos de grandes cohortes, este tipo de intervención puede llegar a ser necesario entre un 20 y un 30% de los pacientes (34,100).



**Figura 8:** Miectomía. Fragmentos extraídos durante la miectomía de un paciente con MCH obstructiva con síntomas no controlados con medicación oral. Cortesía del Dr. A. Montero.

La **ablación alcohólica** consiste en instilar alcohol absoluto (1-2 ml) en una rama septal anatómicamente apropiada de la arteria descendente anterior que irrigue el septo basal en el punto de contacto con el SAM. Esto provocará un infarto que disminuirá la contractilidad y reducirá el grosor en la zona. Habitualmente consigue una reducción del gradiente y una mejora en la capacidad de ejercicio y síntomas similar a la miectomía. Entre las complicaciones encontramos el bloqueo AV en un 7-20% de los casos con una mortalidad periprocedimiento similar a la miectomía aislada (101).

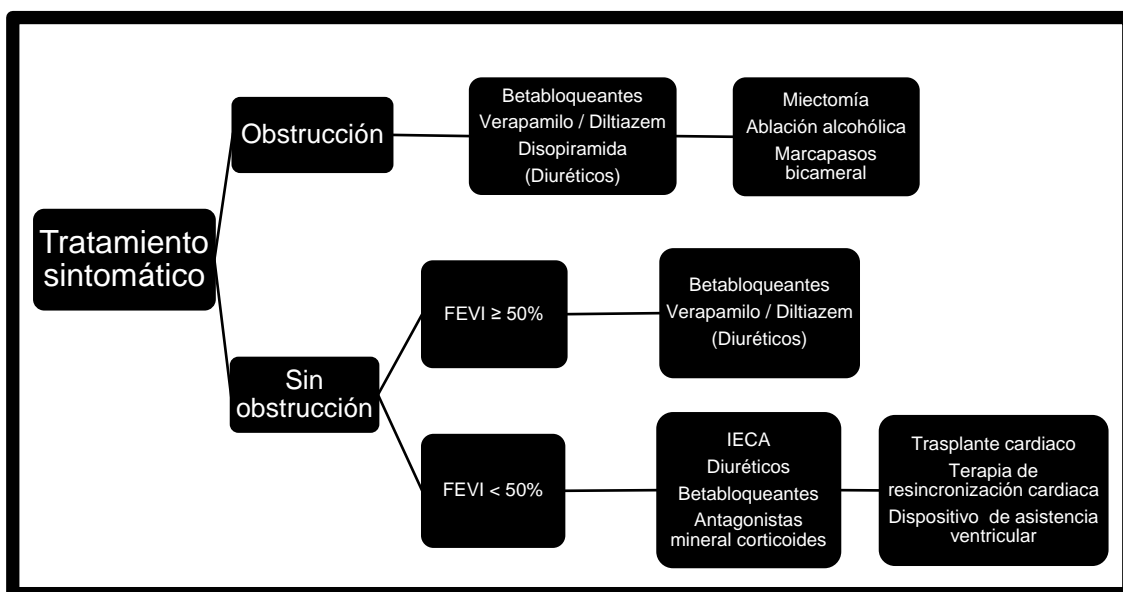
La **estimulación bicameral** ha mostrado en pequeños estudios aleatorizados y en estudios observacionales una reducción en los gradientes del TSVI y mejoras en los síntomas y capacidad de ejercicio (102). Sin embargo, otros estudios no han demostrado este beneficio. Aun así, la estimulación crónica desde el ápex del VI puede



**Figura 9:** Ablación septal alcohólica. Adaptado de (101).

ser una opción para aquellos pacientes con síntomas refractarios al tratamiento farmacológico que no se pueden beneficiar de medidas invasivas de reducción septal.

Para el tratamiento de los síntomas de insuficiencia cardiaca sin obstrucción hay que tener en cuenta la FE. Se puede emplear betabloqueantes, calciantagonistas no dihidropiridínicos y diuréticos cuando la FS está conservada ( $FE \geq 50\%$ ). En el caso de que esté disminuida ( $FE \leq 50\%$ ) se emplearán betabloqueantes, IECAs, antagonistas de los receptores de mineralcorticoides y diuréticos. En casos refractarios podrá optarse por la resincronización cardiaca, el empleo de dispositivos de asistencia ventricular y trasplante cardiaco, cuando se cumplan las condiciones adecuadas.



**Figura 10:** Esquema del tratamiento sintomático de la MCH.

### 1.6.3 Cribado familiar

La MCH es una cardiopatía hereditaria en un alto porcentaje de casos. Esto nos obliga a buscar a personas afectadas en el entorno familiar del paciente. Habitualmente se incluye en el cribado a los familiares de primer orden (padres, hermanos e hijos) y se



extiende el cribado por la familia a medida que se identifican nuevos casos. En los niños se recomienda realizar el cribado a partir de los 10 años según recomendaciones europeas y 12 años según recomendaciones americanas. Este cribado incluye anamnesis, exploración clínica, ECG y ecocardiografía. Como la enfermedad puede manifestarse hasta en edades avanzadas, los familiares son seguidos de forma periódica. (103)

En nuestro medio, mediante este tipo de estudio en 282 pacientes con MCH se ha podido identificar enfermedad familiar en un 43% de los casos, con necesidad de intervención médica en un 23% de los familiares afectados (104). En los últimos años, el empleo de técnicas genéticas que han permitido identificar mutaciones causales, ha supuesto un gran avance en el seguimiento de las familias afectadas, al poder identificar pacientes portadores (aunque sin datos de enfermedad) y a pacientes no portadores que no precisen más seguimientos. Y es muy probable que el porcentaje de enfermedad familiar en estos estudios de cribado aumente.

#### **1.6.4 Estratificación del riesgo de muerte súbita**

Sin duda la MS es una de las complicaciones más dramáticas de la enfermedad. Habitualmente es causada por arritmias ventriculares que son tratables mediante el implante de un desfibrilador. Debido a que es un tratamiento no exento de complicaciones de los componentes del dispositivo y descargas inapropiadas, además de su alto impacto económico, se ha realizado un gran esfuerzo en las últimas décadas para identificar a aquellos pacientes que más se pueden beneficiar de él.

En prevención secundaria (MS documentada reanimada o TV sostenida sintomática) los pacientes tienen un alto riesgo de arritmias cardíacas letales y se indica el implante de DAI. Se ha identificado varias variables asociadas con MS en estos pacientes que se emplean en prevención primaria (Tabla 1.5). Las variables convencionales se emplean de forma binaria y ante la presencia de 1 ó más de ellas se indica un DAI (4). Recientemente se ha desarrollado un nuevo método que nos estima la probabilidad de MS a 5 años (*HCM Risk-SCD calculator*) que emplea variables binarias y continuas (73). Un riesgo  $\geq 6\%$  se considera indicación de DAI, entre 4-6% puede considerarse y por debajo del 4% sólo está indicado cuando asocien otras características pronósticas desfavorables.

**TABLA 1.5. VARIABLES PREDICTORAS DE MS EN MCH**

| Variables convencionales                    | Variables HCM Risk-SCD cohort    |
|---|----------------------------------|
| Historia familiar de MS                     | Historia familiar de MS          |
| Síncope inexplicado                         | Síncope inexplicado              |
| TV no sostenida                             | TV no sostenida                  |
| Grosor ventricular $\geq 30$ mm             | Grosor ventricular (continua)    |
| Respuesta anómala de la TA con el ejercicio | Edad en la evaluación (continua) |
|   | Diámetro de la AI (continua)     |
|   | Gradiente en TSVI (continua)     |

### 1.6.5 Fibrilación auricular

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia con trascendencia clínica más común. Su prevalencia aumenta con la edad y su complicación más temida es el ictus isquémico cardioembólico cuyo riesgo aumenta de 5 a 6 veces (5% de eventos primarios y 12% de eventos recurrentes, al año) (105,106).

Muchos estudios de cohortes pequeñas han mostrado a la FA como una complicación frecuente de la MCH y con importante efecto en eventos clínicos adversos. Los pacientes con MCH presentan una incidencia de FA, entre el 10-40% (107–109), siendo este porcentaje mayor a medida que avanza la edad, como en población general. Pocos estudios se han centrado en identificar factores predictores del desarrollo de FA en estos pacientes (110–112). Su presencia confiere un mal pronóstico a estos pacientes (111,113,114) con un aumento del riesgo de insuficiencia cardiaca, ictus, embolismo periférico y arritmias deletéreas (115,116).

Recientemente se ha publicado un metaanálisis abordando este tema (117). En él se han incluido 33 estudios publicados hasta el 1 de septiembre de 2012 y aporta datos sobre 7381 pacientes. Pese a las limitaciones que puedan suponer las diferencias en la distribución de edades y sexos de los estudios y que la mayoría de las cohortes son de pequeño tamaño proporciona datos interesantes. La prevalencia de FA fue del 22,45% con una prevalencia de eventos tromboembólicos en los pacientes con FA de 27,09%. La incidencia de FA fue del 3,08% por 100 pacientes y año y la incidencia de tromboembolismo del 3,75% por 100 pacientes y año. Entre los claros predictores de caída en FA y aparición de un evento tromboembólico se identificó al diámetro de la AI, el volumen de la AI y la edad. Otros posibles predictores de caída en FA identificados fueron la obstrucción del TSVI, la duración de la onda P >140 ms en el ECG promediado,

las alteraciones de la repolarización en el ECG convencional, las extrasístoles ventriculares, las taquicardias supraventriculares paroxísticas, el RTG en la RMC y el flujo de reserva coronaria anormal. Entre otros posibles predictores de eventos tromboembólicos se encontró los síntomas severos de insuficiencia cardiaca, los ingresos por insuficiencia cardiaca y el sexo masculino.

También se ha publicado en 2014 los datos de la mayor serie proveniente de un único centro (100). Esta serie incluye 3673 pacientes entre enero de 1975 y septiembre de 2012 con edad media de  $55\pm 16$  años y un 45% de mujeres. La prevalencia de la FA fue del 18%. Los pacientes con FA eran más mayores, tenían más enfermedad coronaria y más antecedentes de ictus previo. La forma no obstructiva de la MCH se asociaba más a la FA pese a ajustar por otros factores asociados al desarrollo de FA como la HTA, enfermedad coronaria, grosor ventricular y medidas relacionadas con las presiones de llenado. Los pacientes con FEVI deprimida ( $<50\%$ ) también tenían más FA. Durante una mediana de seguimiento de 4 años falleció el 29% de los pacientes. La mortalidad anual fue del 4,7% global, 6,9% en pacientes con FA y del 4,4% en los pacientes sin FA, mayor de la esperada comparada con la población general en cualquiera de los grupos.

La mortalidad relacionada con la FA en estos pacientes parece estar relacionada con un aumento de muertes por insuficiencia cardiaca y muertes por ictus. Este efecto parece ser independiente de los factores de riesgo tradicionales de MS (58,111).

Los datos respecto al uso de warfarina en estos pacientes son limitados. Disponemos de datos observacionales que sugieren una menor incidencia de ictus en pacientes tratados con warfarina frente a aspirina o placebo (111,114,118). Así que se recomienda anticoagular a todos los pacientes con antagonistas de la vitamina K al

detectar la arritmia por la alta incidencia de eventos tromboembólicos. En caso de no conseguir una adecuada anticoagulación se puede optar por los nuevos anticoagulantes.

La escala CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc no se recomienda en estos pacientes ya que no ha sido validada en este grupo de pacientes (5). Esta escala parece identificar bien a los pacientes con un bajo riesgo embólico que no se benefician de tratamiento anticoagulante. Es posible que los pacientes con MCH por la propia miocardiopatía tengan un mayor riesgo embólico y esta escala sea de poca utilidad. De hecho parece no correlacionarse bien con los eventos cardioembólicos de pacientes con MCH y en ritmo sinusal (principalmente) en un reciente estudio que plantea una nueva escala predictiva (72) donde los principales factores predictivos son la presencia de FA y los eventos tromboembólicos previos. Resulta curioso como en este estudio ni la HTA ni la DM resultaron predictores de eventos tromboembólico, aunque hay que tener en cuenta que su prevalencia en la cohorte fue baja. Por otro lado, la escala CHADS<sub>2</sub> sí ha mostrado ser predictiva de eventos tromboembólicos en ritmo sinusal en población general hipertensa mayor de 65 años (119).

Todos estos datos vienen a confirmar la importancia de buscar y tratar la FA en este grupo de pacientes, especialmente en aquellos con una AI dilatada.

## **1.7 ETIOPATOGENIA**

La etiopatogenia no ha sido aclarada. El cómo estas mutaciones dan lugar a la hipertrofia miocárdica continua siendo un tema de estudio y debate. Se han propuesto varias hipótesis, no necesariamente excluyentes, para explicar este proceso.

La **hipótesis del péptido veneno** parte de la base de que muchas mutaciones identificadas son de sentido erróneo o contrasentido (*missense*) y afectan a la un único nucleótido y de la suposición de que la proteína mutante resultante probablemente se incorpore al sarcómero donde ejercerá efecto “venenoso” alterando su función (120). La **hipótesis de la haploinsuficiencia** tiene en cuenta la existencia de mutaciones que impedirán la incorporación de la proteína mutada al sarcómero (por la formación de proteínas truncadas sin función, con rápido deterioro citoplasmático o incluso la ausencia de traducción del ARN mensajero) y cuya deficiencia no puede ser compensada (121).

El mecanismo molecular que lleva a estas mutaciones a desarrollar el fenotipo no se ha aclarado todavía. Inicialmente se propuso que estas mutaciones daban lugar a una disminución de la función contráctil y esto daba lugar a una hipertrofia compensadora (122). Sin embargo, esta hipótesis presenta algunas inconsistencias para algunos autores. Por un lado, los estudios iniciales mostraron una reducción en la motilidad de las proteínas mutadas, pero estudios posteriores más avanzados mostraron justamente lo contrario con otras mutaciones. Por otro lado, la hipertrofia que suelen presentar los pacientes con MCH es asimétrica, frente a la forma concéntrica que aparece en la sobrecarga ventricular. Y finalmente, la mayoría de los pacientes desarrollan la hipertrofia después de la pubertad y no parece progresar mucho después. Estas observaciones no parecen poder explicarse con esta hipótesis de hipertrofia compensatoria.

Actualmente existe una evidencia creciente que indica que las proteínas mutadas de los miofilamentos en pacientes con MCH presentan un aumento en la afinidad y sensibilidad al calcio y de este modo de la actividad ATPasa dependiente de actina. Estos cambios en la sensibilidad del calcio y la alteración de su homeostasis

probablemente contribuyan a varios aspectos de la enfermedad mediante los efectos de las alteraciones del manejo del calcio intracelular, de la recaptación por el retículo sarcoplasmático y de la fosforilación de algunas proteínas (123). En este sentido el aumento de la sensibilidad al calcio parece aumentar la probabilidad de arritmias. En ratones transgénicos portadores de una mutación en la troponina T la mayor sensibilización al calcio se asocia con cambios en la forma del potencial de acción ventricular, con periodos refractarios efectivos más cortos, mayor variabilidad de la duración del potencial de acción latido a latido y aumento de la dispersión de la velocidad de conducción ventricular con frecuencias elevadas. Estos ratones presentan una gran cantidad de arritmias ventriculares, que se asocian con el grado de sensibilidad al calcio, y que desaparecen completamente al revertir la sensibilización al calcio con blebastatina (124).

En 2003 Ashrafian et al. (125) propusieron la **hipótesis de la depleción de energía**. Ésta establece que lo que subyace es un aumento de la demanda de energía debido a una utilización ineficiente del ATP por el sarcómero. Como consecuencia del aumento de la sensibilidad al calcio se produce un aumento del recambio de los puentes cruzados de las miofibrillas y un aumento de la actividad ATPasa activada por actina. De esta forma la mutación genera un alto costo energético para producir un grado de tensión determinado. Además, en modelos transgénico de MCH que expresan distintas proteínas sarcoméricas mutadas, esta alteración del gasto energético precede al desarrollo de la patología cardíaca (123). En humanos con MCH se ha objetivado, independientemente de la presencia de hipertrofia ventricular, una reducción del 30% de la relación fosfocreatina/ATP, que es un marcador establecido del estado energético celular (126). Este mayor conocimiento de la biología molecular ha llevado a diseñar un ensayo clínico con pacientes con MCH para modificar el estado metabólico. En este ensayo se ha administrado perhexilina durante 4 a 6 meses, que mediante la inhibición

de la carnitina pantoil transferasa desvía la utilización de ácidos grasos libres hacia carbohidratos por el miocardio. Estos pacientes sintomáticos corrigieron su estado energético en reposo, normalizaron la disfunción diastólica con el ejercicio y mejoraron su capacidad de ejercicio (127).

## **1.8 RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL FENOTIPO**

En la actualidad sabemos que existe una gran variación en la penetrancia (porcentaje de portadores que expresan el fenotipo) y la expresividad (grado de expresión) de la enfermedad.

En general establecer relaciones genotipo-fenotipo en este grupo de pacientes está resultando ser un trabajo muy complejo. Hay que tener en cuenta que el número de mutaciones es muy amplio y en general quedan circunscritas a unos pocos componentes de la familia afectada (ya que la mayoría de las mutaciones son privadas) lo que dificulta realizar comparaciones.

Habitualmente, los pacientes en los que se identifica una mutación sarcomérica frente a los que no, presentan antes la enfermedad y tienen una mayor prevalencia de MCH familiar y de MS. Además suelen presentar una mayor hipertrofia, mayor grado de disfunción microvascular y mayor fibrosis miocárdica. Por otro lado, en torno a un 5% de los pacientes con MCH presentan más de una mutación, y suelen manifestar la enfermedad antes y ésta expresarse de forma más severa (5).

Inicialmente, algunos genes o algunas mutaciones en concreto fueron descritas como asociadas a alta incidencia de MS (mutaciones en la TNNT2 y MYH7



p.Arg403Gln), hipertrofia ligera (TNNT2), o expresión tardía de la enfermedad (MYBPC3). Estudios posteriores, basados principalmente en estudio de pacientes individuales más que en familias, mostraron excepciones y una expresión más heterogénea para un gen o mutación determinados. Sin embargo, los estudios continúan y datos recientes sugieren un mayor riesgo de MS entre las familias portadores de mutaciones en TNNT2 frente a las familias portadoras de mutaciones en MYBPC3 (0,93 vs. 0,6% al año) (38).

Sin embargo, todavía no existe actualmente suficiente evidencia para establecer el pronóstico de un paciente basándonos en la mutación que posea, de modo que su utilidad clínica en este sentido está bastante limitada (5,128,129). Esta situación actual, que nos impide dibujar un claro fenotipo que esperar ante un genotipo determinado, cambiará en un futuro. Probablemente los registros internacionales así como los largos seguimientos de cohortes con genotipo determinado nos permitan avanzar en este campo tan necesario en la clínica habitual.

Por otro lado, toda esta variación en la penetrancia y expresividad de la MCH no parece explicarse sólo por la gran diversidad de mutaciones genéticas identificadas. De hecho, es frecuente encontrar importantes variaciones entre individuos de familias diferentes con la misma mutación, pero incluso dentro de individuos de una misma familia. Lo que indica que otros factores, además de las mutaciones en las proteínas sarcoméricas, ejercen alguna influencia sobre la evolución de la enfermedad y los eventos clínicos. Estos probables factores genéticos, epigenéticos y ambientales no han sido bien caracterizados.

Dentro de los factores ambientales encontramos los hábitos de consumo de alcohol o en ingestas copiosas, que intensifican la sintomatología de los pacientes con

obstrucción. Así un factor ambiental, socio-cultural, influye en las manifestaciones de la enfermedad. Un estudio ecocardiográfico ha mostrado los efectos de la ingesta puntual de alcohol durante la hora siguiente. Se produjo un descenso de la TA, un aumento del SAM y un aumento del gradiente en TSVI obtenido por Doppler (64% respecto al basal) (66). En casos de un consumo excesivo se ha llegado a constatar la aparición de una disquinesia apical transitoria en pacientes con gradiente medioventricular o con hipertrofia apical (130,131). En un tercio de los pacientes, la ingesta pone de manifiesto o intensifica los síntomas de disnea, angina de esfuerzo y presíncopes. Estos pacientes suelen tener un gradiente basal mayor, peor clase funcional (NYHA III-IV), peor calidad de vida percibida y más presíncopes (64).

Otro factor ambiental, con un efecto trascendental, es el ejercicio físico intenso. Su efecto es tal que la MCH es la principal causa de MS en deportistas jóvenes y ésta suele ocurrir (80%) durante el ejercicio o poco después (132). Las actuales guías de práctica clínica desaconsejan la realización de deportes a nivel competitivo y la actividad física intensa (5).

La presencia de comorbilidades también afecta a la evolución de la MCH. La HTA es una comorbilidad que se asocia con la MCH con una prevalencia importante (20-40%) que aumenta con la edad y se asocia con una peor clase funcional en los pacientes jóvenes (133). A nivel ecocardiográfico se ha observado un mayor grosor en la pared posterior del VI respecto a pacientes con MCH sin HTA (134). Además la presencia de HTA en estos pacientes se asocia con DM, enfermedad arterial coronaria y muerte no cardíaca (135). La obesidad también ejerce un efecto modificador en este grupo de pacientes. Así la obesidad se asocia con mayor hipertrofia de la pared posterior del VI y mayor masa ventricular indexada. Estos pacientes presentan una mayor inducibilidad de gradiente subaórtico con distintas maniobras y durante el ejercicio.

Suelen referir una peor clase funcional y además, esto se objetiva en la ergometría (136).

Dentro de los factores genéticos que pueden estar involucrados en la marcada heterogeneidad fenotípica que caracteriza a la MCH, un grupo de genes no-sarcoméricos se ha postulado como modificadores en la expresión de la MCH (137,138) y su efecto puede tener además implicaciones en la evolución clínica y pronóstico de estos pacientes.

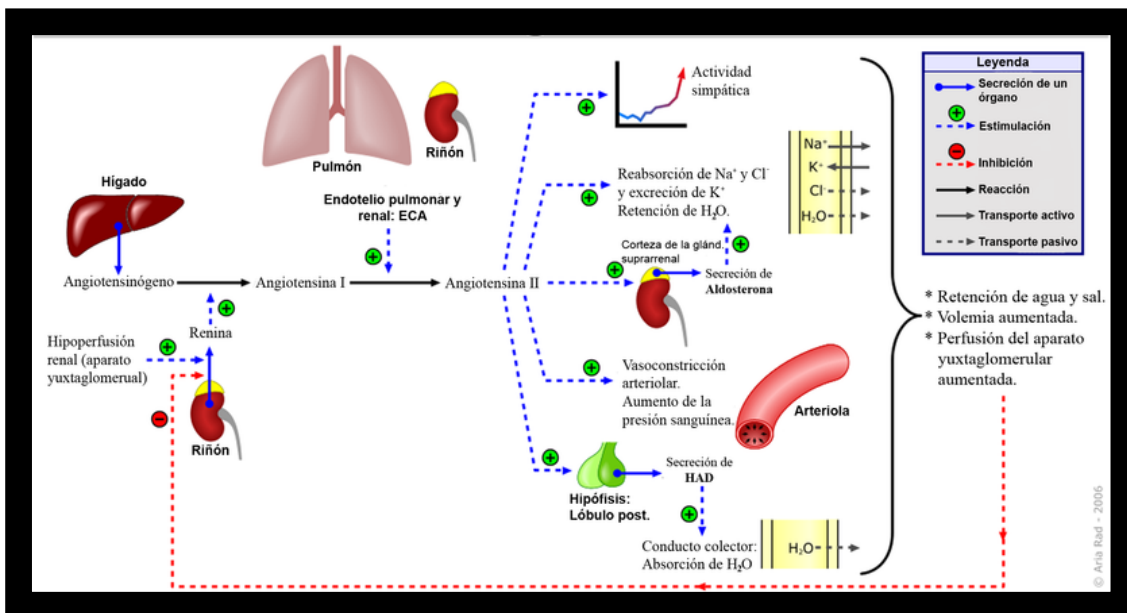
## **1.9 GENES MODULADORES**

Existe un creciente interés en identificar factores genéticos que tenga un efecto relevante en la expresión de la MCH. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un candidato plausible en la modificación de la expresión de la hipertrofia ventricular a través de su papel regulador en la función cardiaca, la tensión arterial y homeostasis hidroelectrolítica (139). Por otra parte, existen otros posibles candidatos en otros genes no-sarcoméricos, más allá del sistema renina-angiotensina-aldosterona, en los que merece la pena explorar su influencia en el fenotipo de la MCH (Tabla 1.6).

TABLA 1.6 LISTADO DE GENES MODULADORES

| PROTEÍNA  | GEN                        | OMIM   | Polimorfismo                     | dbSNP      |
|---|----------------------------|--------|----------------------------------|------------|
| <b>SRAA</b>   |                            |        |                                  |            |
| Angiotensinógeno  | AGT                        | 106150 | Met235Thr<br>Met268Thr<br>C4072T | rs699      |
| ECA   | ACE                        | 106180 | D/I                              | rs1799752  |
| Receptor tipo I de la angiotensina II   | AGTR1                      | 106165 | 1166A>C                          | rs5186     |
| Receptor tipo 2 de la angiotensina II   | AGTR2                      | 300034 | 3123A>C                          | rs11091046 |
|   |                            |        | +1675G>A                         | rs1403543  |
| Aldosterona sintetasa   | CYP11B2                    | 124080 | -344C>T                          | rs1799998  |
| Quimasa cardiaca  | CMA1                       | 118938 | -1903G>A                         | rs1800875  |
| <b>Otros genes no-sarcoméricos</b>  |                            |        |                                  |            |
| Cadena $\alpha$ 1 del colágeno tipo I   | COL1A1                     | 120150 | 2046G>T                          | rs1800012  |
| Resistina   | RETN                       | 605565 | -420C>G                          | rs1862513  |
| Receptor adrenérgico $\beta$ 1  | ADRB1                      | 109630 | Arg389Gly<br>1165G>C             | rs1801253  |
|   |                            |        | Ser49Gly                         | rs1801252  |
| Cofactor 1- $\alpha$ del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas | PPARGC1A<br>PGC-1 $\alpha$ | 604517 | Gly482Ser<br>1444G>A             | rs8192678  |
|   |                            |        | Thr394=<br>1182A>G               | rs2970847  |
| Sintetasa de óxido nítrico endotelial   | NOS3<br>eNOS               | 163729 | Asp298Glu<br>894T>G              | rs1799983  |
| Calmodulina   | CALM3                      | 114183 | -34T>A                           | rs6612     |

### 1.9.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona



**Figura 11:** Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona. (A. Rad, Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license).

#### 1.9.1.1 AGT

El **angiotensinógeno** es una  $\alpha$ -2-globulina producida y liberada en la circulación sanguínea principalmente por el hígado. En humanos está formado por 452 aminoácidos, aunque los 12 primeros son los principales implicados en su actividad. El gen del angiotensinógeno, AGT, se encuentra en el cromosoma 1q42.2. Se ha identificado varias variantes y una de las más estudiadas produce es una mutación sin sentido que origina un cambio de una metionina por una treonina (rs699, Met235Thr, C4072T). Los individuos portadores de la variante con treonina presentan unos valores de angiotensinógeno más elevados (140). En pacientes con MCH existen datos controvertidos, con la asociación con una mayor hipertrofia en poblaciones asiáticas (141–143), donde es más frecuente esta variante, pero no en caucásicas (144,145).

### 1.9.1.2 ACE

La **renina**, sintetizada y almacenada en las células yuxtaglomerulares, es una enzima que actúa sobre el angiotensinógeno para liberar la angiotensina I. Este polipéptido de 10 aminoácidos es rápidamente transformado, mediante la escisión de dos aminoácidos, en angiotensina II por la **enzima convertidora de angiotensina** (ECA). La ECA es una enzima unida a la membrana localizada en el endotelio vascular con una amplia distribución en el organismo. Su gen, ACE, se encuentra en el cromosoma 17q23.3 y se ha identificado más de 100 polimorfismos de su locus (146).

Sin embargo, el polimorfismo más frecuente es la presencia (I, inserción) o la ausencia (D, delección) de una secuencia repetitiva Alu de 287 pares de bases. La actividad de ECA es más alta en genotipos DD e intermedia en genotipos ID (147). En un estudio transversal en el que se seleccionaba a los participantes al azar, se ha descrito una mayor prevalencia de genotipos DD en aquellos con hipertrofia ventricular frente a los que no (148). En pacientes con MCH se ha objetivado una mayor severidad en la expresión de la hipertrofia ventricular, con un grosor máximo ventricular que aumenta con el número de alelos D que presente el paciente (con unos 5 mm de diferencia entre genotipos DD e II) y además la HVI > 30 mm sólo se detectó en pacientes portadores de mutación MYBPC3 y genotipo para ECA DD (149,150).

### 1.9.1.3 AGTR1

La angiotensina II produce la mayoría de sus acciones biológicas conocidas a través su unión con el **receptor tipo 1 de angiotensina II**. Esta unión provocará vasoconstricción, aumento de aterogénesis, inflamación, crecimiento, proliferación o coagulación, dependiendo de las condiciones locales (151). Su gen, AGTR1, se

encuentra en el cromosoma 3q24 y está formado por al menos 5 exones, de los cuales sólo el último da lugar a una secuencia traducida (152).

Se han identificado más de 20 polimorfismos del gen AGTR1, pero ninguno produce alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Su polimorfismo más estudiado, 1166A>C (rs5186) es un cambio de nucleótido en la región 3' no traducida de una zona regulatoria cis que interactúa con el microARN miR-155 para disminuir su síntesis. Los portadores del alelo 1166C evitan el efecto modulador del miR-155 lo que da lugar a una mayor traducción que dará lugar a una mayor densidad de receptores tipo 1 de angiotensina (153). Este polimorfismo se ha asociado con hipertensión arterial esencial, infarto de miocardio y progresión de enfermedad renal en pacientes diabéticos (154–156). En pacientes con MCH se asocia con una mayor expresión de hipertrofia ventricular en pacientes con MCH, con mayor masa del VI (13%), mayor grosor máximo (6,5%) y mayor extensión (valorado con la escala de Wigle) (138,150,157).

#### **1.9.1.4 AGTR2**

Existe otro receptor para la angiotensina, **receptor tipo 2 de angiotensina II**. Su gen, AGTR2, se encuentra en el cromosoma Xq22-Xq23. Está formado por 3 exones, de los cuales también, sólo el último da lugar a la proteína. En modelos animales los efectos del receptor tipo 2 parecen oponerse a los efectos de vasoconstricción y proliferación ejercidos por el receptor tipo 1. Los efectos de su estimulación en humanos no están bien definidos. En microarterias coronarias humanas, obtenidas de pacientes vivos que murieron por causas no cardíacas se ha objetivado un efecto vasodilatador

mediado por este receptor (158). Se sabe que en corazones humanos, en condiciones patológicas su expresión está regulada al alza (159,160).

Uno de los polimorfismos más estudiados de este gen afecta a una región 3' no traducida del exón 3 (3123A>C, rs11091046). Este polimorfismo ha mostrado en pacientes con MCH una disminución de la hipertrofia ventricular proporcional al número de alelos 3123C en mujeres. En hombres parece existir una interacción con el polimorfismo AGTR1 1166A>C. Otro de los polimorfismos de AGTR2, +1675G>A (rs1403543), se ha asociado con índices de hipertrofia ventricular en pacientes hipertensos. En pacientes con MCH se ha apreciado una menor hipertrofia ventricular de 0,5 mm por cada alelo +1675A que posea el paciente (161). Estos datos sugieren que el efecto de la angiotensina II sobre la masa miocárdica parece ser el resultado del equilibrio entre la estimulación de ambos receptores con un efecto de género (162).

#### **1.9.1.5 CYP11B2**

La secreción de aldosterona está regulada principalmente por el sistema renina-angiotensina. Se sintetiza a partir de la deoxicorticosterona por una enzima mitocondrial del citocromo P450, la **aldosterona sintetasa** (163). La aldosterona produce directamente hipertrofia de las células miocárdicas a través de la activación de los receptores de mineralcorticoides (164). Su gen, CYP11B2, se encuentra en el cromosoma 8q24.3 (165).

Se ha descrito varios polimorfismos en la región reguladora de la transcripción y en el segundo intrón de CYP11B2 (166). Dos de ellos se han asociado con el tamaño y la masa ventricular en un grupo de personas con baja prevalencia de enfermedad



cardiovascular: -344C>T (rs1799998) y la conversión en el intrón 2 con el gen CYP11B1 (167). La posición -344 del gen CYP11B2 está inmediatamente adyacente a la zona de unión del factor de transcripción SF-1 que se piensa que posee un papel esencial en la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis esteroidea en la corteza adrenal (168). El papel en la expresión de MCH de algunos de estos polimorfismos se ha observado en varios estudios (90,138,150,169), con incrementos en el septo ventricular de hasta un 24,4%, pero no en otros (145,170). El aumento de actividad de esta enzima se asocia con un aumento en la producción de aldosterona, que promueve la fibrosis miocárdica (171). La fibrosis miocárdica progresiva y la hipertrofia de las células miocárdicas podría llevar a un remodelado progresivo que explicara el mecanismo que provoque la hipertrofia septal y aumento de masa ventricular progresivos que se observa en estos pacientes.

#### **1.9.1.6 CMA**

La producción de angiotensina II en el corazón se debe, además de a la acción de la ECA, a la acción de una proteasa denominada quimasa cardiaca. Se ha objetivado el efecto de esta enzima en aurículas y en ventrículos, tanto en pacientes como en individuos sin cardiopatía. Además, se ha podido constatar que es capaz de mediar la formación de angiotensina II sin el paso previo de angiotensina I (172). Su gen, CMA, se encuentra en el cromosoma 14q11. Se ha identificado un polimorfismo en una región no transcrita (-1903 G>A) que se ha asociado en pacientes con MCH con mayor expresión de la hipertrofia en algunos estudios, con una mayor masa ventricular medida por ecocardiografía y una mayor hipertrofia celular en muestras de miectomía (138,173) pero no en otros estudios basados en datos ecocardiográficos (174).

## 1.9.2 Otros genes no-sarcoméricos

### 1.9.2.1 COL1A1

El remodelado cardiaco juega un papel importante en la fisiopatología y evolución de la MCH (175). La matriz extracelular es una estructura dinámica que participa en el control de muchas funciones celulares y juega un papel central en la adaptación miocárdica al estrés mediante la facilitación del remodelado cardiaco (176). El incremento de la matriz extracelular produce fibrosis intersticial en virtud del aumento de las cantidades de colágeno tipo I y III (177).

El colágeno tipo I es el más abundante del cuerpo humano, se organiza en fibrillas constituidas por una triple hélice formada por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$ . Se ha descrito que el reemplazo del colágeno está aumentado en la MCH, aumentando la síntesis del colágeno tipo I frente a su degradación (178,179). Se ha observado un aumento de entre 3 y 10 veces de la transcripción del gen de colágeno tipo I alfa en fibroblastos activados (180,181). Su gen, COL1A1, se encuentra en el cromosoma 17q21.33.

En 1996 se identificó por primera vez un polimorfismo en la región reguladora de COL1A1 (2046G>T) en la zona de unión con el factor de transcripción Sp1 que estaba significativamente relacionado con la síntesis de colágeno. Se observó cómo los portadores del alelo 2046T tenían una densidad mineral ósea significativamente menor y mayor frecuencia de fracturas osteoporóticas (182). Los mismos autores, en un interesante estudio posterior, exploraron los mecanismos moleculares que subyacían a tales observaciones. Encontraron que el alelo 2046T tenía una mayor afinidad por el factor de transcripción Sp1. Esto se seguía de una mayor transcripción del gen y de una

mayor cantidad de ARN mensajero (traducción). Y finalmente de una mayor cantidad de proteína colágeno I tipo  $\alpha 1$ . Los individuos no portadores del polimorfismo 2046G/G presentaban una relación entre las proteínas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de 2:1, sin embargo los portadores del polimorfismo 2046G/T presentaban una relación 2,3:1. Este exceso de cadenas  $\alpha 1$  de alguna manera introduce alteraciones en las cualidades biofísicas de las fibrillas de colágeno (tal vez, la formación de triples hélices formadas únicamente por cadenas  $\alpha 1$ ) que genera una reducción del límite elástico, como también observaron en este estudio. El colágeno se encuentra en muchos tejidos y este polimorfismo se ha asociado con patología de los tejidos blandos como ruptura del ligamento cruzado, dislocación de hombro (183) y prolapso de órganos pélvicos en mujeres (184). En cuanto a la fisiopatología cardiovascular, se ha propuesto que puede desempeñar un papel en la regulación de la distensión arterial, ya que los portadores de este polimorfismo presentan una mayor velocidad de onda de pulso arterial de forma independiente a la edad, sexo, actividad física, tabaquismo, presión arterial media e historia familiar de HTA (185). Por otro lado, podría desarrollar un papel en el infarto de miocardio, ya que el porcentaje de portadores de este polimorfismo es menor entre los supervivientes de un infarto agudo de miocardio respecto a controles sin cardiopatía isquémica (186).

### 1.9.2.2 *RETN*

La **resistina** es una proteína rica en cisteína que se expresa principalmente en células mononucleares de sangre periférica en humanos y cuya expresión aumenta a medida que estas células se diferencian en macrófagos. Algunos estudios han asociado concentraciones elevadas de resistina con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus y enfermedad cardiovascular. Esta proteína parece participar en la patogénesis de la arteriosclerosis promoviendo la disfunción endotelial, la proliferación de las células

musculares lisas vasculares, la inflamación arterial y la formación de células espumosas (187). El gen RETN codifica la resistina, se encuentra en el cromosoma 19p13.3 (188) y se han descrito varios polimorfismos. El polimorfismo de la región promotora -420C>G del gen RETN se asocia con concentraciones elevadas de resistina (189,190). Aunque existe evidencia de que la resistina induce hipertrofia en cardiomiocitos neonatales y disfunción en cardiomiocitos adultos en ratas diabéticas (191), no se ha publicado nada sobre su posible papel en la fisiopatología de los pacientes con MCH.

### **1.9.2.3 ADRB1**

El **receptor adrenérgico  $\beta$ 1** es una proteína de señalización que se encuentra en las membranas celulares del corazón y otros órganos y que media la acción de las catecolaminas del sistema nervioso simpático. Está acoplado a una subunidad de la proteína G que activa la adenilatociclasa y se generan una serie de reacciones en cadena que dan lugar a los distintos efectos fisiológicos. Está formado por 7 dominios transmembrana, tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares, un dominio N-terminal extracelular y una cola C-terminal intracelular. Su gen, ADRB1, se encuentra en el cromosoma 10q25.3. Su estimulación crónica lleva a la hipertrofia miocárdica y a la insuficiencia cardiaca en ratones transgénicos que sobreexpresan ADRB1. El examen anatomopatológico mostró además, amplias áreas de fibrosis intersticial, una marcada hipertrofia de los miocitos y desorganización de las miofibrillas (192).

Su polimorfismo más estudiado es el ADRB1 Arg389Gly (rs1801253, 1165G>C). El alelo Arg389, es más frecuente en población general, presenta una actividad basal de la adenilatociclasa ligeramente elevada, pero con una respuesta 3 veces mayor a la estimulación, además de una mayor sensibilidad a la estimulación (193). Este

polimorfismo afecta a una zona en la cola intracelular del séptimo dominio en una zona donde se une con la proteína G. En humanos, este polimorfismo se asocia con un aumento del riesgo de insuficiencia cardiaca (194) y también con una mayor respuesta a beta-bloqueantes en pacientes con insuficiencia cardiaca (195). Las hormonas tiroideas desempeñan un importante papel en la regulación de la expresión de ADRB1 y en la densidad de este receptor en las membranas miocárdicas. De hecho, en humanos la expresión durante la tirotoxicosis está considerablemente aumentada y el alelo Arg389 se ha relacionado con hipertrofia ventricular en este contexto (196).

Existe otro polimorfismo, Ser49Gly (rs1801252), que se ha asociado con la frecuencia cardiaca en reposo en una cohorte de pacientes hipertensos de origen asiático. Se objetivó como la frecuencia cardiaca media era mayor a medida que aumentaba el número de alelos 49Ser que poseían los pacientes (197). Su efecto sobre la hipertrofia miocárdica o sobre pacientes con MCH no se ha establecido.

#### **1.9.2.4 PGC1- $\alpha$**

El **cofactor 1- $\alpha$  del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas** (*Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha*: PGC-1 $\alpha$ ) es una proteína que regula genes relacionados con el metabolismo energético. Es un regulador de la biogénesis mitocondrial y de su función. La división mitocondrial requiere de la transcripción de ADN mitocondrial y nuclear, además de la síntesis de nuevas proteína, y fosfolípidos, y se realiza por un proceso de fisión. En la regulación de la replicación y transcripción del ADN mitocondrial, y también de la síntesis de proteínas mitocondriales que están codificadas en el núcleo, están implicados los factores respiratorios nucleares (*Nuclear Respiratory Factors*, NRF-1 y NRF-2), factor A

de transcripción mitocondrial (*Mitochondrial Transcription Factor A*: TFAM), y receptores nucleares que incluyen los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*: PPAR). Mediante el aumento de la actividad transcripcional de los NRF sobre los promotores de TFAM y de los PPARs, los cofactores PGC-1 $\alpha$  and  $\beta$  sincronizan ambos genomas. La comunicación bidireccional entre el núcleo y la mitocondria es clave para ajustar la bioenergética mitocondrial a la homeostasis celular. PGC1- $\alpha$  controla el contenido óptimo de mitocondrias, ya que su cantidad está directamente relacionada con la densidad mitocondrial tanto en el corazón como en el músculo esquelético. Además, su expresión está linealmente relacionada con el consumo máximo de oxígeno, lo cual indica que tiene un papel clave en la determinación de la capacidad de generación de energía (198). Su gen, PPARGC1, se encuentra en el cromosoma 4p15.1 (199).

Dos de sus polimorfismos, Gly482Ser (rs8192678, 1444G>A) y Thr394Thr (rs2970847, 1182A>G) se han relacionado con el riesgo de MCH y con un máximo grosor ventricular mayor (8,4%) en pacientes con MCH. Sin embargo, no se identificó ningún efecto en pacientes con hipertensión arterial con o sin HVI (200).

#### 1.9.2.5 NOS3

El **óxido nítrico** se sintetiza continuamente a partir de L-arginina por la sintetasa de óxido nítrico (NOS, Nitric Oxide Synthase) por las células del endotelio vascular. Este gas soluble está muy implicado en la homeostasis vascular mediante la modulación del tono vascular, la regulación del crecimiento celular local y la protección frente a la acciones de las plaquetas y células sanguíneas circulantes. A nivel cardiaco puede estimular la angiogénesis, disminuir la hipertrofia de los cardiomiocitos, y limitar la

producción de proteínas de la matriz extracelular por los fibroblastos y de este modo influenciar el proceso de remodelado cardiaco (201). Existe una gran cantidad de patologías que se asocian con una disminución de la liberación de óxido nítrico en la pared vascular como la hipertensión arterial, la dislipemia, la diabetes mellitus, el tabaquismo y la insuficiencia cardiaca (202). Existen 3 isoformas de la enzima NOS que difieren en su estructura y función: nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*) que se expresa constitutivamente en algunas neuronas del cerebro, iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) que se expresa en enfermedades inflamatorias y eNOS (*endotelial Nitric Oxide Synthase*) que también se expresa constitutivamente en el endotelio. El gen de la eNOS, NOS3, se encuentra en el cromosoma 7q36.1.

Su polimorfismo 894T>G (rs1799983, Asp298Glu) se ha asociado una mayor hipertrofia en pacientes hipertensos (201), con un mayor riesgo de cardiopatía isquémica (203), con vasoespasmo coronario (204,205) y con un mayor riesgo de ictus isquémico (206–208). En pacientes con MCH el polimorfismo 894T>G se asocia con vasoespasmo coronario y con la necesidad de un mayor número de fármacos para el control de los síntomas (209). En pacientes varones con enfermedad de Fabry los portadores homocigotos 894G/G presentan un grosor en la pared posterior del VI 1 mm menor que los portadores de al menos un alelo 894T/- (210).

#### 1.9.2.6 CALM3

La **calmodulina** actúa como un sensor intracelular del calcio iónico, juega un papel importante en la homeostasis del calcio. Además, muchas de las acciones del calcio se realizan mediante su unión a calmodulina. Esta proteína es sintetizada por una

familia formada por 3 genes: CALM1 (14q32.11), CALM2 (2p21.1–p21.3) y CALM3 (19q13.32).

Polimorfismos en CALM1 y CALM2 se han asociado con taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica y con síndrome de QT largo. Sin embargo, un polimorfismo de la región promotora de CALM3 (-34T>A) se ha asociado con la expresión de MCH. Así el alelo CALM3 -34T, que presenta una actividad menor, es más frecuente en pacientes con MCH con mutaciones en genes sarcoméricos conocidas que en individuos sanos. Y además, muestra una tendencia a ser más frecuente en portadores de mutaciones sarcoméricas con expresión de MCH (alteraciones en el ECG y ecocardiografía) que en portadores de esas mismas mutaciones sin expresión de la enfermedad (211).



## **2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Existe una gran variabilidad en la expresión morfológica, clínica y pronóstica en los pacientes con MCH (10). Esta variabilidad no parece explicarse solamente con las distintas mutaciones en genes sarcoméricos. Estudios previos con amplias series de pacientes no han permitido establecer un claro patrón de expresión morfológica, de manifestaciones clínicas ni de pronóstico en estos pacientes (5,128,129). Deben existir otros factores ambientales o genéticos implicados en la amplia variabilidad observada.

El remodelado cardíaco parece jugar un papel importante en la fisiopatología y evolución de los pacientes con MCH mediante alteraciones en el metabolismo del colágeno que desembocan en fibrosis (212,213). Este remodelado puede estar influenciado por polimorfismos en genes no sarcoméricos, como los implicados en el sistema renina-angiotensina-aldosterona y otros. Y estas alteraciones del remodelado podrían conducir a alteraciones en la expresión de la enfermedad y tener un impacto sobre el pronóstico de los pacientes con MCH.

La FA presenta una alta incidencia en los pacientes con MCH (10-40%) (107–109) siendo este porcentaje mayor a medida que avanza la edad. Si bien, pocos estudios se han centrado en identificar factores predictores del desarrollo de FA en estos pacientes (110–112). Y eso pese a que su presencia confiere un mal pronóstico a estos pacientes (111,113,114) con un aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca, ictus, embolismo periférico y arritmias deletéreas (115,116).

El pronóstico de los pacientes con MCH también es muy variable y poco se conoce sobre el posible efecto que pueden ejercer estos polimorfismos en genes no sarcoméricos.

Merece la pena explorar el efecto de estos polimorfismos para aportar información sobre la etiopatogenia y fisiopatología de esta enfermedad, permitir orientar mejor el pronóstico y apuntar hacia posibles dianas terapéuticas que modifiquen dicho pronóstico.

Nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: Polimorfismos de genes no sarcoméricos influirán en el remodelado cardiaco y tendrán implicaciones pronósticas en los pacientes con MCH.

### **3. OBJETIVOS**

1. Estudiar el efecto de varios polimorfismos localizados en genes no sarcoméricos en la fibrosis cardiaca en pacientes con miocardiopatía hipertrófica:

1.1 Estudiar la asociación de los polimorfismos con el grado de fibrosis miocárdica mediante resonancia magnética cardiaca utilizando realce de gadolinio.

1.2 Estudiar la implicación de los polimorfismos en el grado de fibrosis miocárdica observado en tejidos miocárdicos de pacientes con miocardiopatía hipertrófica obtenidos por miectomía.

2. Estudiar el efecto de varios polimorfismos localizados en genes no sarcoméricos en el desarrollo de fibrilación auricular en pacientes con miocardiopatía hipertrófica.

3. Estudiar el efecto de varios polimorfismos localizados en genes no sarcoméricos en el ingreso hospitalario urgente en pacientes con miocardiopatía hipertrófica.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

## **4.1 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO**

Se realizó un estudio de cohortes incluyendo pacientes estables con MCH que asisten a consulta monográfica de dicha enfermedad en tres hospitales terciarios del sudeste de España (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, el Hospital General Universitario de Alicante y el Hospital General Universitario de Elche, Alicante), que dan cobertura en conjunto a una población en torno a 700.000 habitantes. Sin embargo, estas consultas han tenido históricamente un papel de centro de referencia en las dos provincias.

## **4.2 PACIENTES Y CONTROLES**

Se incluyó de forma consecutiva todos los pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de MCH tras la realización de una resonancia magnética cardiaca. Se inició la inclusión de pacientes en noviembre de 2003 y finalizó noviembre de 2011.

El diagnóstico de MCH se estableció en los casos índice ante la presencia de una hipertrofia ventricular ecocardiográfica ( $\geq 15\text{mm}$  de grosor en cualquier segmento evaluado) en ausencia de una causa cardiaca o extracardiaca que la justifique, siguiendo los criterios internacionales establecidos (3). Y de acuerdo con los criterios establecidos para el diagnóstico en familiares de primer grado de pacientes con MCH inequívoca (214).

Se recogió una historia clínica completa que incluyó una detallada anamnesis, exploración clínica, exploraciones complementarias y eventos durante el seguimiento.

Los controles fueron seleccionados entre los trabajadores de los tres hospitales con edad y género similar a los pacientes. Se les realizó una anamnesis y exploración física completa para descartar cardiopatía.

### **4.3 EVALUACIÓN CLÍNICA**

La evaluación clínica se llevó a cabo tras la inclusión de los pacientes así como en cada una de las revisiones clínicas (Tabla 4.1).

Se realizó una anamnesis detallada en la que se buscó y se registró la presencia de antecedentes familiares muerte súbita o cardiopatía familiar. Se identificaron los posibles factores de riesgo cardiovascular y comorbilidades (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo, obesidad, neumopatía, insuficiencia renal crónica y aterosclerosis coronaria) que pudieran presentar los pacientes.

De forma específica se buscó la presencia de síntomas sugerentes de disnea, y se estimó su severidad siguiendo las recomendaciones de la *New York Heart Association* en cuatro grados (I-IV/IV), de ortopnea y de disnea paroxística nocturna. También se interrogó sobre la presencia de molestias precordiales con el esfuerzo y en reposo que pudieran ser sugerentes de isquemia miocárdica. La presencia de palpitaciones, síncope o presíncope también quedó registrada.

Se comprobó y registró el tratamiento farmacológico que estaban tomando los pacientes, tanto para su cardiopatía como para otras comorbilidades.



Se llevó a cabo una exploración física completa con especial atención a la presencia de alteraciones en los pulsos periféricos, extratonos y soplos sistólicos en la auscultación que se modificaran con las maniobras de Valsalva.

**TABLA 4.1 VARIABLES RECOGIDAS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA**

| <b>FILIACIÓN</b>                     | <b>CIRUGÍA CARDIACA PREVIA</b> |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Identificador del paciente           | Motivo                         |
| Identificador de familia             | Tipo de intervención           |
| Hospital de procedencia              | Prótesis mitral                |
| Fecha de diagnóstico                 | Plastia mitral                 |
| Historia de cardiopatía familiar     | Derivación aorto-coronaria     |
| Caso índice                          | <b>SÍNTOMAS</b>                |
| Sexo                                 | Angina                         |
| Fecha de nacimiento                  | Disnea                         |
| <b>FRMS</b>                          | Palpitaciones                  |
| MS reanimada                         | Síncope                        |
| TVS                                  | Presíncope                     |
| AFMS                                 | NYHA                           |
| Síncope inexplicado                  | <b>OTROS ANTECEDENTES</b>      |
| Máximo grosor $\geq 30$ mm           | Otros                          |
| RATA                                 | <b>TRATAMIENTO CRÓNICO</b>     |
| TVNS                                 | IECA                           |
| <b>ANTECEDENTES CARDIOVASCULARES</b> | ARAI                           |
| HTA                                  | Betabloqueantes                |
| DM                                   | Calcioantagonistas             |
| Dislipemia                           | Disopiramida                   |
| Tabaquismo                           | Amiodarona                     |
| Sobrepeso / Obesidad                 | Acenocumarol                   |
| Neumopatía (EPOC/SAOS)               | Antialdosterónicos             |
| Insuficiencia renal crónica          |                                |
| Enfermedad coronaria                 |                                |
| Otros antecedentes cardiovasculares  |                                |

Se registró la presencia o ausencia de cada una de las variables así como comentarios explicativos en caso de ser necesarios.

#### 4.4 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

A los pacientes se les practicó las siguientes exploraciones complementarias (Tabla 4.2)

| <b>TABLA 4.2 VARIABLES RECOGIDAS EN LAS EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS.</b> |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <b>ECG</b>   | <b>HOLTER-ECG</b>                     |
| Fecha del ECG  | Fecha del holter-ecg                  |
| RS (Sí/No)   | TVNS (Sí/No)                          |
| FA paroxística (Sí/No)   | FA paroxística (Sí/No)                |
| FA persistente (Sí/No)   | Taquicardia auricular (Sí/No)         |
| FA permanente (Sí/No)  | BAV 1º (Sí/No)                        |
| Ritmo de MP (Sí/No)  | BAV 2º tipo I (Sí/No)                 |
| Bloqueos de rama (Sí/No, tipo)   | BAV 2º tipo II (Sí/No)                |
| <b>ECOCARDIOGRAFÍA</b>   | BAV 3º (Sí/No)                        |
| Fecha de la ecocardiografía  | Extrasístoles ventriculares (Nº)      |
| Grosor máximo del VI (mm)  | Extrasístoles supraventriculares (Nº) |
| Septo interventricular (mm)  | <b>RMN</b>                            |
| Diámetro telediastólico del VI (mm)  | Fecha de la RMN                       |
| Grosor pared posterior (mm)  | RTG (Sí/No)                           |
| Diámetro telesistólico del VI (mm)   | Segmentos con RTG (Nº)                |
| Fracción de acortamiento (%)   | Grosor máximo del VI (mm)             |
| Fracción de eyección (%)   | Septo interventricular (mm)           |
| Volumen telediastólico del VI (ml)   | Diámetro telediastólico del VI (mm)   |
| Volumen telesistólico del VI (ml)  | Pared posterior (mm)                  |
| Diámetro de la AI (mm)   | Diámetro telesistólico del VI (mm)    |
| Gradiente en TSVI basal (mmHg)   | Fracción de eyección (%)              |
| Volumen auricular (ml)   | Diámetro de la AI (mm)                |
| Onda E (cm/s)  | Gradiente en TSVI basal (mmHg)        |
| Onda A (cm/s)  | Volumen auricular (ml)                |
| e' (cm/s)  | Onda E (cm/s)                         |
| Insuficiencia mitral (0, 1, 2, 3, 4)                                       | Onda A (cm/s)                         |
| Otras valvulopatías (Sí/No)  |                                       |
| <b>ERGOMETRÍA</b>  |                                       |
| Fecha de la ergometría   |                                       |
| Protocolo (Bruce, ModBruce, otro)  |                                       |
| Duración (minutos)   |                                       |
| METs alcanzados  |                                       |
| TVNS (Sí/No)   |                                       |
| Positividad clínica para isquemia (Sí/No)                                  |                                       |
| Positividad ECG para isquemia (Sí/No)                                      |                                       |
| Positividad mecánica para isquemia (Sí/No)                                 |                                       |

Además de la presencia o ausencia, mediciones o categorizaciones de las variables antes descritas, se registró comentarios cuando fue necesario.

#### 4.4.1 Electrocardiograma de 12 derivaciones

En todos los casos se practicó un ECG de 12 derivaciones mediante electrocardiógrafos homologados tras 10 minutos de reposo. Se registró en papel milimetrado a una velocidad de 25 mm/s y a 10 mm/mV.

Los ECG se practicaron en los días que los pacientes acudían a la consulta para la evaluación clínica. Se valoró la frecuencia cardíaca, el ritmo cardíaco (con especial interés en identificar fibrilación auricular), las alteraciones de la onda P, presencia de ondas Q patológicas, alteraciones de la conducción intraventricular, bloqueos de rama, alteraciones de la conducción aurículo-ventricular e índices de hipertrofia ventricular (Sokolow-Lyon y Romhilt-Estes).

#### 4.4.2 Ecocardiografía transtorácica

El estudio ecocardiográfico se realizó con un equipo Sonos 5500 (Phillips, Eindhoven, Países Bajos). Se informó al paciente sobre el propósito y el carácter seguro y no invasivo de la exploración. Se procuró proporcionar a los pacientes un ambiente cómodo y que preservara su intimidad. Los estudios se realizaron en reposo y las imágenes y vídeos se obtuvieron principalmente en decúbito lateral izquierdo con abducción del miembro superior izquierdo. Cuando fue necesario se colocó al paciente en posiciones adicionales: decúbito lateral derecho para registrar el flujo valvular aórtico, decúbito supino para facilitar las mediciones subcostales y para vistas supraesternales en ocasiones fue necesario colocar una almohada detrás de los hombros para que el cuello quedase hiperextendido. Las imágenes y vídeos fueron almacenadas en soporte informático para posteriores revisiones.

Se realizó un estudio completo en modos M, bidimensional, Doppler pulsado, Doppler continuo y Doppler tisular, desde los planos paraesternal largo y corto, apical cuatro, cinco, dos y tres cámaras siguiendo las recomendaciones internacionales para la cuantificación de cámara cardíacas (215), valoración de función diastólica (77) y valoración de valvulopatías (216–218). Los datos ecocardiográficos son el resultado de la media aritmética de las mediciones sobre 3 ciclos cardíacos consecutivos.

Para identificar las zonas hipertróficas del ventrículo izquierdo así la zona de mayor grosor se empleó el modelo de 16 segmentos propuesto por la *American Society of Echocardiography* (219) y se realizó varias mediciones en eje corto a nivel de los segmentos basales (válvula mitral), segmentos medios (músculos papilares) y segmentos apicales.

Se estudió tanto en el plano paraesternal largo como en los planos apicales la presencia de un movimiento sistólico anterior de la valva septal de la válvula mitral. Del mismo modo, se prestó especial interés en la búsqueda de aceleración en el tracto de salida del ventrículo izquierdo, tanto en reposo como tras realizar una maniobra de Valsalva. Mediante Doppler color y Doppler pulsado se identificó en lugar donde se producía la aceleración. Esto, junto con la morfología de la curva obtenida en el registro con Doppler continuo ayudó a establecer la presencia de un gradiente dinámico en el tracto de salida del ventrículo izquierdo, descartando otras causas. El gradiente del tracto de salida del ventrículo izquierdo se calculó mediante la ecuación modificada de Bernoulli, esto es, multiplicando por cuatro el cuadrado de la velocidad máxima obtenida en el tracto de salida del ventrículo izquierdo con Doppler continuo.

### 4.4.3 Ergometría

Se realizó una ergometría limitada por síntomas en tapiz rodante siguiendo las recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón (*American Heart Association, AHA*) (220). El paciente era previamente informado de en qué consistía la prueba y el propósito de ésta y otorgaba su consentimiento por escrito. Se debía evitar la ingesta de comida (el agua estaba permitida) y fumar en las 3 horas previas a la realización de la prueba. Además, no debía realizar esfuerzos físicos inusuales en las 12 horas antes para no modificar la capacidad de esfuerzo máximo durante la prueba.

Se empleó el protocolo de Bruce (221) habitualmente, y en los casos en los que el paciente presentaba una deambulación limitada o se preveía una mala clase funcional se realizó un protocolo de Bruce modificado. El protocolo de Bruce puede definirse como un protocolo escalonado o discontinuo frente a otros protocolos en rampa más progresivos respecto al incremento de la carga de ejercicio. En este protocolo se parte de una velocidad de 2,7 kilómetros por hora y una pendiente del 10% y ambas se van incrementando en cada estadio de 3 minutos. El protocolo de Bruce modificado consta de dos estadios previos de 3 minutos a 0% y 5% de pendiente a velocidad constante de 2,7 kilómetros por hora para después continuar con el resto de estadios de Bruce convencional.

Durante toda la prueba se disponía de monitorización continua del ECG de las 12 derivaciones estándar, de forma que podía valorarse la frecuencia cardiaca, el ritmo cardiaco y la repolarización. Para obtener un adecuado registro electrocardiográfico se eliminaba la capa cutánea más superficial. Para ello, las zonas en la que se iban a aplicar los electrodos eran rasuradas, frotadas con una gasa empapada en alcohol. Posteriormente se adherían los electrodos y se valoraba la necesidad de aplicar una

malla en forma de camiseta para evitar que los electrodos se despegaran por la sudoración. Se obtenía un ECG de 12 derivaciones en reposo en decúbito supino y en bipedestación, en cada estadio de ejercicio, en el pico de ejercicio, cada dos minutos durante la recuperación y cada vez que lo considerara oportuno el personal sanitario presente durante la prueba.

Mediante un esfigmomanómetro manual con columna de mercurio y la auscultación de los sonidos de Korotkoff se obtenía la tensión arterial basalmente en decúbito y bipedestación, en cada estadio (últimos 30 segundos), en el pico de ejercicio, tras un minuto de reposo y después cada 2 minutos hasta finalizar la prueba. Adicionalmente se tomaba la tensión arterial a requerimiento del médico en el momento que consideraba oportuno.

Se consideró con respuesta normal de la tensión arterial al incremento gradual durante el ejercicio de al menos 20 mmHg respecto a la tensión arterial basal. Se consideró respuesta anormal de la tensión arterial tanto a la respuesta plana (elevación menor de 20 mmHg de la tensión arterial basal durante el ejercicio) como a la respuesta hipotensora (incremento inicial con caída posterior al menos de 20 mmHg o bien al descenso continuo de la tensión arterial de al menos 20 mmHg respecto a la tensión arterial basal).

Se estimó indirectamente el consumo de oxígeno en equivalentes metabólicos (MET) según las fórmulas habituales integradas en el software del equipo (222–224).

#### 4.4.4 Holter-ECG

Se efectuó una monitorización electrocardiográfica ambulatoria continua de 24 horas utilizando equipos y software diseñados para tal fin (ELA-medical, SYNETEC versión 1,10. Montrouge, Francia). Tras una aplicación de los electrodos similar a la descrita para la ergometría se proporcionaba al paciente electrodos suplementarios para sustituir los que pudieran desprenderse. Además se adjuntaba un formulario para que el paciente apuntara los síntomas (especialmente palpitaciones) que pudiera presentar junto con la hora. En todos los casos, tras la clasificación automática de la morfología de los complejos QRS, se realizó una reclasificación manual de los grupos de complejos cuando fue necesario. Los registros con alto nivel de artefactos fueron desechados y se repitió la exploración hasta obtener unos registros adecuados.

El análisis del registro electrocardiográfico permitió identificar el ritmo predominante durante el registro, la frecuencia cardiaca (máxima, mínima y media), la presencia de trastornos de la conducción aurículo-ventricular y la aparición de arritmias auriculares (taquicardia auricular, flutter auricular y fibrilación auricular) y ventriculares.

Se definió como taquicardia ventricular no sostenida (TVNS) a la presencia de 3 ó más latidos ventriculares consecutivos a una frecuencia de al menos 120 latidos / minuto y con una duración menor de 30 segundos. En caso de ser mayor de 30 segundos se definió como taquicardia ventricular sostenida.

#### 4.4.5 Resonancia magnética cardiaca

Se empleó un escáner de 1,5 T (Gyrosan NT; Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). Todas las imágenes se obtuvieron mediante sincronización con el ECG

y mientras el paciente aguantaba la respiración. Se obtuvo inicialmente imágenes en los tres planos ortogonales (coronal, sagital y transversal) para determinar la posición exacta del VI. A continuación se adquirieron secuencias funcionales de cine-RM eco de gradiente en planos de eje corto desde la base hasta el ápex del ventrículo izquierdo, eje largo horizontal, 4 y 2 cámaras en la AI-VI. Se adquirieron entonces imágenes de marcado miocárdico (tagging) mediante secuencias eco de gradiente eco-planar en el plano eje corto (basal, tercio medio y apical). Y finalmente se administró gadolinio en dosis de 0,2 mm/kg en bolo, y tras 10 min se obtuvieron imágenes de inversión-recuperación potenciadas en T1 en planos del eje corto (basal, tercio medio y apical), el eje largo horizontal y el eje largo vertical para valorar la presencia y distribución de RTG. El tiempo de inversión se ajustó para cada paciente entre 200 y 400 ms para alcanzar una supresión óptima del tejido miocárdico normal y conseguir imágenes de miocardio negro (225).

Todas las imágenes fueron analizadas empleando una estación de trabajo con un software comercial de post-procesado de imágenes (EasyVision, version 4.0; Philips Medical Systems y Mass Suite 6.1; MEDIS Medical Imaging Systems, Leiden, Países Bajos) por dos observadores con experiencia en RMC, ciegos a la información clínica y cuya opinión se alcanzó por mutuo acuerdo.

Se consideró la presencia de RTG ante imágenes altamente hiperintensas que persistían en el mismo corte tras excluir artefactos. Se cuantificó la extensión del RTG contabilizando el número de segmentos con RTG empleando el modelo de 17 segmentos de la American Heart Association (226).



## 4.5 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

### 4.5.1 Recogida de muestras biológicas

Se extrajeron muestras de sangre de los pacientes, sin traumatismo ni estasis, a primera hora de la mañana, tras 12 h de ayuno y en reposo, de la vena antecubital. Se obtuvieron muestras de plasma citratado, suero y placa leucoplaquetaria tras centrifugación a 3500 rpm, durante 15 minutos. Las muestras se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en los distintos hospitales, hasta un análisis posterior. La extracción de ADN de sangre periférica se realizó utilizando el kit de DNeasy Blood and Tissue y el sistema QIAcube (Qiagen, Valencia, CA, EEUU).

### 4.5.2 Genotipado de polimorfismos

Se realizó el análisis de los polimorfismos gracias a un acuerdo con el Centro Inmunológico de Alicante y se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Polimorfismo del gen de la ECA I/D: El genotipado se basó en un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) descrito por Perkins et al (150). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% y se visualizaron mediante bromuro de etidio para identificar la presencia o ausencia de la inserción.
- Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*): rs5186 (1166A>C AGTR I), rs1799998 (-344T>C CYP11B2), rs8192678 (1444G>A PGC-1), rs1800012 (2046G>T

COL1A1), rs1801253 (1165G>C ADRB1), rs1799983 (894G>T NOS3), rs1862513 (-420C>G RETN) y rs6612 (-34T>A CALM3). Se realizó mediante discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real con sondas TaqMan (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU). Se emplearon cebadores y sondas comercialmente disponibles de Applied Biosystems. Se aplicó condiciones estándar de PCR, con una temperatura de hibridación de 60°C. Las reacciones de secuenciación se realizaron mediante un kit de secuenciación de ciclo con BigDye terminator vs3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California) y analizados por electroforesis capilar empleando el 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California).

### 4.5.3 Determinación de resistina

La concentración de resistina en suero fue determinada mediante técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) empleando el kit comercial, AssayMax Human Resistin kit (PeproTech Inc, NJ, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se trata de un ELISA tipo sándwich en el que se emplean dos tipos de anticuerpos con capacidad de unirse a la resistina. Un anticuerpo monoclonal murino específico para resistina con el que se reviste los pocillos de la placa y un anticuerpo polyclonal biotinilado específico, que fue reconocido por un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Tras añadir un sustrato para la enzima peroxidasa, se midió el revelado a 450 nm substrayendo lecturas a 570 nm para corregir imperfecciones ópticas. Los

valores mínimos de resistina detectables fueron de 0,2 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 4,5% y 7.1%, respectivamente.

#### 4.5.4 Determinación de aldosterona

Los valores de aldosterona en suero fueron determinados mediante RIA (radioinmunoassay) directo (Immunotech SAS, Marseille, Francia).

Se incubó 50 µL de muestras de suero y 50 µL de calibradores en tubos revestidos con anticuerpos y 500 µL de trazador marcado con I<sup>125</sup>. Tras 3 horas de incubación con agitación continua, el contenido de los tubos fue aspirado y la radioactividad determinada empleando un contador gamma. Previamente se había elaborado una curva de calibrado y los valores de aldosterona fueron determinados por interpolación con la curva.

#### 4.5.5 Estudio anatomopatológico

Se obtuvo muestras de los servicios de cirugía cardíaca de los hospitales La Fe de Valencia y General de Valencia. Durante cirugía de miectomía aislada, se extrajeron muestras del septo subvalvular, entre 50 y 80 mg, que fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. Las muestras de tejido se procesaron con inclusión en parafina y se realizó secciones de 2-3 µm. Para la evaluación histoquímica de la infiltración de tejido conectivo del tejido miocárdico se empleó la tinción tricrómica de Masson mediante un sistema automatizado de tinción (Dako Artisan, Dako, Carpintería, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como su nombre indica esta tinción emplea tres colorantes: hematoxilina, fucsina y

verde luz. Esta tinción es muy útil para poner de manifiesto las fibras de colágeno, y el tejido conectivo en general. Se empleó una escala cualitativa en la medición del grado de infiltración de tejido conectivo, de 0 a 4 (0 negativa, 1 ligera, 2 moderada, 3 severa y 4 muy severa). Todas las determinaciones fueron ciegas y realizadas por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Para su análisis se empleó un microscopio de luz transmitida Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

## **4.6 SEGUIMIENTO Y EVENTOS**

El seguimiento se realizó al menos una vez al año en la consulta o con mayor frecuencia en función de las necesidades del paciente. Durante este seguimiento se fueron recogiendo los distintos eventos clínicos (Tabla 4.3).

Se definieron los siguientes eventos finales para el análisis de supervivencia:

- Muerte súbita: muerte cardíaca no esperada que acontece dentro de una hora tras el inicio de los síntomas o muerte nocturna sin el antecedente de empeoramiento previo de los síntomas.
- Muerte de origen cardiovascular
- Muerte de origen no cardiovascular
- Descarga apropiada del DAI: terapia aplicada ante taquiarritmias ventriculares.
- TVS: TV que dura más de 30 segundos.
- Desarrollo de FA: mediante la documentación con ECG de 12 derivaciones realizado por síntomas o de forma rutinaria durante los seguimientos o episodios mayores de 2 minutos en holter-ECG.
- Ingreso hospitalario urgente: ingreso hospitalario no programado que incluyera al menos una noche.
- Insuficiencia cardíaca: identificado mediante la valoración de síntomas y signos relacionados.
- Evento isquémico cardíaco: identificado por la presencia de síntomas, signos, alteraciones del ECG y alteraciones enzimáticas relacionadas.

- Ictus y accidente isquémico transitorio (AIT): identificado mediante la valoración por neurología de síntomas y signos relacionados, y del resultado de técnicas de neuroimagen.

**TABLA 4.3 VARIABLES RECOGIDAS DURANTE EL SEGUIMIENTO**

|                             |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| Muerte                      | Sí/No, fecha, causa  |
| Descarga de DAI             | Sí/No, fecha, causa  |
| TVS                         | Sí/No, fecha         |
| Desarrollo de FA            | Sí/No, fecha         |
| Ingreso hospitalario        | Sí/No, fecha y causa |
| Insuficiencia cardiaca      | Sí/No, fecha         |
| Evento isquémico cardiaco   | Sí/No, fecha         |
| Ictus o AIT                 | Sí/No, fecha         |
| Fecha implante de DAI       | Sí/No, fecha         |
| Fecha implante de MP        | Sí/No, fecha         |
| Cirugía cardiaca            | Sí/No, fecha         |
| Miectomía                   | Sí/No                |
| Implante de prótesis mitral | Sí/No                |
| Plastia mitral              | Sí/No                |
| Derivación aorto-coronaria  | Sí/No                |
| Ablación alcohólica         | Sí/No, fecha         |

Se registró comentarios adicionales en cada variable cuando fue necesario.

## **4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se estudió si las variables cuantitativas analizadas seguían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas con distribución normal se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las variables cuantitativas de distribución no paramétrica se expresan como mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se expresan como porcentajes.

Las comparaciones entre grupos de variables continuas se realizaron usando la prueba de t de Student para muestras independientes o la prueba U de Mann-Whitney según fuera apropiado. Para las variables categóricas se empleó la prueba de  $\chi^2$  de Pearson o la exacta de Fisher según procediera. La correlación entre dos variables continuas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según fuese necesario. La comparación entre variables continuas y las diferentes variables discretas se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) o la prueba de Kruskal Wallis según estuviese indicado.

Se realizó un análisis de regresión lineal para valorar la asociación entre el número de segmentos con RTG y varias variables demográficas, ecocardiográficas, de ergometría, de holter-ECG, de RMC y genéticas.

Para evaluar la asociación entre la fibrosis miocárdica de las muestras de tejido obtenidas por miectomía valorada como ligera (escala cualitativa 0, 1 ó 2) o severa (escala cualitativa 3 ó 4) y los 9 polimorfismos y se realizó un análisis de regresión lineal.

Se analizaron todas las variables asociadas al desarrollo de FA. En la valoración de la capacidad predictiva de diferentes variables continuas en la identificación del desarrollo de FA durante el seguimiento se realizó un análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). La tasa de supervivencia libre de incidencia de FA se calculó empleando el método de Kaplan-Meier y las diferencias fueron determinadas empleando la prueba long-rank. Se valoró el efecto independiente en el pronóstico mediante un modelo de regresión de Cox que incluía variables demográficas, ecocardiográficas, de ergometría, de holter-ECG, de RMC y genéticas.

La tasa de sobrevida libre de ingreso hospitalario urgente se calculó empleado el método de Kaplan-Meier y las diferencias fueron determinadas empleando la prueba long-rank. El efecto sobre el pronóstico clínico fue calculado en varias variables demográficas, ecocardiográficas, de ergometría, de holter-ECG, de RMC y genéticas empleando el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales.

Sólo las variables que mostraron un valor de  $p < 0,15$  fueron incluidas en el estudio multivariante de regresión de Cox. La asociación se consideró estadísticamente significativa si alcanzaba un nivel de significación mayor del 95% (valor de  $p < 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un software comercial IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM, 2000).

#### **4.8 ASPECTOS ÉTICOS**

La inclusión en este estudio de los pacientes no comportó un incremento del riesgo para los mismos ni alteraciones en el seguimiento habitual de los pacientes con MCH.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y se aseguró la confidencialidad de los datos obtenidos. Se siguieron los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Organización Médica Mundial recogidos en la Declaración de Helsinki, adoptada en 1964 y enmendada posteriormente, la última en la Asamblea General de octubre 2013 (227). El proyecto fue valorado favorablemente por los comités de ética en los hospitales participantes.

## **4.9 FINANCIACIÓN**

Este trabajo ha sido realizado gracias a un proyecto FIS por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PS09/00721, RETIC, RD12/0042/0049), así como parcialmente financiado gracias a un acuerdo de colaboración por el Departamento de Biología Molecular del Centro Inmunológico de Alicante.



## **5. RESULTADOS**

## **5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población del estudio la constituyeron 168 pacientes con MCH que fueron incluidos progresivamente tras realizar una RMC. Además se incluyeron 136 controles seleccionados entre los trabajadores de los 3 hospitales. Los pacientes fueron seguidos durante una mediana de 49,5 meses (RIC 25,8 - 77,0).

De los 168 pacientes de la cohorte, 159 se encontraban en RS al inicio del seguimiento. Este grupo es el que se tuvo en cuenta al analizar el desarrollo de FA; y sus características clínicas y ecocardiográficas no difieren sustancialmente de la cohorte total. Se incluyó en el estudio a los pacientes tras realizar una RMC y la calidad de las imágenes fue adecuada para la correcta interpretación en 146 pacientes. Este grupo fue en el que se valoró la extensión de fibrosis por RMC y tampoco presenta claras diferencias respecto al conjunto de los pacientes (Tabla 5.1).

### **5.1.1 Características clínicas**

Sus características clínicas y antecedentes en el momento de la inclusión en el estudio están recogidos en la Tabla 5.1. Los pacientes tenían una edad media de 49,8 años y existía una preponderancia del género masculino (71,4%). Presentaban factores de riesgo cardiovascular (HTA 35,1%, DM 8,3%), en un porcentaje no despreciable.

Un grupo importante de pacientes presentaba algún síntoma: 107 pacientes (63,7%). El síntoma más frecuente, fue como en otras cohortes el de la disnea de esfuerzo (44,0%) seguido de la angina de esfuerzo (22,6%).

**TABLA 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES DE LOS PACIENTES.**

| Variables                     | Pacientes (168) | FA (159)    | RMC (146)   |
|-------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Edad                          | 49,8 ± 15,2     | 49,3 ± 14,9 | 49,0 ± 15,2 |
| Sexo masculino (%)            | 120 (71,4)      | 112 (70,6)  | 106 (72,6)  |
| HTA (%)                       | 59 (35,1)       | 53 (33,3)   | 51 (34,9)   |
| DM (%)                        | 14 (8,3)        | 13 (8,2)    | 12 (8,2)    |
| Enfermedad arterial coronaria | 6 (3,6)         | 6 (3,8)     | 5 (3,4)     |
| Disnea NYHA II-IV (%)         | 74 (44,0)       | 72 (45,2)   | 74 (50,7)   |
| Ángor previo (%)              | 38 (22,6)       | 36 (22,6)   | 36 (24,7)   |
| Síncope                       | 17 (10,1)       | 16 (10,1)   | 15 (9,6)    |
| FA previa (%)                 | 28 (16,7)       | 21 (13,2)   | 22 (15,1)   |

Los pacientes presentaban antecedentes de cardiopatía familiar en un 26,2% de los casos. Nuestros pacientes no tenían antecedentes de TVS ni de MS reanimada. Entre las otras variables predictoras de MS, las más frecuentes eran la historia familiar de MS, la TVNS y la respuesta anómala de la TA en la ergometría (Tabla 5.2)

**TABLA 5.2 VARIABLES PREDICTORAS CONVENCIONALES DE MS EN MCH.**

| Variables convencionales                    | N, (%)    |
|---|-----------|
| Historia familiar de MS                     | 37 (22,0) |
| Síncope inexplicado                         | 17 (10,1) |
| TV no sostenida                             | 56 (33,3) |
| Grosor ventricular ≥ 30 mm                  | 9 (5,4)   |
| Respuesta anómala de la TA con el ejercicio | 64 (68,1) |

### 5.1.2 Ecocardiografía

Los pacientes presentaban un máximo grosor ventricular de 20,5 mm y un porcentaje de gradiente subaórtico basal significativo en una proporción (33,9%) similar a la descrita clásicamente. El número de pacientes con disfunción sistólica fue bajo (2,4%) como suele ser habitual en estas cohortes de pacientes.

**TABLA 5.3 ECOCARDIOGRAFÍA DE LOS PACIENTES CON MCH.**

| Variable                                |                  |
|---|------------------|
| FEVI (%)                                | 69,3 ± 9,8       |
| Máximo grosor ventricular (mm)          | 20,5 (17,2-24,5) |
| Gradiente subaórtico ≥30 mmHg basal (%) | 57 (33,9)        |
| Diámetro AI, (mm)                       | 42,5 ± 7,5       |
| DTDVI (mm)                              | 43,5 ± 8,9       |
| DTSVI (mm)                              | 25,4 ± 7,1       |
| FEVI ≤ 50% (n, %)                       | 4 (2,4)          |

### 5.1.3 Ergometría

En total 145 (86,3%) pacientes fueron capaces de completar una ergometría en tapiz rodante. La mayoría realizó un protocolo de Bruce. Los pacientes alcanzaron una capacidad de ejercicio de  $8,8 \pm 3,2$  METs y se identificó 64 (38,1%) respuestas anómalas de la TA con el ejercicio.

### 5.1.4 Resonancia magnética cardiaca

Un total 93 (63,7%) de los pacientes presentaba algún grado de RTG en la RMC (similar a lo descrito en otras cohortes). La distribución del número de pacientes en función del número de segmentos del VI con RTG se muestra en la tabla 5.4.

**TABLA 5.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LOS SEGMENTOS CON RTG.**

| Segmentos con RTG | Frecuencia | Porcentaje (%) | Porcentaje acumulado (%) |
|-------------------|------------|----------------|--------------------------|
| 0                 | 53         | 36,3           | 36,3                     |
| 1                 | 14         | 9,6            | 45,9                     |
| 2                 | 13         | 8,9            | 54,8                     |
| 3                 | 14         | 9,6            | 64,4                     |
| 4                 | 9          | 6,2            | 70,6                     |
| 5                 | 10         | 6,8            | 77,4                     |
| 6                 | 7          | 4,8            | 82,2                     |
| 7                 | 9          | 6,2            | 88,4                     |
| 8                 | 6          | 4,1            | 92,5                     |
| 9                 | 7          | 4,8            | 97,3                     |
| 10                | 1          | 0,7            | 98                       |
| 11                | 3          | 2              | 100                      |
| TOTAL             | 146        | 100            | 100                      |

### 5.1.5 Tratamiento farmacológico

Los pacientes recibían tratamiento farmacológico en su mayoría (Tabla 5.5). Los beta-bloqueantes fueron los fármacos más empleados.

**TABLA 5.5 FÁRMACOS EMPLEADOS EN LOS PACIENTES CON MCH.**

| Fármaco              | N, (%)     |
|----------------------|------------|
| IECA (%)             | 14 (8,3)   |
| ARAII (%)            | 16 (9,5)   |
| Beta-bloqueantes (%) | 121 (72,0) |
| Disopiramida (%)     | 12 (7,1)   |
| Amiodarona           | 30 (17,9)  |

### 5.1.6 Tratamiento no farmacológico

Durante el seguimiento 10 (6,0%) pacientes precisaron de miectomía y 2 (1,2%) pacientes de ablación alcohólica septal para control de los síntomas. En este tiempo se llevó a cabo el implante de DAI en 33 pacientes (19,6%) y de un MP en 13 (7,7%). Hay que recordar que en el momento de la inclusión ningún paciente tenía implantado un DAI o MP.

## 5.2 GENOTIPO

### 5.2.1 Mutaciones en genes sarcoméricos

En 78 (46,4%) de los casos se disponía de un estudio genético orientado a identificar mutaciones relacionadas con la enfermedad. Se encontró una mutación en 32 (41%) pacientes (Figura 12). Las mutaciones más frecuentes se localizaron en el gen MYBPC3.

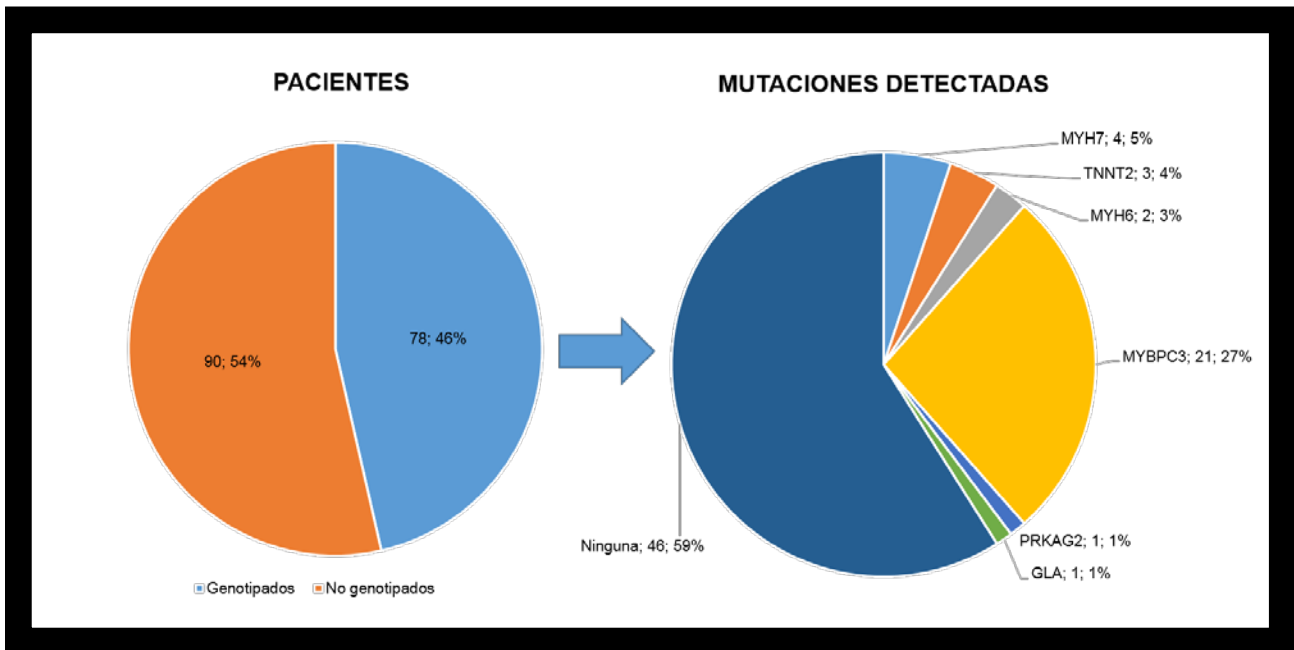


Figura 12: Mutaciones en genes sarcoméricos de los pacientes del estudio.

### 5.2.2 Polimorfismos en genes no sarcoméricos

Las frecuencias alélicas y los genotipos de nuestros pacientes están recogidos en la Tabla 5.6. No hubo desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg,  $p > 0,05$  (ACE 0,792116; AGTR1 0,108730; CYP11B2 0,615986; COL1A1 0,756201; RETN 0,787137; ADRB1 0,907042; PPARGC1A 0,592706; NOS3 0,672321; CALM3 0,424775).

**TABLA 5.6 POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LOS PACIENTES CON MCH.**

| GEN                  | Polimorfismo | Frecuencias alélicas |      | Genotipo % |      |
|----------------------|--------------|----------------------|------|------------|------|
|                      |              |                      |      |            |      |
| ACE                  | D/I          | D                    | 0,64 | D/D        | 40,5 |
|                      |              | I                    | 0,36 | D/I        | 47,0 |
|                      |              |                      |      | I/I        | 12,5 |
| AGTR1                | 1166A>C      | 1166A                | 0,66 | 1166A/A    | 40,5 |
|                      |              | 1166C                | 0,34 | 1166A/C    | 50,6 |
|                      |              |                      |      | 1166C/C    | 8,9  |
| CYP11B2              | -344C>T      | -344C                | 0,53 | -344C/C    | 26,8 |
|                      |              | -344T                | 0,47 | -344C/T    | 51,8 |
|                      |              |                      |      | -344T/T    | 21,4 |
| COL1A1               | 2046G>T      | 2046G                | 0,75 | 2046G/G    | 57,1 |
|                      |              | 2046T                | 0,25 | 2046G/T    | 36,3 |
|                      |              |                      |      | 2046T/T    | 6,5  |
| RETN                 | -420C>G      | -420C                | 0,71 | -420C/C    | 50,6 |
|                      |              | -420G                | 0,29 | -420C/G    | 41,7 |
|                      |              |                      |      | -420G/G    | 7,7  |
| ADRB1                | 1165G>C      | 1165G                | 0,67 | 1165G/G    | 44,6 |
|                      |              | 1165C                | 0,33 | 1165G/C    | 44,6 |
|                      |              |                      |      | 1165C/C    | 10,7 |
| PPARGC1A<br>(PGC-1α) | 1444G>A      | 1444G                | 0,63 | 1444G/G    | 38,1 |
|                      |              | 1444A                | 0,37 | 1444G/A    | 48,8 |
|                      |              |                      |      | 1444A/A    | 13,1 |
| NOS3<br>(eNOS)       | 894T>G       | 894T                 | 0,61 | 894T/T     | 36,3 |
|                      |              | 894G                 | 0,39 | 894T/G     | 48,2 |
|                      |              |                      |      | 894G/-     | 14,3 |
| CALM3                | -34T>A       | -34T                 | 0,82 | -34T/T     | 66,1 |
|                      |              | -34A                 | 0,18 | -34T/A     | 31,5 |
|                      |              |                      |      | -34A/A     | 2,4  |



### **5.3 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA FIBROSIS CARDIACA EN PACIENTES CON MCH.**

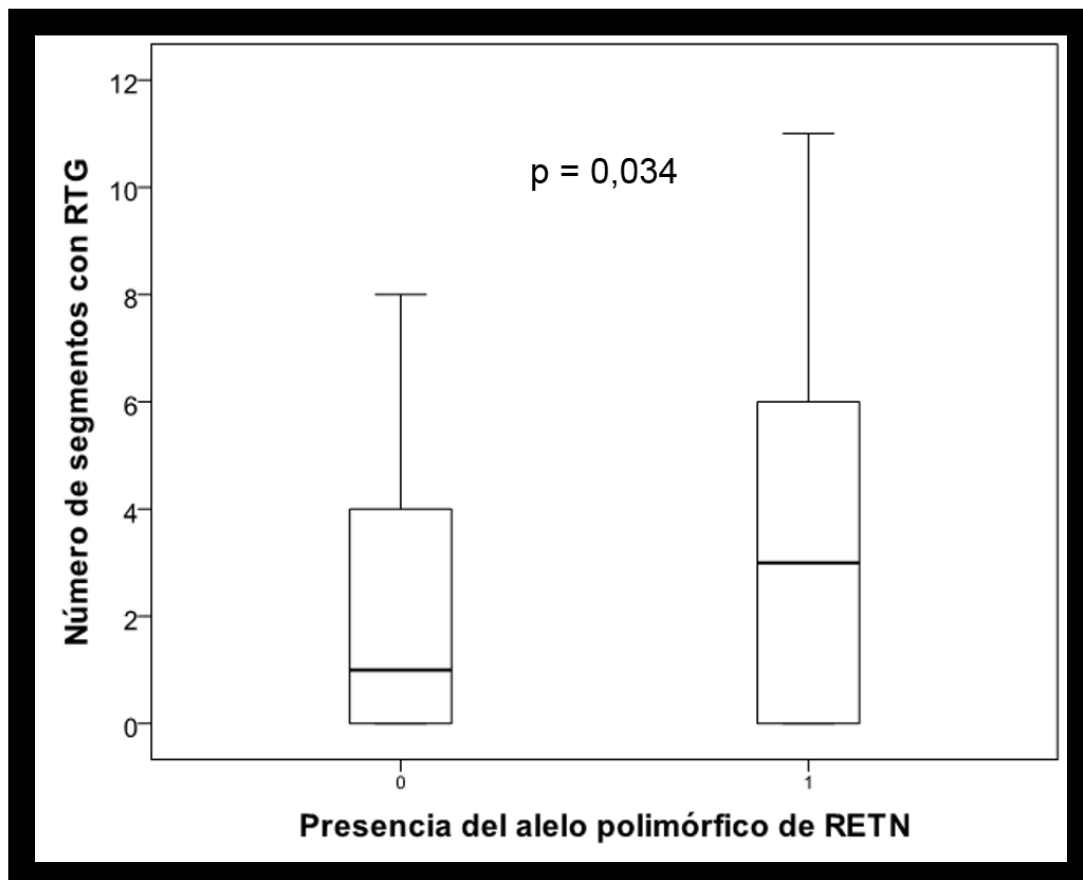
#### **5.3.1 Asociación de los polimorfismos con el grado de fibrosis miocárdica mediante resonancia magnética cardiaca utilizando RTG.**

En la búsqueda de predictores del número de segmentos con RTG en el análisis univariante, se realizó un análisis de regresión lineal con variables demográficas, clínicas y ecocardiográficas. En este análisis solamente la edad mostró un valor de  $p$  cercano a la significación ( $p: 0,080$ ) por lo que fue incluido en el análisis multivariante posterior (Tabla 5.7).

**TABLA 5.7 ANALISIS DE REGRESIÓN: VARIABLES CLÍNICAS Y RTG.**

| Variable                      | Univariante              |       |
|-------------------------------|--------------------------|-------|
|                               | R <sup>2</sup> corregido | p     |
| Edad                          | 0,015                    | 0,080 |
| Sexo                          | 0,004                    | 0,218 |
| FA previa                     | -0,007                   | 0,980 |
| Gradiente subaórtico >30 mmHg | 0,001                    | 0,282 |
| Respuesta anormal de la TA    | -0,007                   | 0,786 |
| FEVI (%)                      | -0,007                   | 0,840 |

Se procedió del mismo modo con los 9 polimorfismos. La presencia del polimorfismo RETN -420C>G se asociaba con un incremento del número de segmentos con RTG en la RMC ( $p=0,034$ ) y por tanto con el incremento en la fibrosis cardiaca (Figura 13). No se apreció esta asociación con el RTG con ninguno de los otros polimorfismos mediante el mismo análisis (Tabla 5.8).



**Figura 13:** Número de segmentos con RTG en función de la presencia del polimorfismo RETN -420C>G. 0, ausencia (genotipo -420C/C); 1, presencia (genotipo -420G/-).

**TABLA 5.8 ANÁLISIS DE REGRESIÓN: POLIMORFISMOS Y RTG.**

| GEN                           | Polimorfismo      | Univariante              |              |
|-------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------|
|                               |                   | R <sup>2</sup> corregido | p            |
| ACE                           | D/I               | -0,003                   | 0,444        |
| AGTR1                         | 1166A>C           | -0,003                   | 0,457        |
| CYP11B2                       | -344C>T           | 0,006                    | 0,759        |
| COL1A1                        | 2046G>T           | -0,007                   | 0,818        |
| <b>RETN</b>                   | <b>-420C&gt;G</b> | <b>0,024</b>             | <b>0,034</b> |
| ADRB1                         | 1165G>C           | 0,005                    | 0,198        |
| PPARGC1A<br>(PGC-1 $\alpha$ ) | 1444G>A           | -0,007                   | 0,993        |
| NOS3<br>(eNOS)                | 894T>G            | -0,007                   | 0,838        |
| CALM3                         | -34T>A            | -0,007                   | 0,955        |

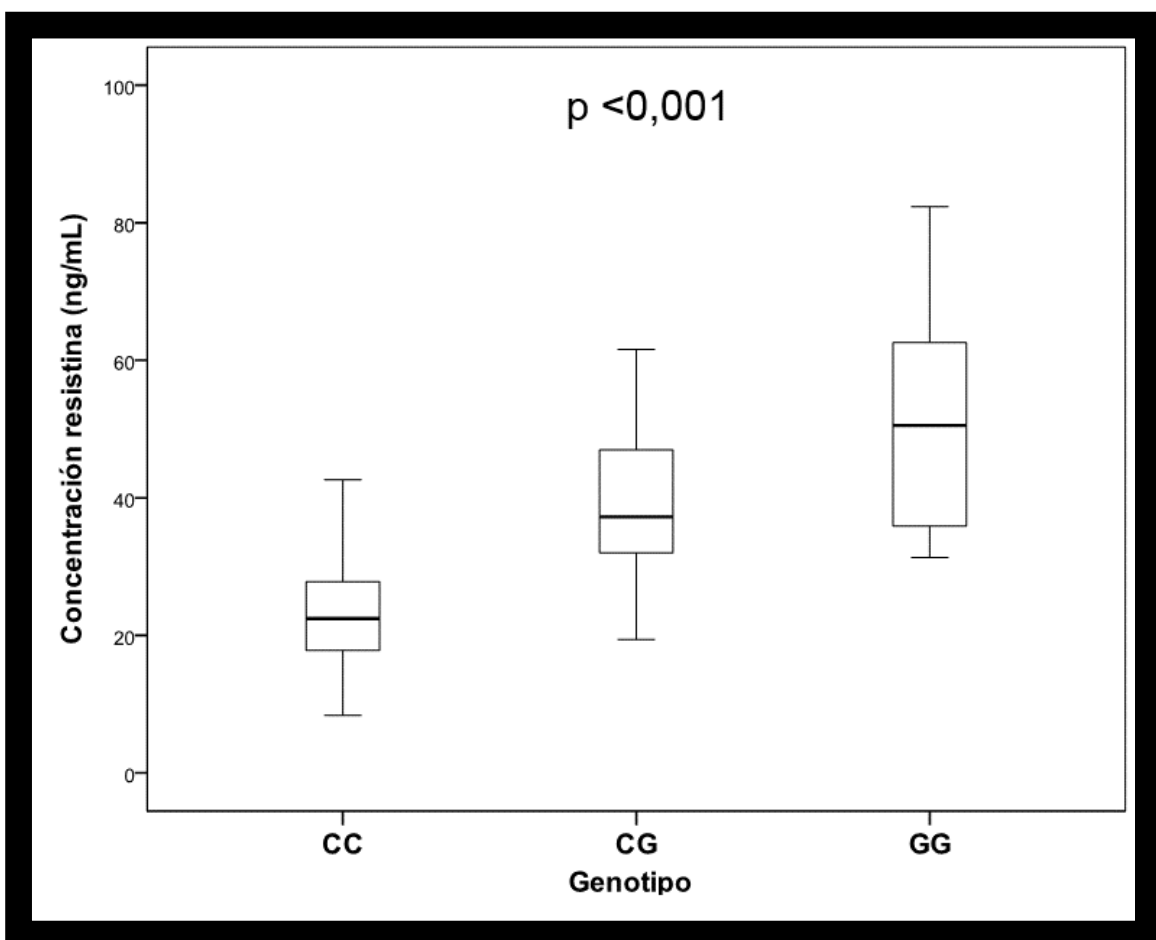
Solamente la presencia del polimorfismo RETN -420C>G se mantuvo como predictor independiente del número de segmentos con RTG en el análisis multivariante mientras que la edad no alcanzó la significación estadística en esta asociación (Tabla 5.9). Tras excluir a los pacientes con DM o HTA, que podrían actuar como factores de confusión, la asociación era más fuerte (R<sup>2</sup> corregido = 0,085; p = 0,008) y la edad se alejó de la significación estadística (p = 0,148).

**TABLA 5.9 ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIVARIADO: RTG.**

| Variable               | Multivariante            |              |
|------------------------|--------------------------|--------------|
|                        | R <sup>2</sup> corregido | p            |
| Edad                   |                          | 0,067        |
| <b>RETN -420C&gt;G</b> | <b>0,031</b>             | <b>0,038</b> |

### 5.3.1.1 Valores de resistina y polimorfismo RETN -420C>G

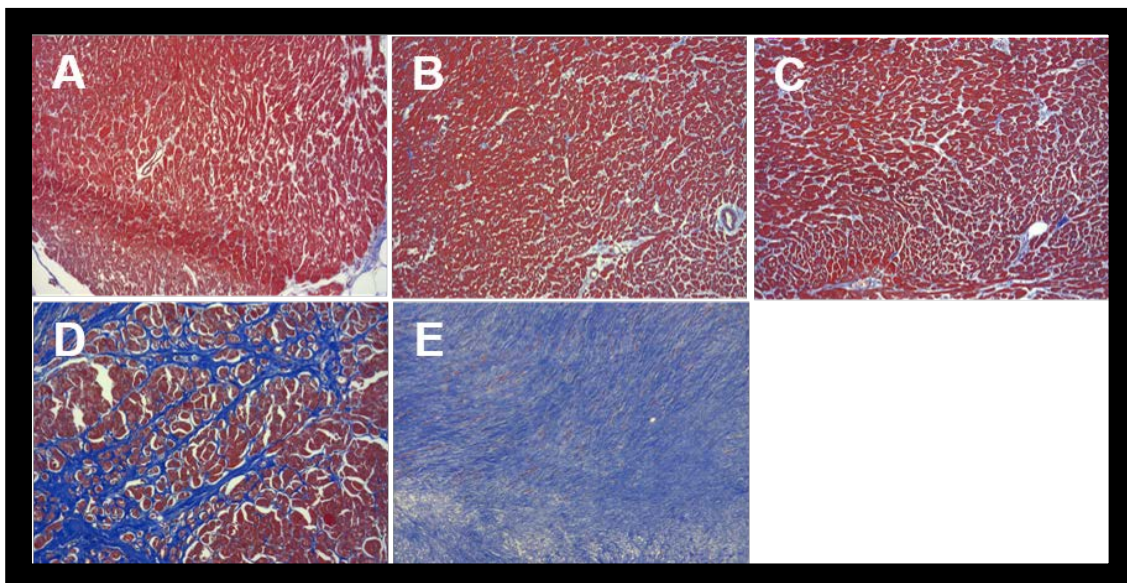
Llevamos a cabo una prueba de ELISA para determinar los valores circulantes de resistina en 159 pacientes con MCH ( $50,5 \pm 14,9$  años, 71.1% varones). Y se pudo observar como los portadores del polimorfismo RETN -420G presentaban un aumento en la concentración de resistina circulante ( $p < 0,001$ ) (Figura 14).



**Figura 14:** Concentración de resistina en función de la presencia del polimorfismo RETN -420C>G. CC, genotipo -420C/C; CG, genotipo -420C/G; GG: genotipo -420G/G.

### 5.3.2 Implicación de los polimorfismos en el grado de fibrosis miocárdica en tejidos miocárdicos de pacientes con MCH obtenidos por miectomía.

Se obtuvieron 46 muestras de tejido miocárdico procedentes de miectomía septal aislada. Al evaluar la fibrosis miocárdica mediante tinción tricrómica de Masson se pudo observar como 28 (60,9%) de las muestras presentaban una fibrosis ligera o moderada (escala cualitativa 0, 1 ó 2) frente a 18 (39,1%) muestras en las que la fibrosis era severa o muy severa (escala 3 ó 4) (Figura 15). Todas las muestras fueron genotipadas para la presencia de los polimorfismos. En cuanto al genotipo RETN encontramos 18 (39,1%) con genotipo -420C/C, 16 (34,8%) con genotipo -420C/G y 12 (26,1%) con genotipo -420G/G. La asociación entre el polimorfismo -420C>G del gen RETN y la fibrosis intersticial en el tejido miocárdico fue estadísticamente significativa [Coeficiente B: 0,488 (IC 95% 0,015-0,962), p: 0,044], el resto de polimorfismos no presentó esta asociación (Tabla 5.10).



**Figura 15:** Grado de infiltración de tejido conectivo (100x). A: negativa, 0; B: ligera, 1; C: moderada, 2; D: severa, 3; E: muy severa, 4.

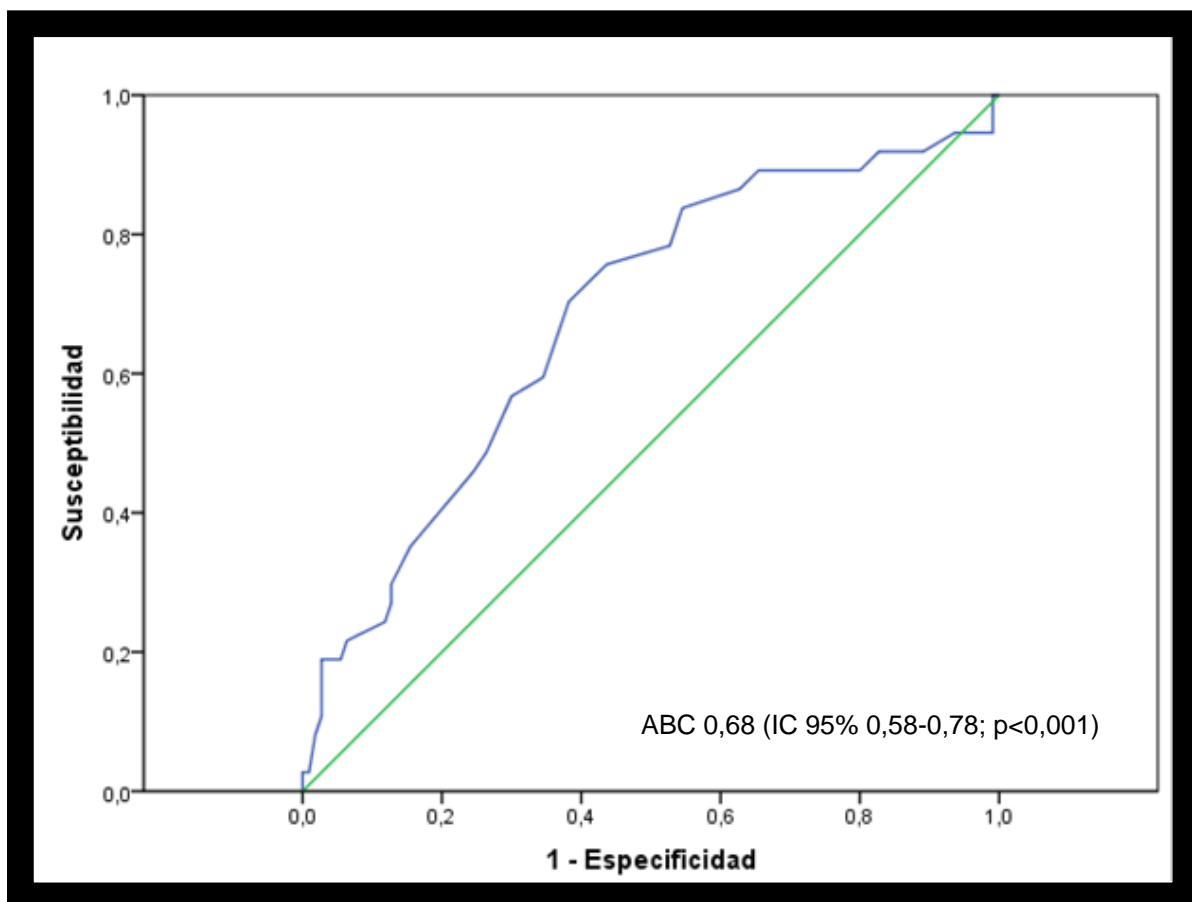
**TABLA 5.10 ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS Y LA FIBROSIS MIOCÁRDICA EN MUESTRAS PROCEDENTES DE MIECTOMÍA.**

|                            | Modelo          | Coeficientes no estandarizados |       | Coeficientes estandarizados |        |              | Intervalo de confianza 95% |                 |
|----------------------------|-----------------|--------------------------------|-------|-----------------------------|--------|--------------|----------------------------|-----------------|
|                            |                 | B                              | DE    | $\beta$                     | t      | p-valor      | Límite inferior            | Límite superior |
| ACE                        | Fibrosis severa | -0,034                         | 0,142 | -0,035                      | -0,238 | 0,813        | -0,319                     | 0,252           |
|                            | Constante       | 2,354                          | 0,342 |                             | 6,876  | 0,000        | 1,665                      | 3,044           |
| AGTR1                      | Fibrosis severa | 0,063                          | 0,165 | 0,057                       | 0,379  | 0,706        | -0,269                     | 0,394           |
|                            | Constante       | 2,188                          | 0,273 |                             | 8,025  | 0,000        | 1,638                      | 2,737           |
| CYP11B2                    | Fibrosis severa | 0,040                          | 0,136 | 0,044                       | 0,295  | 0,769        | -0,233                     | 0,313           |
|                            | Constante       | 2,200                          | 0,300 |                             | 7,340  | 0,000        | 1,596                      | 2,804           |
| COL1A1                     | Fibrosis severa | 0,357                          | 0,232 | 0,226                       | 1,535  | 0,132        | -0,111                     | 0,825           |
|                            | Constante       | 1,825                          | 0,316 |                             | 5,780  | 0,000        | 1,189                      | 2,462           |
| RETN                       | Fibrosis severa | 0,488                          | 0,235 | 0,299                       | 2,078  | <b>0,044</b> | 0,015                      | 0,962           |
|                            | Constante       | 1,679                          | 0,147 |                             | 11,422 | 0,000        | 1,382                      | 1,975           |
| ADRB1                      | Fibrosis severa | 0,189                          | 0,137 | 0,203                       | 1,374  | 0,176        | -0,088                     | 0,465           |
|                            | Constante       | 1,979                          | 0,245 |                             | 8,089  | 0,000        | 1,486                      | 2,472           |
| PPARGC1A (PGC-1 $\alpha$ ) | Fibrosis severa | 0,243                          | 0,183 | 0,196                       | 1,327  | 0,191        | -0,126                     | 0,612           |
|                            | Constante       | 1,829                          | 0,358 |                             | 5,108  | 0,000        | 1,107                      | 2,550           |
| NOS3 (eNOS)                | Fibrosis severa | 0,263                          | 0,177 | 0,219                       | 1,487  | 0,144        | -0,094                     | 0,620           |
|                            | Constante       | 1,842                          | 0,314 |                             | 5,861  | 0,000        | 1,209                      | 2,476           |
| CALM3                      | Fibrosis severa | 0,012                          | 0,182 | 0,010                       | 0,067  | 0,947        | -0,355                     | 0,380           |
|                            | Constante       | 2,259                          | 0,284 |                             | 7,948  | 0,000        | 1,686                      | 2,831           |

#### **5.4. EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA INCIDENCIA DE FA EN PACIENTES CON MCH.**

Durante el seguimiento 39 (24,4%) pacientes desarrollaron una FA. Lo que supuso una tasa anual del 9,75%/año.

Se calculó el área bajo la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) del diámetro de la AI para el desarrollo de FA (Figura 16).



**Figura 16:** Curva ROC del diámetro de la AI para la predicción de desarrollo de FA.

Se realizó un análisis de regresión de Cox univariante que incluyó potenciales predictores clínicos de desarrollo de FA (Tabla 5.11). El antecedente de FA previa [HR:

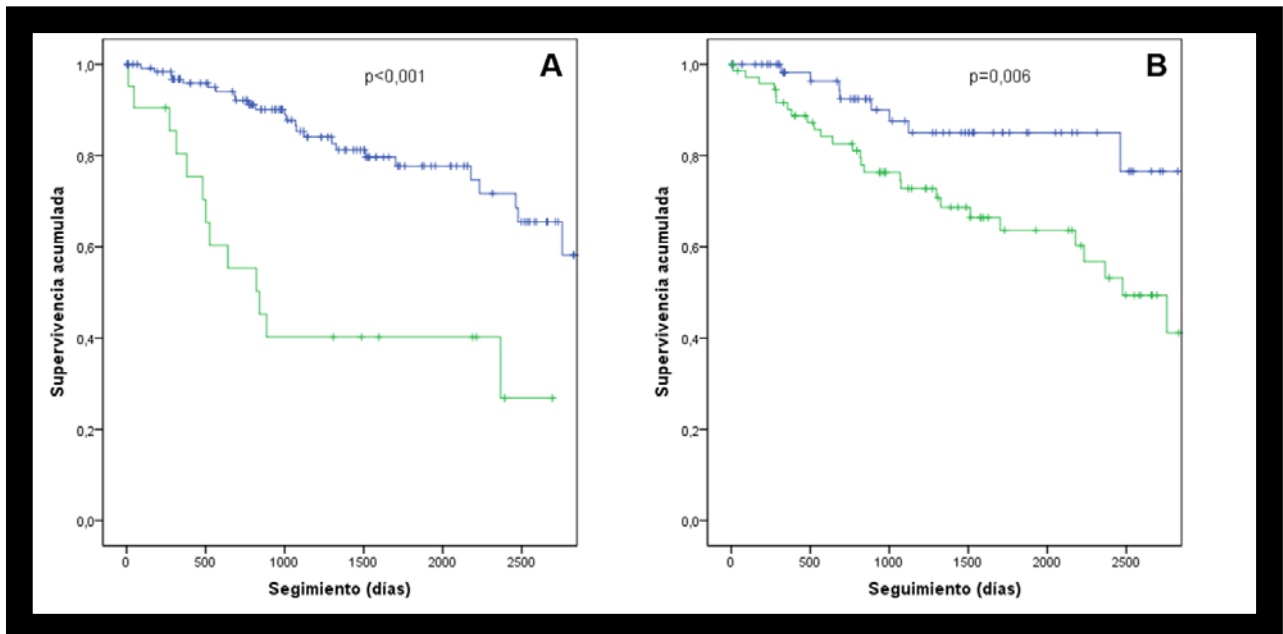
4,41 (IC 95% 2,22-8,67);  $p < 0,001$ ], un diámetro de la AI  $\geq 42$  mm [HR: 2,89 (IC 95% 1,31-6,34);  $p = 0,008$ ] y la edad [HR: 1,03 (IC 95% 1,00-1,05);  $p = 0,030$ ] se asociaron significativamente con el desarrollo de FA. Sin embargo, la presencia de RTG, el sexo o los fármacos empleados no se asociaron con el desarrollo de FA.

**TABLA 5.11 ANÁLISIS DE REGRESIÓN: VARIABLES CLÍNICAS Y FA.**

| Variable                                  | Univariante             |                  |
|---|-------------------------|------------------|
|   | HR (IC 95%)             | p                |
| <b>Edad</b>                               | <b>1,03 (1,00-1,05)</b> | <b>0,030</b>     |
| Sexo                                      | 1,18 (0,58-2,39)        | 0,642            |
| <b>FA previa</b>                          | <b>4,41 (2,22-8,67)</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Diámetro AI <math>\geq 42</math>mm</b> | <b>2,89 (1,31-6,34)</b> | <b>0,006</b>     |
| RTG                                       | 1,01 (0,92-1,12)        | 0,785            |
| DM  | 0,83 (0,25-2,73)        | 0,752            |
| HTA                                       | 1,54 (0,79-2,98)        | 0,199            |
| TVNS                                      | 0,99 (0,51-1,92)        | 0,982            |
| Respuesta anormal de la TA                | 0,81 (0,40-1,64)        | 0,550            |
| Máximo grosor ventricular                 | 1,02 (0,95-1,09)        | 0,617            |
| FEVI (%)                                  | 0,98 (0,95-1,01)        | 0,164            |
| Gradiente subaórtico $>30$ mmHg           | 0,96 (0,50-1,85)        | 0,902            |
| IECA                                      | 1,08 (0,33-3,53)        | 0,903            |
| ARAI                                      | 0,42 (0,09-1,93)        | 0,266            |
| Disopiramida                              | 0,29 (0,04-2,34)        | 0,244            |
| Beta-bloqueantes                          | 1,59 (0,78-3,28)        | 0,209            |



En el análisis univariante se elaboraron curvas de supervivencia acumulada (Kaplan-Meier) que mostraron que la presencia de FA previa y un diámetro de la AI  $\geq 42$  mm se asociaban con el desarrollo de FA (Log rank  $p < 0,001$  y  $p = 0,006$ , respectivamente) (Figura 17).



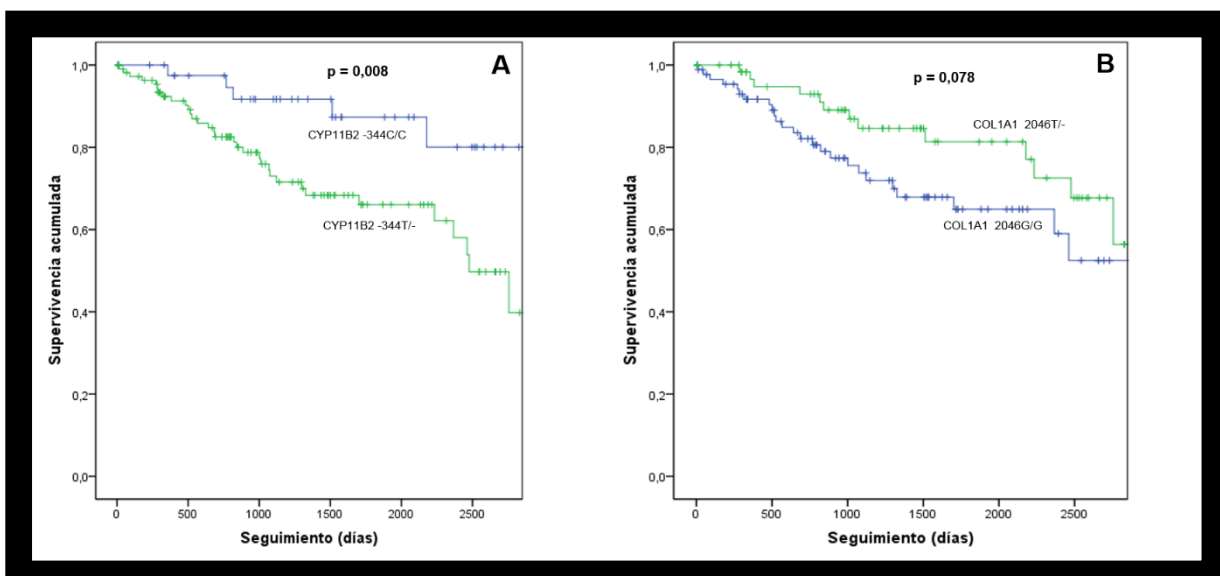
**Figura 17:** A, curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la presencia (verde) o ausencia (azul) de FA previa. B, curvas de supervivencia en función de la presencia (verde) o ausencia (azul) de un diámetro de la AI  $\geq 42$  mm.

El análisis univariante (regresión de Cox) que incluyó los 9 polimorfismos (Tabla 5.12) mostró como la presencia de un polimorfismo en la región promotora del gen CYP11B2 (-344C>T) se asociaba con un mayor riesgo de desarrollo de FA en estos pacientes con MCH [HR: 3,31 (IC 95% 1,29-8,50);  $p = 0,008$ ]. La presencia del polimorfismo COL1A1 (2046G>T) mostró una tendencia no significativa hacia un menor riesgo de desarrollo de FA [HR: 0,55 (IC 95% 0,28-1,08);  $p = 0,078$ ]. Estos polimorfismos no se asociaron con el diámetro de la AI: CYP11B2 (-344C>T) 0,83 (0,40-1,73)  $p = 0,625$  y COL1A1 (2046G>T) OR: 1,75 (0,90-3,39)  $p = 0,100$ .

**TABLA 5.12 ANÁLISIS DE REGRESIÓN: POLIMORFISMOS Y FA.**

| GEN                           | Polimorfismo      | Univariante             |              |
|-------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------|
|                               |                   | HR (95% IC)             | p            |
| ACE                           | D/I               | 0,92 (0,58-1,45)        | 0,713        |
| AGTR1                         | 1166A>C           | 0,65 (0,38-1,10)        | 0,649        |
| <b>CYP11B2</b>                | <b>-344C&gt;T</b> | <b>3,31 (1,29-8,50)</b> | <b>0,008</b> |
| COL1A1                        | 2046G>T           | 0,55 (0,28-1,08)        | 0,078        |
| RETN                          | -420C>G           | 1,09 (0,65-1,81)        | 0,749        |
| ADRB1                         | 1165G>C           | 0,84 (0,52-1,33)        | 0,835        |
| PPARGC1A<br>(PGC-1 $\alpha$ ) | 1444G>A           | 0,80 (0,48-1,32)        | 0,382        |
| NOS3<br>(eNOS)                | 894T>G            | 0,82 (0,54-1,25)        | 0,356        |
| CALM3                         | -34T>A            | 1,281 (0,759-2,162)     | 0,353        |

Las curvas de supervivencia acumulada (Kaplan-Meier) pusieron en evidencia que el polimorfismo de CYP11B2 (-344C>T) se asociaba con el desarrollo de FA y que el polimorfismo del gen COL1A1 (2046G>T) presentaba una tendencia (Figura 18).



**Figura 18:** A, curvas de supervivencia en función de la presencia (verde) o ausencia (azul) del polimorfismo CYP11B2 -344T. B, curvas de supervivencia en función de la presencia (verde) o ausencia (azul) del polimorfismo COL1A1 2046T.

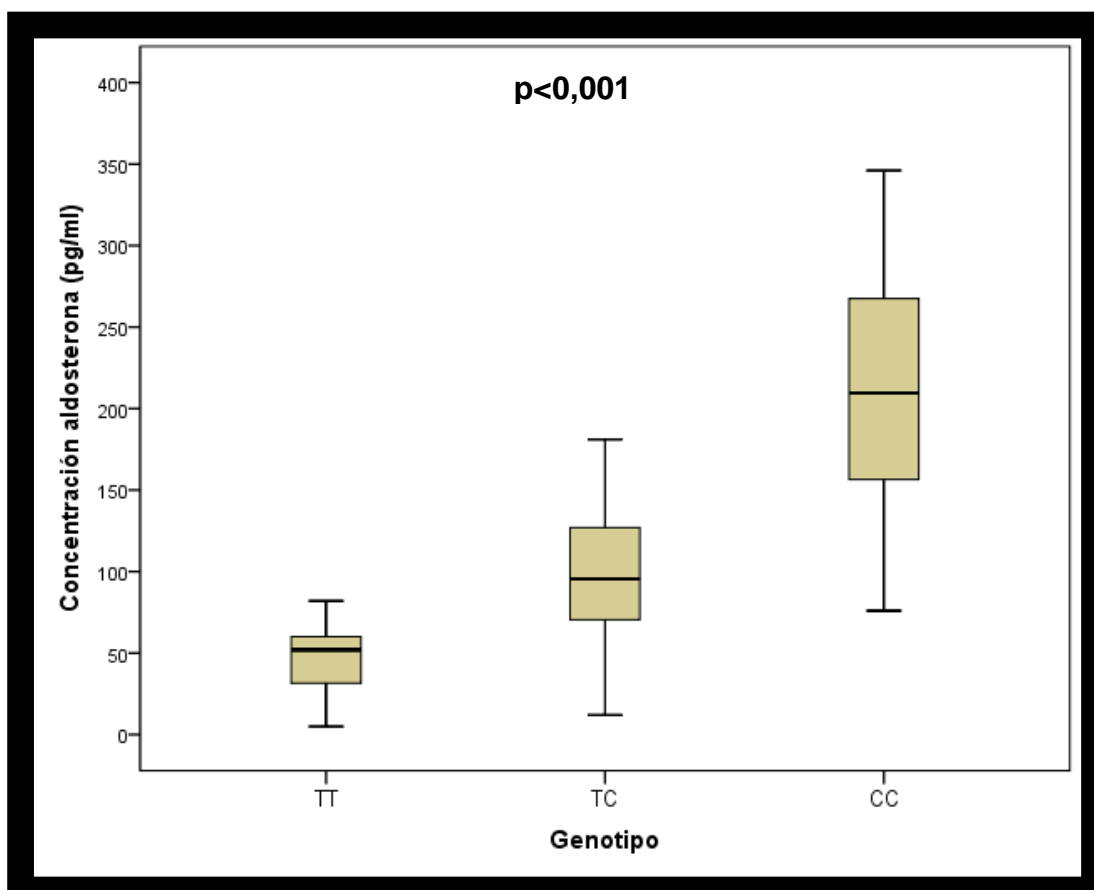
En el análisis multivariante la presencia del polimorfismo en la región promotora del gen CYP11B2 (-344T>C), el antecedente de FA previa y el diámetro de la AI  $\geq 42$  mm continuaron siendo predictores independientes del desarrollo de la FA. Mientras que la edad y el polimorfismo COL1A1 (2046G>T) perdieron significación (Tabla 5.13).

**TABLA 5.13 ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIVARIADO: DESARROLLO DE FA.**

| Variable                                  | Multivariante                  |              |
|---|--------------------------------|--------------|
|   | HR (IC 95%)                    | p            |
| Edad                                      | 1,01 (IC 95% 0,97-1,03)        | 0,832        |
| <b>FA previa</b>                          | <b>2,81 (IC 95% 1,09-7,23)</b> | <b>0,033</b> |
| <b>Diámetro AI <math>\geq 42</math>mm</b> | <b>2,69 (IC 95% 1,01-7,18)</b> | <b>0,048</b> |
| <b>CYP11B2 (-344C&gt;T)</b>               | <b>3,02 (IC 95% 1,01-8,99)</b> | <b>0,047</b> |
| COL1A1 (2046G>T)                          | 0,61 (IC 95% 0,28-1,34)        | 0,219        |

#### 5.4.1 Niveles de aldosterona y el polimorfismo CYP11B2 (-344T>C)

Se realizó una determinación de los niveles de aldosterona en 159 pacientes con MCH (72,5% varones, edad media  $49,8 \pm 15,3$ ). Los pacientes portadores del genotipo silvestre CYP11B2 -344T/T presentaban una concentración mediana de aldosterona de 52 pg/mL (RIC 31-60), menor que la de los portadores de un alelo polimórfico CYP11B2 -344T/C que presentaban una mediana de 95,5 pg/mL (RIC 70,2-127,5) y que la de los pacientes portadores de dos alelos CYP11B2 -344C/C de 209.5 pg/mL (RIC 155,7-268,7). La prueba de Kruskal-Wallis confirmó que los niveles de aldosterona se asociaban significativamente con la presencia del alelo polimórfico CYP11B2 -344C (Figura 19).



**Figura 19:** Concentración de aldosterona en función de la presencia del polimorfismo CYP11B2 -344T>C. TT, genotipo -344T/T; TC, genotipo -344T/C; CC: genotipo -344C/C.

## **5.5 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA INCIDENCIA DE INGRESO HOSPITALARIO URGENTE EN PACIENTES CON MCH.**

Durante el seguimiento 36 (21,4%) pacientes tuvieron que ser hospitalizados de forma urgente (Tabla 5.14): 5 (13,9%) por insuficiencia cardiaca, 10 (27,8%) por arritmias auriculares, 3 (8,3%) por arritmias ventriculares, 8 (22,2%) por isquemia miocárdica, 5 (13,9%) por ictus y 5 (13,9%) por otros motivos (uno por síncope, uno por palpitaciones y 3 por causas no cardiovasculares). La tasa de hospitalización fue de 8,75% por año. No hubo episodios de MS durante el seguimiento en nuestros pacientes, si bien se registraron dos episodios de descarga apropiada del DAI.

De los 8 ingresos por isquemia miocárdica, 5 pacientes tenían coronarias sin lesiones en la angiografía, un paciente presentó un claro desencadenante hemodinámico y otro presentó angina en el contexto de dolor por trombosis mesentérica. En uno de los pacientes que se presentó con angina y *shock* cardiogénico, no se pudo realizar una coronariografía debido a la adopción de una actitud conservadora.

**TABLA 5.14 INGRESOS HOSPITALARIOS URGENTES DURANTE EL SEGUIMIENTO.**

| Causa                   | Pacientes, n (%) | Tasa anual (%/año) |
|-------------------------|------------------|--------------------|
| Insuficiencia cardiaca  | 5 (13,9)         | 1,21               |
| Arritmias auriculares   | 10 (27,8)        | 2,42               |
| Arritmias ventriculares | 3 (8,3)          | 0,72               |
| Isquemia miocárdica     | 8 (22,2)         | 1,94               |
| Ictus                   | 5 (13,9)         | 1,21               |
| Otras causas            | 5 (13,9)         | 1,21               |
| Total                   | 36               | 8,71               |

El análisis de supervivencia (regresión de Cox) mostró que tanto la edad [HR: 1.03 (IC 95% 1.00-1.06); p=0.023] como el sexo masculino [HR: 2.31 (IC 95% 1.97-4.47); p=0.013] se asociaban a la hospitalización urgente (Tabla 5.15).

**TABLA 5.15 ANÁLISIS DE REGRESIÓN: VARIABLES CLÍNICAS E INGRESO HOSPITALARIO URGENTE.**

| Variable                      | Univariante             |              |
|-------------------------------|-------------------------|--------------|
|                               | HR (IC 95%)             | p            |
| <b>Edad</b>                   | <b>1,03 (1,00-1,06)</b> | <b>0,023</b> |
| <b>Sexo</b>                   | <b>2,31 (1,97-4,47)</b> | <b>0,013</b> |
| FA previa                     | 1,81 (0,85-3,86)        | 0,122        |
| HTA                           | 1,56 (0,72-3,35)        | 0,259        |
| DM                            | 0,70 (0,15-3,36)        | 0,656        |
| Enfermedad arterial coronaria | 1,62 (0,76-3,46)        | 0,212        |
| Gradiente subaórtico >30 mmHg | 1,03 (0,52-2,07)        | 0,925        |
| RTG                           | 0,96 (0,86-1,07)        | 0,487        |
| NYHA                          | 1,50 (0,84-2,68)        | 0,173        |
| FEVI (%)                      | 0,97 (0,93-1,01)        | 0,207        |
| Respuesta anormal de la TA    | 1,76 (0,79-3,92)        | 0,168        |
| IECA                          | 0,46 (0,10-2,11)        | 0,319        |
| ARAII                         | 1,58 (0,52-4,83)        | 0,423        |
| Disopiramida                  | 0,75 (0,20-2,76)        | 0,667        |
| Amiodarona                    | 1,56 (0,72-3,40)        | 0,261        |
| Beta-bloqueantes              | 1,74 (0,79-3,83)        | 0,172        |

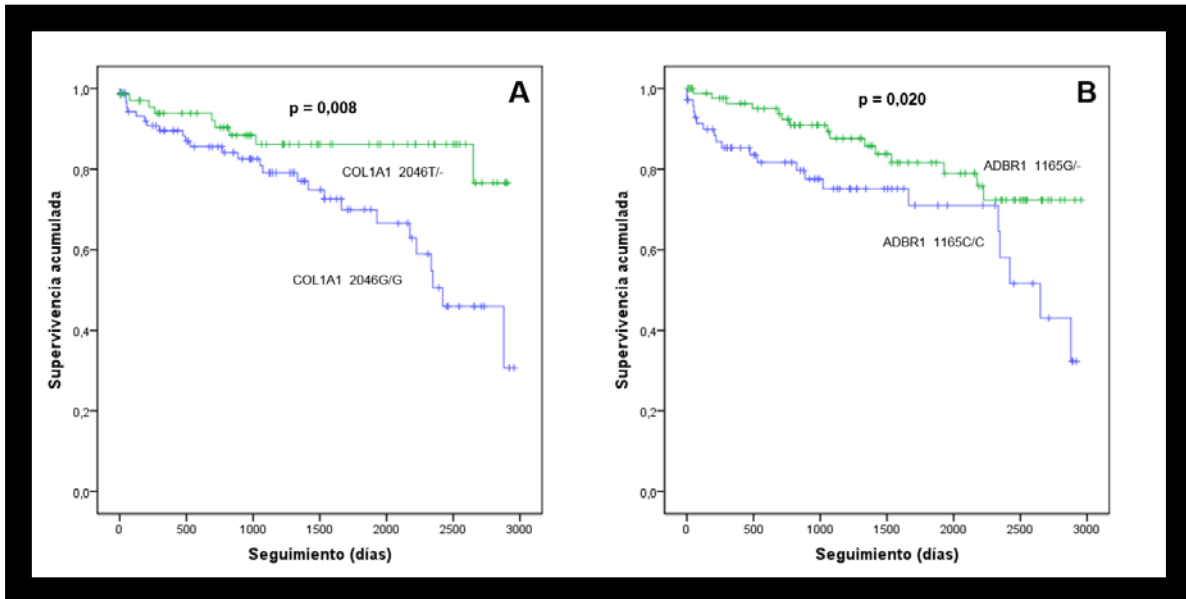
El estudio univariante (regresión de Cox) de los 9 polimorfismos identificó a la ausencia del polimorfismo del gen COL1A1, esto es, genotipo COL1A1 2046G/G, como un factor asociado a la hospitalización urgente [HR: 2,67 (IC 95% 1,25-5,68); p=0,011].

Del mismo modo, los portadores homocigotos del polimorfismo de ADRB1, genotipo ADRB1 1165C/C, presentaban un mayor riesgo de ingreso hospitalario [HR: 2,16 (1,11-4,21); p=0,024]. El resto de polimorfismos estudiados no mostraron esta asociación, Tabla 5.16.

**TABLA 5.16 ANÁLISIS DE REGRESIÓN: POLIMORFISMOS E INGRESO HOSPITALARIO URGENTE.**

| GEN                        | Polimorfismo   | Univariante             |              |
|----------------------------|----------------|-------------------------|--------------|
|                            |                | HR (IC 95%)             | p            |
| ACE                        | D/I            | 0,79 (0,48-1,30)        | 0,354        |
| AGTR1                      | 1166A>C        | 0,78 (0,46-1,33)        | 0,361        |
| CYP11B2                    | -344C>T        | 0,92 (0,58-1,46)        | 0,721        |
| <b>COL1A1</b>              | <b>2046G/G</b> | <b>2,67 (1,25-5,68)</b> | <b>0,011</b> |
| RETN                       | -420C>G        | 1,09 (0,66-1,81)        | 0,736        |
| <b>ADRB1</b>               | <b>1165C/C</b> | <b>2,16 (1,11-4,21)</b> | <b>0,024</b> |
| PPARGC1A (PGC-1 $\alpha$ ) | 1444G>A        | 1,19 (0,73-1,94)        | 0,494        |
| NOS3 (eNOS)                | 894T>G         | 1,01 (0,69-1,49)        | 0,967        |
| CALM3                      | -34T>A         | 1,27 (0,71-2,27)        | 0,425        |

Tanto los no portadores del polimorfismo del gen COL1A1 (genotipo 2046G/G) como los homocigotos para el polimorfismo del gen ADRB1 (genotipo 1165C/C) tuvieron una peor supervivencia libre de eventos en el seguimiento [Log rank p= 0,008 y 0,020, respectivamente], Figura 20.



**Figura 20:** A, curvas de supervivencia en función de la presencia (verde) o ausencia (azul) del polimorfismo COL1A1 2046T. B, curvas de supervivencia en función de la ausencia (verde) o presencia (azul) de homocigosis ADRB1 1165C.

En el análisis multivariado tanto la edad como la ausencia del polimorfismo del gen COL1A1 (genotipo 2046G/G) continuaron asociados de forma independiente con el ingreso hospitalario. Sin embargo, la homocigosis para el polimorfismo del gen ADRB1 (genotipo 1165C/C) no alcanzó por poco la significación estadística, como tampoco lo hicieron el sexo y la FA previa (Tabla 5.17).

**TABLA 5.17 ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIVARIADO: INGRESO URGENTE.**

| Variable                | Multivariante                  |              |
|-------------------------|--------------------------------|--------------|
|                         | HR (IC 95%)                    | p            |
| Edad                    | <b>1,03 (IC 95% 1,00-1,05)</b> | <b>0,047</b> |
| Sexo                    | 1,81 (0,88-3,71)               | 0,105        |
| FA previa               | 1,22 (0,53-2,78)               | 0,641        |
| ADRB1 (1165C/C)         | 1,98 (0,99-4,02)               | 0,057        |
| <b>COL1A1 (2046G/G)</b> | <b>2,76 (1,26-6,05)</b>        | <b>0,011</b> |



Como la DM ejerce una influencia en el reemplazo del colágeno en el cual está implicado el gen COL1A1 se analizó en mayor profundidad esta posible relación. La proporción de pacientes con DM en los grupos que ingresaron de forma urgente y los que no fueron similares (17,0% vs 22,2%, respectivamente;  $p = 0,654$ ). A pesar de ello, se realizó un nuevo análisis tras excluir a los pacientes diabéticos del análisis, la asociación entre el polimorfismo y la hospitalización urgente continuó siendo significativa [HR 3,76 (IC 95% 1,44-9,80)  $p=0,007$ ].

## **6. DISCUSIÓN**

## **6.1 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA FIBROSIS CARDIACA EN PACIENTES CON MCH.**

La fibrosis intersticial es una de las principales características microscópicas de la MCH. La RMC permite la caracterización tisular mediante el RTG y de este modo permite el estudio *in vivo* de la fibrosis miocárdica. Esta fibrosis se produce por expansión de la matriz extracelular por aumento de las fibras de colágeno tipo I y III (177).

Se conoce que en la MCH existe un aumento del recambio del colágeno tipo I y que predomina su síntesis frente a su degradación. En este sentido se ha descrito alteraciones en las metaloproteinasas de la matriz (MMP, *matrix metalloproteinase*), una familia de proteinasas dependientes de zinc que participan en la degradación de distintos componentes de la matriz extracelular. Así, nuestro grupo describió como en pacientes con MCH la concentración de MMP-1 se encuentran disminuida (indetectables en más del 50% de los pacientes) y las de MMP-2 y MMP-9 se encuentran elevadas respecto a controles sanos, y además, los valores de MMP-9 se asociaban con la presencia de RTG en la RMC (213). Por otro lado, los valores del propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP), un marcador sérico de la síntesis de colágeno, se encuentran elevados en los pacientes con MCH (179). Y aún más, los pacientes portadores de una mutación en un gen sarcomérico asociada a MCH pero sin expresión detectable de la enfermedad con los actuales métodos diagnósticos (ecocardiografía, RMC, RTG) presentan valores intermedios de PICP entre pacientes con MCH evidente y controles sanos (228). Lo que refuerza la importancia de la fibrosis aún en fases iniciales de la enfermedad.

La detección de esta fibrosis intersticial mediante el RTG tiene implicaciones importantes ya que se asocia con una peor capacidad funcional de estos pacientes, medida en la ergometría (85), con la presencia de episodios de TVNS en el holter-ECG, con un mayor grosor ventricular y con la agrupación de factores de MS (86). Por otro lado, se asocia con la identificación de mutaciones en genes sarcoméricos (229) en los análisis genéticos. Y a medida que los seguimientos de las cohortes han sido más largos, se ha podido relacionar con una mayor incidencia de eventos adversos en el seguimiento (230) y con una mayor mortalidad por todas las causas y por causas cardiovasculares (231).

En el presente trabajo se ha podido demostrar cómo el polimorfismo en la región promotora de gen RETN (-420C>G) se asocia con la fibrosis cardiaca valorada mediante el aumento del número de segmentos con RTG en la RMC, después de ajustar por potenciales factores de confusión. Es más, esta asociación era aún más fuerte tras retirar del análisis a los pacientes con HTA o DM que actuaban como factores de confusión.

Previamente este polimorfismo se ha asociado con la obesidad, la sensibilidad a la insulina, el síndrome metabólico y la DM tipo 2 en poblaciones asiáticas (189,190,232,233), egipcios (234) e italianos (235). Su papel en la patogénesis de la arteriosclerosis también está siendo investigado. Así, el polimorfismo del gen RETN (-420C>G) se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria en población china (236) pero no se ha asociado con aterosclerosis carotídea ni coronaria en poblaciones europea y caucásica (235,237).

Otros grupos habían demostrado que el polimorfismo del gen RETN (-420C>G) se asocia con valores elevados de ARNm de resistina (190,238). En el presente estudio

se puede apreciar cómo este polimorfismo se asocia a los valores de resistina circulante. Así, los individuos portadores del alelo RETN -420G presentaban una concentración circulante de resistina proporcional al número de alelos polimórficos que poseían. Estos hallazgos se han identificado también (con aumento de los niveles de ARNm) en poblaciones de asiáticos (190,232) y de americanos caucásicos (237), pero no en la cohorte del *Framingham Offspring Study* (239). Hasta el presente estudio no se había asociado previamente el polimorfismo del gen RETN (-420C>G) con la fibrosis miocárdica en la MCH. Se conocía que el polimorfismo se asocia con un mayor riesgo de MCH en un estudio de casos y controles (240), pero el mecanismo fisiopatológico que pueda justificarlo seguía sin estar dilucidado.

Estudios con cultivos de miocitos neonatales de ventrículos de rata que sobreexpresan RETN mediante transfección con adenovirus aportan datos atractivos. Esta sobreexpresión de RETN en cardiomiocitos neonatales producía un aumento significativo del tamaño celular, de la expresión de factor natriurético atrial y de la expresión de la cadena pesada de la beta-miosina. La sobreexpresión de resistina en cultivos de cardiomiocitos adultos alteraba de forma significativa la mecánica de éstos, disminuyendo la contractilidad y disminuyendo la velocidad de contracción y relajación de estos (191). Estos interesantes hallazgos en la fisiopatología todavía no se han validado en humanos.

Aunque se conoce poco sobre la fisiopatología de la resistina en la MCH podríamos formular la hipótesis de que el polimorfismo RETN -420G genere una mayor cantidad de ARNm y éste se traduzca en unos valores elevados de resistina circulante que favorezcan la fibrosis cardíaca, que es una de las principales características de la MCH.

Apoyando esta hipótesis se puede observar el hallazgo de una mayor fibrosis cardiaca en los portadores del alelo RETN -420G, no sólo en la RMC, sino también en las muestras obtenidas de las miectomías de pacientes con MCH.

El resto de polimorfismos estudiados, incluyendo los del SRAA, no se asociaron de forma significativa con la fibrosis miocárdica. Un estudio de la Clínica Mayo, que analizó la fibrosis miocárdica (con tinción tricrómica de Masson) en muestras de miectomía, realizadas entre enero de 2001 y diciembre de 2004, fue publicado en 2009. Incluyó 59 pacientes con MCH con una edad similar a la nuestra  $49 \pm 15$  y tampoco encontró asociación significativa entre los polimorfismos del SRAA y el grado de fibrosis (241). En otro estudio más amplio del mismo grupo, que incluyó muestras de miectomía de 181 pacientes entre 1999 y 2002 pudieron observar cómo la única característica microscópica que se asociaba de forma significativa con los polimorfismos del SRAA era la mayor severidad de la hipertrofia de los miocitos, sin objetivar asociación con el grado de fibrosis o *disarray*. Curiosamente, tras analizar la presencia o ausencia de mutaciones en 8 genes sarcoméricos, sólo pudieron asociar la presencia de mutaciones conocidas con la mayor severidad de la hipertrofia de los miocitos (173).

Se podría sugerir la hipótesis de que la hipertrofia (definida por ecocardiografía o RMC) asociada a los polimorfismos del SRAA se debe a un mayor efecto sobre la hipertrofia celular y la asociada al polimorfismo de RETN se debe a una mayor expansión de la matriz extracelular.

Otra posible explicación es que el efecto modulador del polimorfismo dependa o sea más manifiesto en función de la mutación sarcomérica causal. Apoyando esta hipótesis encontramos que el efecto de los polimorfismos del SRAA en general (138) y

en concreto del ACE D/I (150) parecen ser más marcados en pacientes portadores de mutaciones en el gen sarcomérico MYBPC3.

## **6.2 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA INCIDENCIA DE FA EN PACIENTES CON MCH.**

Se estima que la prevalencia de la FA en pacientes con MCH se encuentra en torno a un 22% y su incidencia anual en torno a un 3% (117). En la presente serie, partiendo de una prevalencia significativamente menor (13,1%) se observó una incidencia anual superior (9,75%).

El desarrollo de FA en estos pacientes tiene una gran trascendencia. Por un lado, se asocia con una elevada prevalencia (27,09%) e incidencia (3,75% anual) de eventos tromboembólicos. Por otro, deteriora su capacidad funcional, de modo que presentan una menor capacidad de ejercicio en la ergoespirometría y una mayor intolerancia al ejercicio, incluso aunque se encuentren en ritmo sinusal en el momento de la prueba (242). Y lo que es peor, aumenta la mortalidad con un aumento de muertes por insuficiencia cardíaca y muertes por ictus (58,111).

El SRAA parece jugar un importante papel en el desarrollo de la FA. Así, en un metaanálisis que incluyó 23 estudios aleatorizados y más de 87.000 pacientes (hipertensos, postinfarto de miocardio o con insuficiencia cardíaca) quedó patente el beneficio de la inhibición del SRAA en la prevención primaria y secundaria de la FA (243). Y de hecho, las actuales guías de práctica clínica europeas de FA dan opción al

bloqueo del SRAA para prevención de FA principalmente en presencia de cardiopatía estructural (106).

La aldosterona es la principal hormona mineralcorticoide y tiene un importante papel en la fibrosis y el remodelado cardiaco (244). La aldosterona induce directamente hipertrofia de los miocardiocitos a través de la activación de los receptores de mineralcorticoides que se encuentran en el núcleo y afecta a la expresión de genes específicos en el núcleo celular. La aldosterona se sintetiza principalmente en la corteza adrenal de las glándulas suprarrenales por la aldosterona sintetasa, CYP11B2. Pero también se produce en el corazón, especialmente en los pacientes con MCH que presentan una concentración de ARNm de aldosterona sintetasa 7 veces mayor frente a corazones procedentes de individuos sanos ajustados por edad y sexo (90). La aldosterona también parece desempeñar un papel en la estructura auricular y en el remodelado eléctrico mediante el aumento de la síntesis de colágeno y la apoptosis de miocardiocitos (245). El bloqueo del receptor de la aldosterona empleando espironolactona ha demostrado prevenir la aparición del FA en un modelo canino, así como disminuir la apoptosis, la fibrosis auricular y la dilatación auricular (246). En un estudio reciente, en un modelo murino de FA, la torasemida (pero no la furosemida) ejerció un efecto inhibitor sobre la CYP11B2 y se asoció con la prevención de la fibrosis auricular y el desarrollo de FA (247). Estos datos resaltan el importante papel que desempeña la aldosterona en la fibrosis y el desarrollo de FA y apuntan hacia una posible diana terapéutica en esta patología.

En el presente estudio se puede observar por primera vez cómo el polimorfismo de la región reguladora del gen de la aldosterona sintetasa, CYP11B2 -344C>T, es un predictor independiente del desarrollo de la FA en los pacientes con MCH. Este polimorfismo ha suscitado interés por su papel en el desarrollo de FA en los últimos



años, tanto en población general como en pacientes con distintas patologías cardiológicas. Así, se ha asociado al desarrollo de FA en población general e hipertensa asiática (248,249). En pacientes afroamericanos y caucásicos con insuficiencia cardiaca también se ha asociado con el desarrollo de FA (250,251).

En pacientes con MCH, un estudio previo que habían estudiado el efecto de polimorfismos del SRAA en parámetros morfofuncionales cardiacos de pacientes con MCH, no consiguió identificar la asociación entre el polimorfismo CYP11B2 -344C>T y el desarrollo de FA (252). Este estudio incluyó 55 pacientes (24 hombres y 31 mujeres) con una edad de  $46,3 \pm 11,6$  años. El bajo tamaño muestral pudo impedir la detección de un efecto significativo de este polimorfismo.

La posición -344 del gen CYP11B2 está inmediatamente adyacente a la zona de unión del factor de transcripción SF-1, que se piensa que posee un papel esencial en la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis esteroidea en la corteza adrenal (168). En estudios *in vitro* el alelo CYP11B2 -344C se une al SF-1 unas 4 veces más fuerte que el alelo -344T, esto parece afectar a la transcripción y se relaciona con el aumento en la producción y en la concentración de aldosterona que puede observarse en los pacientes portadores del alelo -344C (253,254).

En el presente estudio de investigación también se muestra cómo los valores de aldosterona aumentaban progresivamente en función del polimorfismo. De forma que los portadores de un alelo -344C presentaban un aumento cercano al 100% en los valores respecto a los pacientes sin este alelo, y los portadores de dos alelos -344C presentaban un aumento en torno al 200% en la concentración de aldosterona. Este aumento en la expresión del gen CYP11B2 inducido por el alelo -344C, puede causar un aumento en la concentración tisular de aldosterona, que dé lugar a un aumento en

la fibrosis auricular que es el adecuado sustrato para el desarrollo de la FA. Este remodelado estructural favorece la disociación eléctrica entre las bandas musculares y la heterogeneidad de conducción local que facilitan tanto la iniciación como la perpetuación de la FA.

No se observa una asociación estadísticamente significativa con el resto de los polimorfismos estudiados. Si bien, el polimorfismo COL1A1 2046G>T presentó una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, que le confería un papel protector ante el desarrollo de la FA en el seguimiento.

En el presente estudio se observa como el diámetro de la AI también se asociaba de forma independiente con el desarrollo de FA. Esto es congruente con otros estudios que han mostrado que el tamaño de la AI se asocia con el desarrollo de FA tanto en población general como en pacientes con MCH (5,106). El remodelado que acompaña a la dilatación de las aurículas proporciona un sustrato electroanatómico con múltiples y pequeños circuitos reentrantantes que estabilizan la FA. Sólo será necesaria una extrasístole en el momento adecuado, procedente de las venas pulmonares o de otros orígenes, para iniciar la FA.

También se encontró como episodios previos de FA favorecían el desarrollo de FA durante el seguimiento, como estaba previamente descrito en la literatura. La FA, *per se*, acorta la refractariedad de la aurícula y produce pérdida de su contractilidad. De este modo contribuye a modificar el sustrato electroanatómico que favorece la perpetuación de la arritmia (255).

### **6.3. EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA INCIDENCIA DE INGRESO HOSPITALARIO URGENTE EN PACIENTES CON MCH.**

Durante el seguimiento no se produjo ninguna muerte, sin embargo se registraron dos descargas apropiadas de DAI (0,49% al año). Esto concuerda con la percepción actual de la enfermedad que permite una expectativa de vida normal, con una baja mortalidad anual en pacientes adultos (0,5% al año) similar a la de mortalidad por todas las causas en población general (37). Sin embargo, la morbilidad no fue despreciable. Como en otras patologías, la edad fue un factor de riesgo independiente de eventos adversos que requirieron ingreso urgente.

Este es el primer estudio que muestra que el alelo polimórfico COL1A1 2046T es un factor predictor independiente de pronóstico más favorable en pacientes con MCH a través de una menor necesidad de ingreso hospitalario urgente.

Este polimorfismo afecta a una zona reguladora en el primer intrón del gen COL1A1 que es reconocida por el factor de transcripción Sp1 y constituye una importante zona en la regulación de la transcripción del colágeno. Este factor de transcripción Sp1 forma parte la familia de factores de transcripción Sp/KLF (specificity protein/Krüppel-like factor). Está formado por 785 aminoácidos y es capaz de unirse directamente al ADN y aumentar la transcripción de genes.

El efecto funcional del polimorfismo COL1A1 2046T da lugar a una mayor transcripción del gen y a una mayor cantidad de ARN mensajero (traducción). Y finalmente de una mayor cantidad de proteína colágeno I tipo  $\alpha 1$ . Es conocido que los individuos no portadores del polimorfismo (genotipo 2046G/G)

presentan dos proteínas  $\alpha 1$  por cada proteína  $\alpha 2$ , sin embargo los portadores del polimorfismo 2046G/T presentan una cantidad mayor de proteína  $\alpha 1$  (relación 2,3:1). Este exceso de cadenas  $\alpha 1$  de alguna manera interfiere en las cualidades biofísicas de las fibrillas de colágeno que genera una reducción del límite elástico (256).

El polimorfismo COL1A1 2046T produce una reducción en la fuerza de los huesos al afectar la densidad y la calidad del tejido como ha sido descrito previamente (256). De hecho, se ha asociado con una reducción de la mineralización ósea e incluso puede predisponer a fracturas vertebrales incidentales en mujeres independientemente de la densidad mineral ósea (257). Este polimorfismo también tiene implicaciones en otras estructuras-patologías donde las fibras de colágeno tienen un papel importante. Así a nivel musculoesquelético se asocia con patología de los tejidos blandos como la ruptura de los ligamentos cruzados, la dislocación de hombro (183) y el prolapso de órganos pélvicos en mujeres (184). A nivel de la patología cardiovascular, se ha propuesto que puede desempeñar un papel en la distensión arterial (185) y en el infarto de miocardio (186). Sin embargo, también se han presentado resultados que mostraron falta de estas asociaciones por lo que su efecto funcional es todavía controvertido.

La matriz extracelular es una estructura dinámica implicada en el control de numerosas funciones y juega un papel central en la adaptación miocárdica al estrés mediante la facilitación del remodelado (176). El aumento de la matriz extracelular lleva a la fibrosis intersticial mediante el aumento del colágeno tipo I y III (177). Estudios previos mostraron como el recambio del colágeno está aumentado en pacientes con MCH, en los que predomina la síntesis del colágeno tipo I frente a su degradación (178,213). Además, en un estudio previo, nuestro grupo investigó las implicaciones de péptidos del colágeno en el remodelado tisular y el pronóstico clínico (258). Encontramos que diferentes péptidos del colágeno I/III se asociaban con importantes

factores clínicos (síncope recurrente, historia de MS familiar, máximo grosor ventricular). Lo cual muestra la complejidad de los procesos que están implicados en la fisiopatología de la MCH.

De este modo COL1A1 (2046G>T), un polimorfismo que afecta al principal componente de la fibrosis intersticial y da lugar a cambios en sus propiedades biomecánicas y físicas y afecta a su recambio, podría explicar las diferencias en eventos clínicos que aprecia en la presente serie.

El resto de polimorfismos no mostró una asociación significativa con los ingresos urgentes en los pacientes con MCH. Aun así, el polimorfismo del gen ADRB1 (1165G>C) mostró una clara tendencia hacia un peor pronóstico en los pacientes portadores del polimorfismo ADRB1 1165G en homocigosis (genotipo 1165C/C).

El receptor adrenérgico  $\beta$ 1 es una proteína que se encuentra en la superficie celular del corazón y otros órganos y tiene un papel fundamental en mediar el efecto de las catecolaminas del sistema nervioso simpático. Su polimorfismo ADRB1 1165G se asocia con una actividad basal ligeramente elevada de la adenilato ciclasa, con un aumento de la sensibilidad a la estimulación y con una respuesta a la estimulación tres veces mayor en la actividad de la adenilato ciclasa (193).

La estimulación crónica del receptor adrenérgico  $\beta$ 1 lleva a la hipertrofia y a la insuficiencia cardiaca en ratones transgénicos que sobreexpresan este receptor (192). Curiosamente se ha publicado recientemente un modelo parecido de sobreexpresión de este receptor en humanos. Las hormonas tiroideas son un importante elemento regulador de la expresión del gen ADRB1 y de la densidad del receptor adrenérgico  $\beta$ 1 en el miocardio. Así, la expresión de su gen durante la tirotoxicosis se encuentra

considerablemente aumentada. Su polimorfismo ADBR1 1165G se ha relacionado recientemente con hipertrofia ventricular en humanos con tirotoxicosis (196).

En humanos, el polimorfismo ADRB1 1165G se ha relacionado con un aumento del riesgo de insuficiencia cardiaca congestiva (194) y con una mejor respuesta al tratamiento con betabloqueantes en pacientes con insuficiencia cardiaca (195). Esta variante genética podría explicar las diferencias en las características fisiopatológicas que confieren un mayor riesgo de HVI en HTA esencial (259), que es una característica común en la HTA y un poderoso factor de riesgo independiente de morbimortalidad cardiovascular. Además, este polimorfismo se ha asociado con el desarrollo de FA en pacientes con insuficiencia cardiaca con FS deprimida (260).

De este modo, un polimorfismo del gen ADBR1 que da lugar a un receptor con actividad aumentada y asociado con eventos clínicos relevantes en otras patologías cardiovasculares podría tener un papel en el pronóstico de los pacientes con MCH. Si bien, el presente estudio no ha sido capaz de demostrar dicha asociación.

## **6.4 LIMITACIONES**

El presente trabajo tiene una serie de limitaciones que han de tenerse en cuenta.

El estudio incluyó pacientes de tres centros españoles con población principalmente caucásica, por lo que la extrapolación de los resultados a otros grupos étnicos debe realizarse con precaución. Y además, los pacientes procedían de tres consultas monográficas de MCH y esto podría introducir sesgos en la selección de los pacientes más sintomáticos y con peor pronóstico. Sin embargo, la tasa de eventos duros fue baja y comparable con otras series actuales y menos seleccionadas.

El tamaño de la muestra del estudio fue relativamente limitado, lo que podría dar lugar a pérdida de significación estadística en algunos análisis. Esto nos puede llevar a no detectar una asociación real entre alguno de los polimorfismos estudiados y su efecto sobre la fibrosis, el desarrollo de FA o el ingreso hospitalario urgente. Estudios más amplios son necesarios para confirmar nuestras observaciones.

Como los pacientes fueron incluidos tras realizar una RMC, los pacientes previamente portadores de marcapasos o DAI no se realizaron la RMC y no fueron incluidos. Y así, un grupo de pacientes con un potencial peor pronóstico pudo quedar excluido del estudio. Sin embargo, en la época de inclusión de los pacientes, la indicación de DAI en prevención primaria en estos pacientes era baja en nuestro medio, así como la necesidad de estimulación ventricular en estos pacientes, de forma que la exclusión de pacientes por este motivo fue mínima.

La detección de episodios asintomáticos de FA pueden pasar desapercibida. A los pacientes se les realizaba un ECGs y holter-ECG independientemente de los síntomas, o si los síntomas o la exploración sugerían la presencia de arritmias. Sin embargo, episodios de FA paroxística asintomáticos pudieron no ser detectados.

## **6.5 IMPLICACIONES FUTURAS**

Los hallazgos de nuestro estudio resaltan el papel de los polimorfismos estudiados en genes no sarcoméricos tanto en el sustrato anatómico de la propia MCH como en el desarrollo de relevantes eventos clínicos durante la evolución de estos pacientes. Su aplicación en la clínica podría permitir perfilar mejor el pronóstico de estos pacientes, así como orientar hacia posibles dianas terapéuticas que modifiquen el sustrato anatómico y el pronóstico de nuestros pacientes.

## **7. CONCLUSIONES**



**CONCLUSIÓN 1:**

El polimorfismo en la región promotora del gen de la resistina, RETN -420C>G, se asocia de manera significativa con la fibrosis cardiaca en pacientes con miocardiopatía hipertrófica.

**Conclusión 1.1:**

El polimorfismo en la región promotora del gen de la resistina, RETN -420C>G, se asocia de manera significativa con un incremento en el número de segmentos que presentan realce tardío con gadolinio en la resonancia magnética cardiaca.

**Conclusión 1.2:**

El polimorfismo en la región promotora del gen de la resistina, RETN -420C>G, se asocia de manera significativa con el grado de fibrosis miocárdica en muestras de tejido miocárdico obtenidas por miectomía.

**CONCLUSIÓN 2:**

La presencia del polimorfismo de la región promotora de la aldosterona sintetasa, CYP11B2 -344C>T, se asocia de manera significativa con el desarrollo de fibrilación auricular en los pacientes con miocardiopatía hipertrófica.

**CONCLUSIÓN 3:**

El polimorfismo del gen de la cadena  $\alpha$ 1 del colágeno tipo I, COL1A1 2046G>T, es un predictor independiente del pronóstico en pacientes con miocardiopatía hipertrófica, evaluado mediante la necesidad de ingreso hospitalario urgente.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Clark CE, Henry WL, Epstein SE. Familial Prevalence and Genetic Transmission of Idiopathic Hypertrophic Subaortic Stenosis. *N Engl J Med*. 1973;289(14):709–14.
2. van Dorp WG, ten Cate FJ, Vletter WB, Dohmen H, Roelandt J. Familial prevalence of asymmetric septal hypertrophy. *Eur J Cardiol*. 1976 Sep;4(3):349–57.
3. 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 Nov;24(21):1965–91.
4. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani JA, Fifer MA, Link MS, et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Dec 13;58(25):e212–60.
5. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014 Oct 14;35(39):2733–79.
6. 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(1):16–23.
7. Sorajja P, Elliott PM, McKenna WJ. The molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy: prognostic implications. *Europace*. 2000 Jan;2(1):4–14.
8. Konno T, Chang S, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* [Internet]. 2010 May [cited 2014 Jun 14];25(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2932754/>
9. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. *Circulation*. 2003 Jun 5;107(17):2227–32.
10. Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *NEnglJMed*. 1997 Mar 13;336(11):775–85.
11. Liouville H. Retrecissement cardiaque sous aortique. *Gaz Medicale Paris*. 1869;24:161–3.

12. Hallopeau M. Retrecissement ventriculo-aortique. *Gaz Medicales Paris*. 1869;24:683–7.
13. BROCK R. Functional obstruction of the left ventricle; acquired aortic subvalvar stenosis. *GuysHospRep*. 1957;106(4):221–38.
14. TEARE D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *BrHeart J*. 1958 Jan;20(1):1–8.
15. Braunwald E, Lambrew CT, Rockoff SD, Ross J, Morrow AG. Idiopathic Hypertrophic Subaortic Stenosis: I. A Description of the Disease Based Upon an Analysis of 64 Patients. *Circulation*. 1964 Jan 11;29(5S4):IV – 3 – IV – 119.
16. Morrow AG, Lambrew CT, Braunwald E. Idiopathic Hypertrophic Subaortic Stenosis: II. Operative Treatment and the Results of Pre- and Postoperative Hemodynamic Evaluations. *Circulation*. 1964 Jan 11;29(5S4):IV – 120 – IV – 151.
17. Seidman CE, Seidman JG. Identifying Sarcomere Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy A Personal History. *Circ Res*. 2011 Mar 18;108(6):743–50.
18. Pare JA, Fraser RG, Pirozynski WJ, Shanks JA, Stubington D. Hereditary cardiovascular dysplasia. A form of familial cardiomyopathy. *Am J Med*. 1961 Jul;31:37–62.
19. Jarcho JA, McKenna W, Pare JA, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med*. 1989 Nov 16;321(20):1372–8.
20. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990 Sep 7;62(5):999–1006.
21. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 1989;80(3):564–72.
22. Friedman GD, Cutter GR, Donahue RP, Hughes GH, Hulley SB, Jacobs DR, et al. CARDIA: study design, recruitment, and some characteristics of the examined subjects. *J Clin Epidemiol*. 1988;41(11):1105–16.
23. 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 Aug 15;92(4):785–9.
24. Hada Y, Sakamoto T, Amano K, Yamaguchi T, Takenaka K, Takahashi H, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a population of adult Japanese workers as detected by echocardiographic screening. *AmJCardiol*. 1987 Jan 1;59(1):183–4.
25. Zou Y, Song L, Wang Z, Ma A, Liu T, Gu H, et al. Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in China: a population-based echocardiographic analysis of 8080 adults. *AmJMed*. 2004 Jan 1;116(1):14–8.

26. Lee ET, Welty TK, Fabsitz R, Cowan LD, Le NA, Oopik AJ, et al. The Strong Heart Study. A study of cardiovascular disease in American Indians: design and methods. *Am J Epidemiol*. 1990 Dec;132(6):1141–55.
27. Maron BJ, Spirito P, Roman MJ, Paranicas M, Okin PM, Best LG, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a population-based sample of American Indians aged 51 to 77 years (the Strong Heart Study). *Am J Cardiol*. 2004 Jun 15;93(12):1510–4.
28. Bick AG, Flannick J, Ito K, Cheng S, Vasani RS, Parfenov MG, et al. Burden of Rare Sarcomere Gene Variants in the Framingham and Jackson Heart Study Cohorts. *Am J Hum Genet*. 2012 Sep 7;91(3):513–9.
29. 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 Sep 4;315(10):610–4.
30. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, et al. Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly. *Circulation*. 2002 Jan 29;105(4):446–51.
31. Olivetto I, Maron MS, Adabag AS, Casey SA, Vargiu D, Link MS, et al. Gender-Related Differences in the Clinical Presentation and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Aug 2;46(3):480–7.
32. Wang Y, Wang J, Zou Y, Bao J, Sun K, Zhu L, et al. Female Sex Is Associated with Worse Prognosis in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy in China. *PLoS ONE*. 2014 Jul 21;9(7):e102969.
33. McKenna WJ, Deanfield JE. Hypertrophic cardiomyopathy: an important cause of sudden death. *Arch Dis Child*. 1984 Oct;59(10):971–5.
34. Maron BJ, Rowin EJ, Casey SA, Link MS, Lesser JR, Chan RHM, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy in Adulthood Associated With Low Cardiovascular Mortality With Contemporary Management Strategies. *J Am Coll Cardiol*. 2015 May 12;65(18):1915–28.
35. Sherrid MV, Shetty A, Winson G, Kim B, Musat D, Alviar CL, et al. Treatment of obstructive hypertrophic cardiomyopathy symptoms and gradient resistant to first-line therapy with  $\beta$ -blockade or verapamil. *Circ Heart Fail*. 2013 Jul;6(4):694–702.
36. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet*. 2013 Jan 25;381(9862):242–55.
37. Maron BJ, Maron MS. The 20 advances that have defined contemporary hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med*. 2015 Jan;25(1):54–64.
38. Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Spaendonck-Zwarts KYV, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res*. 2015 Apr 1;105(4):397–408.
39. Marsiglia JDC, Pereira AC. Hypertrophic Cardiomyopathy: How do Mutations Lead to Disease? *Arq Bras Cardiol*. 2014 Mar;102(3):295-304.

40. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Nov 2;44(9):1903–10.
41. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio ALP, Charron P, Gimeno-Blanes J, Heliö T, et al. 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*. 2013 May;34(19):1448–58.
42. Monserrat L, Gimeno-Blanes JR, Marín F, Hermida-Prieto M, García-Honrubia A, Pérez I, et al. Prevalence of fabry disease in a cohort of 508 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Dec 18;50(25):2399–403.
43. Romero JL. Atlas clínico-patológico de enfermedades cardiovasculares. Esmon Publicidad; 2013. 298 p.
44. Maron BJ, Sato N, Roberts WC, Edwards JE, Chandra RS. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum. Comparison of fetuses and infants with and without congenital heart disease and patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979 Sep;60(3):685–96.
45. Maron BJ, Roberts WC. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979 Apr;59(4):689–706.
46. Varnava AM, Elliott PM, Sharma S, McKenna WJ, Davies MJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart Br Card Soc*. 2000 Nov;84(5):476–82.
47. Shah JS, Esteban MTT, Thaman R, Sharma R, Mist B, Pantazis A, et al. Prevalence of exercise-induced left ventricular outflow tract obstruction in symptomatic patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Br Card Soc*. 2008 Oct;94(10):1288–94.
48. Maron MS, Olivotto I, Zenovich AG, Link MS, Pandian NG, Kuvin JT, et al. Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. *Circulation*. 2006 Nov 21;114(21):2232–9.
49. Ommen SR, Shah PM, Tajik AJ. Left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: past, present and future. *Heart Br Card Soc*. 2008 Oct;94(10):1276–81.
50. Maron BJ, Nishimura RA, Danielson GK. Pitfalls in clinical recognition and a novel operative approach for hypertrophic cardiomyopathy with severe outflow obstruction due to anomalous papillary muscle. *Circulation*. 1998 Dec 8;98(23):2505–8.
51. Nakamura T, Matsubara K, Furukawa K, Azuma A, Sugihara H, Katsume H, et al. Diastolic paradoxical jet flow in patients with hypertrophic cardiomyopathy: evidence of concealed apical asynergy with cavity obliteration. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Mar 1;19(3):516–24.
52. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Single Volume, 8e. 8 edition. Philadelphia: Saunders; 2007. 2304 p.

53. The Topol Solution: Textbook of Cardiovascular Medicine, Third Edition with DVD, Plus Integrated Content Website. 3 Har/Dvdr edition. Philadelphia: LWW; 2006. 1664 p.
54. Sengupta PP, Mehta V, Arora R, Mohan JC, Khandheria BK. Quantification of regional nonuniformity and paradoxical intramural mechanics in hypertrophic cardiomyopathy by high frame rate ultrasound myocardial strain mapping. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2005 Jul;18(7):737–42.
55. Tabata T, Oki T, Yamada H, Abe M, Onose Y, Thomas JD. Subendocardial motion in hypertrophic cardiomyopathy: assessment from long- and short-axis views by pulsed tissue Doppler imaging. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2000 Feb;13(2):108–15.
56. Thaman R, Gimeno JR, Murphy RT, Kubo T, Sachdev B, Mogensen J, et al. Prevalence and clinical significance of systolic impairment in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Br Card Soc*. 2005 Jul;91(7):920–5.
57. Ikeda H, Maki S, Yoshida N, Murohara T, Adachi H, Koga Y, et al. Predictors of death from congestive heart failure in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1999 Apr 15;83(8):1280–3, A9.
58. Maron BJ, Olivetto I, Spirito P, Casey SA, Bellone P, Gohman TE, et al. Epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy-related death: revisited in a large non-referral-based patient population. *Circulation*. 2000 Aug 22;102(8):858–64.
59. Cannon RO, Dilsizian V, O'gara PT, Udelson JE, Schenke WH, Quyyumi A, et al. Myocardial metabolic, hemodynamic, and electrocardiographic significance of reversible thallium-201 abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1991;83(5):1660–7.
60. Walston A, Behar VS. Spectrum of coronary artery disease in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. *Am J Cardiol*. 1976 Jul;38(1):12–6.
61. Cokkinos DV, Krajcer Z, Leachman RD. Coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1985 May 1;55(11):1437–8.
62. Okayama S, Soeda T, Kawakami R, Takami Y, Somekawa S, Ueda T, et al. Evaluation of coronary artery disease and cardiac morphology and function in patients with hypertrophic cardiomyopathy, using cardiac computed tomography. *Heart Vessels*. 2015 Jan;30(1):28–35.
63. Sorajja P, Ommen SR, Nishimura RA, Gersh BJ, Berger PB, Tajik AJ. Adverse prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy who have epicardial coronary artery disease. *Circulation*. 2003 Nov 11;108(19):2342–8.
64. Adams JC, Ommen SR, Klarich KW, Tajik AJ, Nishimura RA. Significance of postprandial symptom exacerbation in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2010 Apr 1;105(7):990–2.
65. Gilligan DM, Chan WL, Ang EL, Oakley CM. Effects of a meal on hemodynamic function at rest and during exercise in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1991 Aug;18(2):429–36.

66. Paz R, Jortner R, Tunick PA, Sclarovsky S, Eilat B, Perez JL, et al. The effect of the ingestion of ethanol on obstruction of the left ventricular outflow tract in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1996 Sep 26;335(13):938–41.
67. Usui M, Inoue H, Suzuki J, Watanabe F, Sugimoto T, Nishikawa J. Relationship between distribution of hypertrophy and electrocardiographic changes in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1993 Jul;126(1):177–83.
68. Yamaguchi H, Ishimura T, Nishiyama S, Nagasaki F, Nakanishi S, Takatsu F, et al. Hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy with giant negative T waves (apical hypertrophy): ventriculographic and echocardiographic features in 30 patients. *Am J Cardiol*. 1979 Sep;44(3):401–12.
69. Montgomery JV, Harris KM, Casey SA, Zenovich AG, Maron BJ. Relation of electrocardiographic patterns to phenotypic expression and clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2005 Jul 15;96(2):270–5.
70. Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, Casey SA, Lesser JR, Losi MA, et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2003 Jan 23;348(4):295–303.
71. Elliott P, Gimeno J, Tomé M, McKenna W. Left ventricular outflow tract obstruction and sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2006 Dec;27(24):3073; author reply 3073–4.
72. Guttmann OP, Pavlou M, O'Mahony C, Monserrat L, Anastasakis A, Rapezzi C, et al. Prediction of thrombo-embolic risk in patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM Risk-CVA). *Eur J Heart Fail*. 2015 Aug;17(8):837–45.
73. O'Mahony C, Jichi F, Pavlou M, Monserrat L, Anastasakis A, Rapezzi C, et al. A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM risk-SCD). *Eur Heart J*. 2014 Aug 7;35(30):2010–20.
74. Losi M-A, Betocchi S, Barbati G, Parisi V, Tocchetti C-G, Pastore F, et al. Prognostic significance of left atrial volume dilatation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2009 Jan;22(1):76–81.
75. Saura D, Marín F, Climent V, González J, Roldán V, Hernández-Romero D, et al. Left atrial remodelling in hypertrophic cardiomyopathy: relation with exercise capacity and biochemical markers of tissue strain and remodelling. *Int J Clin Pract*. 2009 Oct;63(10):1465–71.
76. Urbano-Moral JA, Rowin EJ, Maron MS, Crean A, Pandian NG. Investigation of global and regional myocardial mechanics with 3-dimensional speckle tracking echocardiography and relations to hypertrophy and fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014 Jan;7(1):11–9.
77. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009 Feb;22(2):107–33.



78. Kim RJ, Fieno DS, Parrish TB, Harris K, Chen EL, Simonetti O, et al. Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation*. 1999 Nov 9;100(19):1992–2002.
79. 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 Jun 16;43(12):2260–4.
80. Moon JC. ¿Qué significa la captación tardía de gadolinio en la miocardiopatía hipertrófica? *Rev Esp Cardiol*. 2007 Jan;60(1):1–4.
81. Moravsky G, Ofek E, Rakowski H, Butany J, Williams L, Ralph-Edwards A, et al. Myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: accurate reflection of histopathological findings by CMR. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013 May;6(5):587–96.
82. Mahrholdt H, Wagner A, Judd RM, Sechtem U, Kim RJ. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2005 Aug;26(15):1461–74.
83. Moon JCC, McKenna WJ, McCrohon JA, Elliott PM, Smith GC, Pennell DJ. Toward clinical risk assessment in hypertrophic cardiomyopathy with gadolinium cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 7;41(9):1561–7.
84. Maron MS, Appelbaum E, Harrigan CJ, Buros J, Gibson CM, Hanna C, et al. Clinical profile and significance of delayed enhancement in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2008 Sep;1(3):184–91.
85. Romero-Puche A, Marín F, González-Carrillo J, García-Honrubia A, Climent V, Feliu E, et al. Gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance and exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*. 2008 Aug;61(8):853–60.
86. Payá E, Marín F, González 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 Jun;14(5):414–9.
87. Briasoulis A, Mallikethi-Reddy S, Palla M, Alesh I, Afonso L. Myocardial fibrosis on cardiac magnetic resonance and cardiac outcomes in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis. *Heart Br Card Soc*. 2015 Sep;101(17):1406–11.
88. Chan RH, Maron BJ, Olivotto I, Pencina MJ, Assenza GE, Haas T, et al. Prognostic value of quantitative contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance for the evaluation of sudden death risk in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2014 Aug 5;130(6):484–95.
89. Funada A, Kanzaki H, Noguchi T, Morita Y, Sugano Y, Ohara T, et al. Prognostic significance of late gadolinium enhancement quantification in cardiac magnetic resonance imaging of hypertrophic cardiomyopathy with systolic dysfunction. *Heart Vessels*. 2015 Mar 28;

90. Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1284–91.
91. Maron MS, Maron BJ, Harrigan C, Buross J, Gibson CM, Olivetto I, et al. Hypertrophic cardiomyopathy phenotype revisited after 50 years with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jul 14;54(3):220–8.
92. Maron MS, Finley JJ, Bos JM, Hauser TH, Manning WJ, Haas TS, et al. Prevalence, clinical significance, and natural history of left ventricular apical aneurysms in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2008 Oct 7;118(15):1541–9.
93. Harrigan CJ, Appelbaum E, Maron BJ, Buross JL, Gibson CM, Lesser JR, et al. Significance of papillary muscle abnormalities identified by cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2008 Mar 1;101(5):668–73.
94. Maron MS, Hauser TH, Dubrow E, Horst TA, Kissinger KV, Udelson JE, et al. Right ventricular involvement in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2007 Oct 15;100(8):1293–8.
95. Reant P, Captur G, Mirabel M, Nasis A, M Sado D, Maestrini V, et al. Abnormal septal convexity into the left ventricle occurs in subclinical hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Magn Reson Off J Soc Cardiovasc Magn Reson*. 2015;17(1):64.
96. Captur G, Lopes LR, Mohun TJ, Patel V, Li C, Bassett P, et al. Prediction of Sarcomere Mutations in Subclinical Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014 Jan 11;7(6):863–71.
97. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med*. 2008 Apr;10(4):294–300.
98. Spoladore R, Maron MS, D'Amato R, Camici PG, Olivetto I. Pharmacological treatment options for hypertrophic cardiomyopathy: high time for evidence. *Eur Heart J*. 2012 Jul;33(14):1724–33.
99. Yu EH, Omran AS, Wigle ED, Williams WG, Siu SC, Rakowski H. Mitral regurgitation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: relationship to obstruction and relief with myectomy. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Dec;36(7):2219–25.
100. Siontis KC, Geske JB, Ong K, Nishimura RA, Ommen SR, Gersh BJ. Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, clinical correlations, and mortality in a large high-risk population. *J Am Heart Assoc*. 2014 Jun;3(3):e001002.
101. Dearani JA, Ommen SR, Gersh BJ, Schaff HV, Danielson GK. Surgery insight: Septal myectomy for obstructive hypertrophic cardiomyopathy--the Mayo Clinic experience. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007 Sep;4(9):503–12.
102. Sandín M, Marín F, Cambronero F, Climent V, Caro C, Martínez JG, et al. Does pacemaker implantation provide long-term benefits in severe obstructive hypertrophic cardiomyopathy? *Rev Esp Cardiol*. 2009 Nov;62(11):1233–9.

103. Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy — The Benefits of a Multidisciplinary Approach. *N Engl J Med*. 2002 Oct 24;347(17):1306–7.
104. Gimeno JR, Lacunza J, García-Alberola A, Cerdán MC, Oliva MJ, García-Molina E, et al. Penetrance and risk profile in inherited cardiac diseases studied in a dedicated screening clinic. *Am J Cardiol*. 2009 Aug 1;104(3):406–10.
105. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 2001 May 9;285(18):2370–5.
106. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2010 Oct;31(19):2369–429.
107. Spirito P, Chiarella F, Carratino L, Berisso MZ, Bellotti P, Vecchio C. Clinical course and prognosis of hypertrophic cardiomyopathy in an outpatient population. *N Engl J Med*. 1989 Mar 23;320(12):749–55.
108. Robinson K, Frenneaux MP, Stockins B, Karatasakis G, Poloniecki JD, McKenna WJ. Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: a longitudinal study. *J Am Coll Cardiol*. 1990 May;15(6):1279–85.
109. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997 Jul 12;350(9071):127–33.
110. Cecchi F, Monteregeggi A, Olivotto I, Marconi P, Dolara A, Maron BJ. Risk for atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy assessed by signal averaged P wave duration. *Heart Br Card Soc*. 1997 Jul;78(1):44–9.
111. 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 Nov 20;104(21):2517–24.
112. Losi M-A, Betocchi S, Aversa M, Lombardi R, Miranda M, D'Alessandro G, et al. Determinants of atrial fibrillation development in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2004 Oct 1;94(7):895–900.
113. Cecchi F, Olivotto I, Monteregeggi A, Santoro G, Dolara A, Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy in Tuscany: clinical course and outcome in an unselected regional population. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Nov 15;26(6):1529–36.
114. Maron BJ, Olivotto 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 Jan 16;39(2):301–7.
115. Favale S, Pappone C, Nacci F, Fino F, Resta F, Dicandia CD. Sudden death due to atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: a predictable event in a young patient. *Pacing Clin Electrophysiol PACE*. 2003 Feb;26(2 Pt 1):637–9.
116. López Gil M, Arribas F, Cosío FG. Ventricular fibrillation induced by rapid atrial rates in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card*

- Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol. 2000 Oct;2(4):327–32.
117. Guttman OP, Rahman MS, O'Mahony C, Anastasakis A, Elliott PM. Atrial fibrillation and thromboembolism in patients with hypertrophic cardiomyopathy: systematic review. *Heart*. 2014 Mar;100(6):465–72.
  118. Doi Y, Kitaoka H. Hypertrophic cardiomyopathy in the elderly: significance of atrial fibrillation. *J Cardiol*. 2001;37 Suppl 1:133–8.
  119. Morillas P, Pallarés V, Fácila L, Llisterri JL, Sebastián ME, Gómez M, et al. La puntuación CHADS2 como predictor de riesgo de ictus en ausencia de fibrilación auricular en pacientes hipertensos de 65 o más años. *Rev Esp Cardiol [Internet]*. 2014 Dec [cited 2015 May 12]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030089321400520X>
  120. Redwood CS, Moolman-Smook JC, Watkins H. Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 1999 Oct 1;44(1):20–36.
  121. Marston S, Copeland O, Jacques A, Livesey K, Tsang V, McKenna WJ, et al. Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency. *Circ Res*. 2009 Jul 31;105(3):219–22.
  122. 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 Mar;95(3):1409–14.
  123. Ashrafian H, McKenna WJ, Watkins H. Disease Pathways and Novel Therapeutic Targets in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2011 Jun 24;109(1):86–96.
  124. Baudenbacher F, Schober T, Pinto JR, Sidorov VY, Hilliard F, Solaro RJ, et al. Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest*. 2008 Dec;118(12):3893–903.
  125. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet TIG*. 2003 May;19(5):263–8.
  126. Crilley JG, Boehm EA, Blair E, Rajagopalan B, Blamire AM, Styles P, et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 21;41(10):1776–82.
  127. Abozguia K, Elliott P, McKenna W, Phan TT, Nallur-Shivu G, Ahmed I, et al. Metabolic modulator perhexiline corrects energy deficiency and improves exercise capacity in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010 Oct 19;122(16):1562–9.
  128. Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010 Dec 7;122(23):2430–40; discussion 2440.

129. Landstrom AP, Ackerman MJ. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010 Dec 7;122(23):2441–9; discussion 2450.
130. Patrianakos AP, Nyktari E, Parthenakis FI, Vardas PE. Reversible left ventricular apical ballooning after heavy alcohol consumption in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2013 Apr 15;164(3):e29–31.
131. Roy RR, Hakim FA, Hurst RT, Simper D, Appleton CP. Two Cases of Apical Ballooning Syndrome Masking Apical Hypertrophic Cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J*. 2014 Apr 1;41(2):179–83.
132. Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, Tierney DM, Mueller FO. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation*. 2009 Mar 3;119(8):1085–92.
133. 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 Sep;12(9):633–4.
134. Karam R, Lever HM, Healy BP. Hypertensive hypertrophic cardiomyopathy or hypertrophic cardiomyopathy with hypertension? A study of 78 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1989 Mar 1;13(3):580–4.
135. Aslam F, Haque A, Foody J, Shirani J. The frequency and functional impact of overlapping hypertension on hypertrophic cardiomyopathy: a single-center experience. *J Clin Hypertens Greenwich Conn*. 2010 Apr;12(4):240–5.
136. Canepa M, Sorensen LL, Pozios I, Dimaano VL, Luo H-C, Pinheiro AC, et al. Comparison of clinical presentation, left ventricular morphology, hemodynamics, and exercise tolerance in obese versus nonobese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2013 Oct 15;112(8):1182–9.
137. Lechin M, Quiñones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, et al. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995 Oct 1;92(7):1808–12.
138. Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schroder D, et al. 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 Mar;87(3):270–5.
139. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1993 Jan 6;87(6):1816–28.
140. Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jul 1;23(7):1269–75.

141. Wang AY-M, Chan JC-N, Wang M, Poon E, Lui S-F, Li PK-T, et al. Cardiac hypertrophy and remodeling in relation to ACE and angiotensinogen genes genotypes in Chinese dialysis patients. *Kidney Int.* 2003 May;63(5):1899–907.
142. Kim HS, Lee MM, Oh BH, Kim KI, Han KH, Park SK, et al. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene on cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2000 Jan 15;72(2):151–61.
143. Iwai N, Shimoike H, Ohmichi N, Kinoshita M. Angiotensinogen gene and blood pressure in the Japanese population. *Hypertension.* 1995 Apr;25(4 Pt 2):688–93.
144. Tang W, Devereux RB, Rao DC, Oberman A, Hopkins PN, Kitzman DW, et al. Associations between angiotensinogen gene variants and left ventricular mass and function in the HyperGEN study. *Am Heart J.* 2002 May;143(5):854–60.
145. Ortlepp JR, Breithardt O, Ohme F, Hanrath P, Hoffmann R. Lack of association among five genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Am Heart J.* 2001 Apr;141(4):671–6.
146. Jeunemaitre X. Genetics of the human renin angiotensin system. *J Mol Med Berl Ger.* 2008 Jun;86(6):637–41.
147. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990 Oct;86(4):1343–6.
148. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1994 Jun 9;330(23):1634–8.
149. Tesson F, Dufour C, Moolman JC, Carrier L, al-Mahdawi S, Chojnowska L, et al. The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Feb;29(2):831–8.
150. Perkins MJ, Driest SLV, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, et al. 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 Jan 11;26(22):2457–62.
151. Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* 2002 Dec;18(12):1331–9.
152. Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Apr 15;200(1):313–9.
153. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2007 Aug;81(2):405–13.

154. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Féry I, Charru A, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*. 1994 Jul;24(1):63–9.
155. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet Lond Engl*. 1994 Oct 1;344(8927):910–3.
156. Tomino Y, Makita Y, Shike T, Gohda T, Haneda M, Kikkawa R, et al. Relationship between polymorphism in the angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme or angiotensin II receptor and renal progression in Japanese NIDDM patients. *Nephron*. 1999 Jun;82(2):139–44.
157. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, et al. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*. 1998 Nov;32(5):825–30.
158. Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, Kats JP van, Saxena PR, et al. Angiotensin II Type 2 Receptor–Mediated Vasodilation in Human Coronary Microarteries. *Circulation*. 2004 May 18;109(19):2296–301.
159. Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, Catravas JD, Chester A, Whitehead BF, et al. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 Jan;284(1):323–36.
160. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res*. 1998 Nov 16;83(10):1035–46.
161. Carstens N, Merwe L van der, Revera M, Heradien M, Goosen A, Brink PA, et al. Genetic variation in angiotensin II type 2 receptor gene influences extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy independent of blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011 Jan 9;12(3):274–80.
162. Deinum J, Gool JMG van, Kofflard MJM, Cate FJ ten, Danser AHJ. Angiotensin II Type 2 Receptors and Cardiac Hypertrophy in Women With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Hypertension*. 2001 Jan 12;38(6):1278–81.
163. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1991 Oct;5(10):1513–22.
164. Yoshida Y, Morimoto T, Takaya T, Kawamura T, Sunagawa Y, Wada H, et al. Aldosterone signaling associates with p300/GATA4 transcriptional pathway during the hypertrophic response of cardiomyocytes. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2010 Jan;74(1):156–62.
165. Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ, Zhuang Z, Stratakis CA. Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Mar;83(3):1033–6.

166. White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res.* 1995 May;21(1-2):437–42.
167. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H, et al. Associations Between Human Aldosterone Synthase (CYP11B2) Gene Polymorphisms and Left Ventricular Size, Mass, and Function. *Circulation.* 1998 Feb 17;97(6):569–75.
168. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 1992 Aug;6(8):1249–58.
169. Chai W, Hoedemaekers Y, van Schaik RHN, van Fessem M, Garrelds IM, Saris JJ, et al. Cardiac aldosterone in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* 2006 Dec;7(4):225–30.
170. Schunkert H, Hengstenberg C, Holmer SR, Broeckel U, Luchner A, Muscholl MW, et al. Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation.* 1999 May 4;99(17):2255–60.
171. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, Satoh H, Akatsu T, Iwasaka J, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2002 Apr;102(4):381–6.
172. Ahmad S, Wei C-C, Tallaj J, Dell'Italia LJ, Moniwa N, Varagic J, et al. Chymase Mediates Angiotensin-(1-12) Metabolism in Normal Human Hearts. *J Am Soc Hypertens JASH.* 2013 Mar;7(2):128–36.
173. McLeod CJ, Bos JM, Theis JL, Edwards WD, Gersh BJ, Ommen SR, et al. Histologic characterization of hypertrophic cardiomyopathy with and without myofibrillar mutations. *Am Heart J.* 2009 Nov;158(5):799–805.
174. Pfeufer A, Osterziel KJ, Urata H, Borck G, Schuster H, Wienker T, et al. Angiotensin-converting enzyme and heart chymase gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1996 Aug 1;78(3):362–4.
175. Thaman R, Gimeno JR, Reith S, Esteban MTT, Limongelli G, Murphy RT, et al. Progressive left ventricular remodeling in patients with hypertrophic cardiomyopathy and severe left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jul 21;44(2):398–405.
176. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002 Mar 22;90(5):520–30.
177. 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 Jun;64(6):1041–50.
178. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, et al. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003 Sep 23;108(12):1455–60.



179. Fassbach M, Schwartzkopff B. Elevated serum markers for collagen synthesis in patients with hypertrophic cardiomyopathy and diastolic dysfunction. *Z Für Kardiologie*. 2005 May;94(5):328–35.
180. Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P. Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Feb;85(4):1105–8.
181. Challa AA, Vukmirovic M, Blackmon J, Stefanovic B. Withaferin-A reduces type I collagen expression in vitro and inhibits development of myocardial fibrosis in vivo. *PLoS One*. 2012;7(8):e42989.
182. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I  $\alpha$  1 gene. *Nat Genet*. 1996 Oct;14(2):203–5.
183. Collins M, Raleigh SM. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. *Med Sport Sci*. 2009;54:136–49.
184. Cartwright R, Kirby AC, Tikkinen KAO, Mangera A, Thiagamorthy G, Rajan P, et al. Systematic review and metaanalysis of genetic association studies of urinary symptoms and prolapse in women. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Aug 8;
185. Brull DJ, Murray LJ, Boreham CA, Ralston SH, Montgomery HE, Gallagher AM, et al. Effect of a COL1A1 Sp1 binding site polymorphism on arterial pulse wave velocity: an index of compliance. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3):444–8.
186. Speer G, Szenthe P, Kósa JP, Tabák AG, Folhoffer A, Fuszek P, et al. Myocardial infarction is associated with Sp1 binding site polymorphism of collagen type 1A1 gene. *Acta Cardiol*. 2006 Jun;61(3):321–5.
187. Park HK, Ahima RS. Resistin in Rodents and Humans. *Diabetes Metab J*. 2013 Dec;37(6):404–14.
188. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):307–12.
189. Osawa H, Yamada K, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Kawata H, et al. The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct;75(4):678–86.
190. Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, et al. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 23;335(2):596–602.
191. Kim M, Oh JK, Sakata S, Liang I, Park W, Hajjar RJ, et al. Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Aug;45(2):270–80.
192. Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, et al. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 May;32(5):817–30.

193. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A Gain-of-function Polymorphism in a G-protein Coupling Domain of the Human  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem.* 1999 Apr 30;274(18):12670–4.
194. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2002 Oct 10;347(15):1135–42.
195. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, et al. A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 25;103(30):11288–93.
196. Babenko AY, Grineva EN, Savitskaja DA, Kravchuk EN, Solncev VN, Kostareva AA. Polymorphisms of  $\beta$  1-adrenoreceptor gene and cardiovascular complications in patients with thyrotoxicosis. *BioMed Res Int.* 2014;2014:402897.
197. Ranade K, Jorgenson E, Sheu WH-H, Pei D, Hsiung CA, Chiang F, et al. A polymorphism in the beta1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate. *Am J Hum Genet.* 2002 Apr;70(4):935–42.
198. Rosca MG, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Feb;55:31–41.
199. Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Patsch W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics.* 1999 Nov 15;62(1):98–102.
200. Wang S, Fu C, Wang H, Shi Y, Xu X, Chen J, et al. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha gene are associated with hypertrophic cardiomyopathy and not with hypertension hypertrophy. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC.* 2007;45(8):962–7.
201. Xin Y, Song X, Xue H, Liu Z, Wang X, Wang H, et al. A common variant of the eNOS gene (E298D) is an independent risk factor for left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin Sci.* 2009 Jul 1;117(2):67–73.
202. Tousoulis D, Kampoli A-M, Tentolouris Nikolaos Papageorgiou C, Stefanadis C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012 Jan 1;10(1):4–18.
203. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation.* 2004 Mar 23;109(11):1359–65.
204. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998 Jul;103(1):65–9.
205. Chang K, Baek SH, Seung K-B, Kim P-J, Ihm S-H, Chae J-S, et al. The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm. *Coron Artery Dis.* 2003 Jun;14(4):293–9.

206. Berger K, Stögbauer F, Stoll M, Wellmann J, Hüge A, Cheng S, et al. The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies. *Hum Genet.* 2007 Apr;121(2):169–78.
207. Diakite B, Hamzi K, Slassi I, El Yahyaoui M, El Alaoui MMF, Habbal R, et al. G894T endothelial nitric oxide synthase polymorphism and ischemic stroke in Morocco. *Meta Gene.* 2014 Dec;2:349–57.
208. Wang M, Jiang X, Wu W, Zhang D. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in Asian population: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(3):e60472.
209. Ogimoto A, Shigematsu Y, Nakura J, Hara Y, Ohtsuka T, Kohara K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in patients with coexistent hypertrophic cardiomyopathy and coronary spastic angina. *J Mol Med Berl Ger.* 2005 Aug;83(8):619–25.
210. Rohard I, Schaefer E, Kampmann C, Beck M, Gal A. Association between polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and left posterior wall thickness (LPWT) of the heart in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Dec;31 Suppl 2:S349–56.
211. Friedrich FW, Bausero P, Sun Y, Treszl A, Krämer E, Juhr D, et al. A new polymorphism in human calmodulin III gene promoter is a potential modifier gene for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009 Jul;30(13):1648–55.
212. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- $\beta$ 1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology.* 2006 May;118(1):10–24.
213. Roldán V, Marín F, Gimeno JR, Ruiz-Espejo F, González J, Feliu E, et al. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2008 Jul;156(1):85–91.
214. 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 Feb 1;77(2):130–2.
215. Lang R, Bierig M, Devereux R, Flachskampf F, Foster E, Pellikka P, et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr.* 2006 Mar;7(2):79–108.
216. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Eur J Echocardiogr.* 2009 Jan 1;10(1):1–25.
217. Lancellotti P, Tribouilloy C, Hagendorff A, Moura L, Popescu BA, Agricola E, et al. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation. Part 1: aortic and pulmonary regurgitation (native valve disease). *Eur J Echocardiogr.* 2010 Apr 1;11(3):223–44.
218. Lancellotti P, Moura L, Pierard LA, Agricola E, Popescu BA, Tribouilloy C, et al. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment

- of valvular regurgitation. Part 2: mitral and tricuspid regurgitation (native valve disease). *Eur J Echocardiogr*. 2010 May 1;11(4):307–32.
219. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 1989 Oct;2(5):358–67.
  220. Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, et al. Exercise Standards for Testing and Training A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2001 Feb 10;104(14):1694–740.
  221. Bruce RA, Hornsten TR. Exercise stress testing in evaluation of patients with ischemic heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1969 Mar;11(5):371–90.
  222. Bruce RA, Kusumi F, Hosmer D. Maximal oxygen intake and nomographic assessment of functional aerobic impairment in cardiovascular disease. *Am Heart J*. 1973 Apr;85(4):546–62.
  223. Foster C, Jackson AS, Pollock ML, Taylor MM, Hare J, Sennett SM, et al. Generalized equations for predicting functional capacity from treadmill performance. *Am Heart J*. 1984 Jun;107(6):1229–34.
  224. McConnell TR, Clark BA. Prediction of Maximal Oxygen Consumption During Handrail-Supported Treadmill Exercise. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 1987;7(7):324–31.
  225. Dumont CA, Monserrat L, Soler R, Rodríguez E, Fernández X, Peteiro J, et al. Significado clínico del realce tardío de gadolinio con resonancia magnética en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev Esp Cardiol*. 2007 Jan;60(1):15–23.
  226. 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 healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation*. 2002 Jan 29;105(4):539–42.
  227. World Medical Association. World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013 Nov 27;310(20):2191–4.
  228. Ho CY, López 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 Aug 5;363(6):552–63.
  229. Rubinshtein R, Glockner JF, Ommen SR, Araoz PA, Ackerman MJ, Sorajja P, et al. Characteristics and clinical significance of late gadolinium enhancement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2010 Jan;3(1):51–8.

230. 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 Sep 7;56(11):867–74.
231. Bruder O, Wagner A, Jensen CJ, Schneider S, Ong P, Kispert E-M, et al. Myocardial scar visualized by cardiovascular magnetic resonance imaging predicts major adverse events in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Sep 7;56(11):875–87.
232. Osawa H, Tabara Y, Kawamoto R, Ohashi J, Ochi M, Onuma H, et al. Plasma resistin, associated with single nucleotide polymorphism -420, is correlated with insulin resistance, lower HDL cholesterol, and high-sensitivity C-reactive protein in the Japanese general population. *Diabetes Care*. 2007 Jun;30(6):1501–6.
233. Xu JY, Sham PC, Xu A, Tso AWK, Wat NMS, Cheng KY, et al. Resistin gene polymorphisms and progression of glycaemia in southern Chinese: a 5-year prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Feb;66(2):211–7.
234. El-Shal AS, Pasha HF, Rashad NM. Association of resistin gene polymorphisms with insulin resistance in Egyptian obese patients. *Gene*. 2013 Feb 15;515(1):233–8.
235. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Tibolla G, Grigore L, Raselli S, et al. Effect of the -420C/G variant of the resistin gene promoter on metabolic syndrome, obesity, myocardial infarction and kidney dysfunction. *J Intern Med*. 2007 Jul;262(1):104–12.
236. Tang N-P, Wang L-S, Yang L, Zhou B, Gu H-J, Sun Q-M, et al. A polymorphism in the resistin gene promoter and the risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Jan;68(1):82–7.
237. Qasim AN, Metkus TS, Tadesse M, Lehrke M, Restine S, Wolfe ML, et al. Resistin gene variation is associated with systemic inflammation but not plasma adipokine levels, metabolic syndrome or coronary atherosclerosis in nondiabetic Caucasians. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 May;70(5):698–705.
238. Cho YM, Youn B-S, Chung SS, Kim KW, Lee HK, Yu K-Y, et al. Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans. *Diabetologia*. 2004 Mar;47(3):559–65.
239. Hivert M-F, Manning AK, McAteer JB, Dupuis J, Fox CS, Cupples LA, et al. Association of variants in RETN with plasma resistin levels and diabetes-related traits in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):750–6.
240. Hussain S, Asghar M, Javed Q. Resistin gene promoter region polymorphism and the risk of hypertrophic cardiomyopathy in patients. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2010 Mar;155(3):142–7.
241. 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 Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2009 Oct;18(5):262–8.

242. Azarbal F, Singh M, Finocchiaro G, Le V-V, Schnittger I, Wang P, et al. Exercise capacity and paroxysmal atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Br Card Soc.* 2014 Apr;100(8):624–30.
243. Schneider MP, Hua TA, Böhm M, Wachtell K, Kjeldsen SE, Schmieder RE. Prevention of atrial fibrillation by Renin-Angiotensin system inhibition a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010 May 25;55(21):2299–307.
244. Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Guarda E, Zhou G, Sriram K. Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone. *Basic Res Cardiol.* 1993;88 Suppl 1:107–24.
245. Tsai C-T, Chiang F-T, Tseng C-D, Hwang J-J, Kuo K-T, Wu C-K, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Feb 23;55(8):758–70.
246. Zhao J, Li J, Li W, Li Y, Shan H, Gong Y, et al. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol.* 2010 Apr;159(8):1584–94.
247. Adam O, Zimmer C, Hanke N, Hartmann RW, Klemmer B, Böhm M, et al. Inhibition of aldosterone synthase (CYP11B2) by torasemide prevents atrial fibrosis and atrial fibrillation in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Aug;85:140–50.
248. Li Y, Zhou C, Xu J, Qian Y, Wang B. CYP11B2 T-344C gene polymorphism and atrial fibrillation: a meta-analysis of 2,758 subjects. *PloS One.* 2012;7(11):e50910.
249. Fu X, Ma X, Zhong L, Song Z. Relationship between CYP11B2-344T>C polymorphsim and atrial fibrillation: A meta-analysis. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* 2015 Mar;16(1):185–8.
250. Bress A, Han J, Patel SR, Desai AA, Mansour I, Groo V, et al. Association of aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2 -344T>C) and genetic ancestry with atrial fibrillation and serum aldosterone in African Americans with heart failure. *PloS One.* 2013;8(7):e71268.
251. Amir O, Amir RE, Paz H, Mor R, Sagiv M, Lewis BS. Aldosterone synthase gene polymorphism as a determinant of atrial fibrillation in patients with heart failure. *Am J Cardiol.* 2008 Aug 1;102(3):326–9.
252. Belenkov YN, Privalova EV, Kaplunova VY, Stambol'skiĭ DV, Fomin AA. [Analysis of morpho-functional parameters of the heart and polymorphisms of Renin-Angiotensin-aldosterone system genes in patients with different variants of the course of hypertrophic cardiomyopathy]. *Kardiologĭia.* 2010;50(6):27–34.
253. Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, et al. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1998 Jul;11(7):856–60.
254. Lim PO, Macdonald TM, Holloway C, Friel E, Anderson NH, Dow E, et al. Variation at the aldosterone synthase (CYP11B2) locus contributes to hypertension in subjects with a raised aldosterone-to-renin ratio. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep;87(9):4398–402.

255. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):265–325.
256. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SFA, Robins SP, et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest.* 2001 Apr 1;107(7):899–907.
257. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, et al. Large-Scale Evidence for the Effect of the COL1A1 Sp1 Polymorphism on Osteoporosis Outcomes: The GENOMOS Study. *PLoS Med* 2006 Apr;3(4):e90.
258. Vílchez JA, Hernández-Romero D, Ruiz-Espejo F, Garcia-Honrubia A, Valdés M, Martínez-Hernández P, et al. Collagen peptides, interstitial remodelling and sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC.* 2011 Sep;49(9):1569–71.
259. Fu C, Wang H, Wang S, Shi Y, Zhou X, Sun K, et al. Association of beta 1-adrenergic receptor gene polymorphisms with left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin Biochem.* 2008 Jul;41(10-11):773–8.
260. Nascimento BC de, Pereira SB, Ribeiro GS, Mesquita ET. Beta1-adrenergic receptor polymorphisms associated with atrial fibrillation in systolic heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2012 May;98(5):384–9.

## **9. ANEXOS**



**ANEXO I:**

**DICTAMEN FAVORABLE DEL CEIC**

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

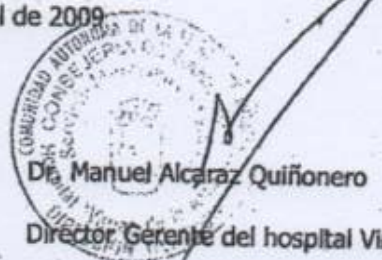
Fdo:

Dr. D. Juan Salinas Ramos

Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

P.O.

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



**ANEXO II:**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

# DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

BIOBANCO: HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

DONANTE:

## ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN

### 1.- IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestra/s biológica/s de sangre y/o tejidos. Estas muestras biológicas podrán ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica, científicamente aprobados.

Las muestras que done se almacenarán en el biobanco arriba indicado que forma parte de la Red Valenciana de Biobancos, autorizado por la administración autonómica y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente que previamente sean aprobados por los comités externos a los que esté adscrito este biobanco, incluyendo el Comité de Ética para la Investigación. En ocasiones dichos estudios se realizarán fuera del centro en el que ha sido atendido/a.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

### 2.- OBJETIVO

El **HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE** dispone de un biobanco donde se depositará sus muestras, constituido con la finalidad de recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados derivados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y medicinas para tratar enfermedades.

### 3.- BENEFICIOS ESPERADOS

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. Sin embargo, si las investigaciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales pero los costes de conservación y envío se cubrirán sobre una base sin ánimo de lucro.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

#### **4.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN**

Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información de la que contamos en este momento y/o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o declinar dicha participación.

Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de sus datos genéticos y otros datos personales obtenidos en la investigación. A estos efectos, se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que tiene a su disposición en el centro en el que está siendo atendido.

Estos datos pueden repercutir en algunos miembros de su familia, por lo cual usted valorará la conveniencia de transmitirles dicha información.

#### **5.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

La decisión de donar sus muestras de tejidos sobrantes y de sangre es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

#### **6.- RIESGOS**

El procedimiento que se le propone, una extracción sanguínea a través de una punción de una vena periférica, es un procedimiento muy seguro, con una frecuencia muy baja de complicaciones, entre las que se encuentran: hematoma, dolor e infección en la zona de la punción.

#### **7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD**

Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el biobanco para llevar a cabo la investigación descrita en este documento y el cumplimiento de sus obligaciones legales.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras de tejidos y/o sangre o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de codificación, esto es, desligando la información que le identifica sustituyéndolo por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, y de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 9) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al biobanco el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de documento acreditativo de su identidad.

## 8.- DECLARACIONES Y FIRMAS

Declaración del donante:

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en .....DNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en .....DNI.....en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI..... y nº de SIP.....

### DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores que trabajen con ellas.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas o distribuidas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo.
- Que en cualquier momento, yo, mi Representante Legal, o Tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, puedo solicitar información sobre los datos genéticos y otros datos personales que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

### CONSENTO

- Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de  
 Muestra/s de sangre .....
- Que yo, mi Representante Legal o Tutor, accedo (márquese sí o no) a que el personal de la Red Valenciana de biobancos me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos y/o tomar nuevas muestras  
 Si  
 No

Fdo.: D./Dña.....  
En .....a.....de.....de 20

Declaración del profesional de salud:  
He informado debidamente al donante

Fdo.: Dr. ANTONIO GARCIA HONRUBIA  
DNI , Colegiado Nº 03/0309368  
En ELCHE a de de 20

## 9. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña.....con DNI .....revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo.:

En .....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña.....con DNI .....como representante legal de D/Dña.....,con DNI.....,revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada

Fdo.:

En .....a.....de.....de 20.....

**SOLICITUD DE INFORMACIÓN DE DATOS GENÉTICOS RESULTADO DE LAS INVESTIGACIONES**

RED VALENCIANA DE BIOBANCOS  
BIOBANCO: HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

PACIENTE:

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en .....DNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en .....DNI..... en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI..... y nº de SIP.....

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones de la donación voluntaria realizada en fecha .....de.....de 20.....si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.:

En .....a.....de.....de 20.....



**ANEXO III:**  
**CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS**

# MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

# DATOS BASALES

HUV ARRIXACA

Datos identificativos  
(pegatina)

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| FAMILIA                          |  |
| FECHA DEL DIAGNÓSTICO            |  |
| FECHA DE EXTRACCION              |  |
| HISTORIA DE CARDIOPATÍA FAMILIAR |  |
| CASO ÍNDICE                      |  |

## 1. FRMS

|                           | SI/NO | COMENTARIO |
|---------------------------|-------|------------|
| MS reanimada              |       |            |
| TVS                       |       |            |
| AFMS                      |       |            |
| Síncope inexplicado       |       |            |
| Máximo grosor $\geq$ 30mm |       |            |
| RATA                      |       |            |
| TVNS                      |       |            |

## 2. Antecedentes cardiovasculares

|                           | SI/NO | COMENTARIO |
|---------------------------|-------|------------|
| HTA                       |       |            |
| DM                        |       |            |
| DISLIPEMIA                |       |            |
| TABAQUISMO                |       |            |
| SOBREPESO/<br>OBESIDAD    |       |            |
| NEUMOPATÍA<br>(EPOC/SAOS) |       |            |
| IR CRÓNICA                |       |            |
| Coronariopatía            |       |            |

|       |  |
|-------|--|
| OTROS |  |
|-------|--|

**3. ECG**

|                | SI/NO | COMENTARIO |
|----------------|-------|------------|
| RS             |       |            |
| FA PAROXÍSTICA |       |            |
| FA PERSISTENTE |       |            |
| FA PERMANENTE  |       |            |
| RITMO DE MP    |       |            |
| BLOQUEOS RAMA  |       |            |

**4. DISPOSITIVOS**

|            | SI/NO | COMENTARIO (TIPO, MODELO...) |
|------------|-------|------------------------------|
| MARCAPASOS |       |                              |
| DAI        |       |                              |

**4'. CIRUGÍA CARDIACA**

|                   | FECHA | FECHA | FECHA |
|-------------------|-------|-------|-------|
| MOTIVO            |       |       |       |
| TIPO INTERVENCIÓN |       |       |       |
| PROTESIS MITRAL   |       |       |       |
| PLASTIA MITRAL    |       |       |       |
| BYPASS AO-C       |       |       |       |

**5. OTROS ANTECEDENTES**

|  |
|--|
|  |
|--|

**5'. TRATAMIENTO CRÓNICO**

|  |
|--|
|  |
|--|

**6. CLINICA**

|               | SI/NO | ANTECEDENTES | AHORA | SEGUIMIENTO | Clase funcional |
|---------------|-------|--------------|-------|-------------|-----------------|
| FECHA         |       |              |       |             |                 |
| ANGINA        |       |              |       |             |                 |
| DISNEA        |       |              |       |             |                 |
| PALPITACIONES |       |              |       |             |                 |
| SÍNCOPE       |       |              |       |             |                 |
| PRESÍNCOPE    |       |              |       |             |                 |

**7. ECOCARDIOGRAFÍA**

|               | PREVIA | AHORA | SEGUIMIENTO |
|---------------|--------|-------|-------------|
| FECHA         |        |       |             |
| GROSOR MAX VI |        |       |             |
| DTDVI         |        |       |             |
| PP            |        |       |             |
| DSVI          |        |       |             |
| FA%           |        |       |             |
| FE%           |        |       |             |
| VTD           |        |       |             |

# MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

# DATOS BASALES

|                     |  |  |  |
|---------------------|--|--|--|
| VTS                 |  |  |  |
| AI                  |  |  |  |
| GRADIENTE BASAL     |  |  |  |
| VOLUMEN AURIC       |  |  |  |
| ONDA E              |  |  |  |
| ONDA A              |  |  |  |
| E'                  |  |  |  |
| IM                  |  |  |  |
| OTRAS VALVULOPATÍAS |  |  |  |

## 8. HOLTER-ECG

|                | PREVIA | AHORA | SEGUIMIENTO |
|----------------|--------|-------|-------------|
| FECHA          |        |       |             |
| TVNS           |        |       |             |
| FA PAROXÍSTICA |        |       |             |
| T. AURICULAR   |        |       |             |
| BAV 1º         |        |       |             |
| BAV 2º TIPO I  |        |       |             |
| BAV 2º TIPO II |        |       |             |
| BAV 3º         |        |       |             |
| EV             |        |       |             |
| ESV            |        |       |             |

## 9. ERGOMETRIA

|                           | PREVIA | AHORA | SEGUIMIENTO |
|---------------------------|--------|-------|-------------|
| FECHA                     |        |       |             |
| PROTOCOLO                 |        |       |             |
| TIEMPO                    |        |       |             |
| METS                      |        |       |             |
| TVNS                      |        |       |             |
| POSITIVIDAD CLÍNICA SI/NO |        |       |             |

# MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

# DATOS BASALES

|                          |  |  |  |
|--------------------------|--|--|--|
| POSITIVIDAD<br>ECG SI/NO |  |  |  |
| POSITIVIDAD<br>ECO SI/NO |  |  |  |

## 10. RMN

|           | SI/NO | FECHA | COMENTARIO |
|-----------|-------|-------|------------|
| REALIZADA |       |       |            |
| FIBROSIS  |       |       |            |

## 11. MUESTRAS

| IDENTIFICACIÓN |  |  |
|----------------|--|--|
|                |  |  |
|                |  |  |

**ANEXO IV:**  
**COMUNICACIONES A CONGRESOS**

## 405

**Atrial fibrillation is predicted by late gadolinium enhancement in hypertrophic cardiomyopathy patients**A. Garcia Honrubia<sup>1</sup>, F. Marin<sup>2</sup>, R. Soler<sup>3</sup>, J. Gonzalez<sup>2</sup>, G. De La Morena<sup>2</sup>, V. Climent<sup>4</sup>, L. Monserrat<sup>3</sup>, M. Valdes<sup>2</sup><sup>1</sup>Hospital de Elche, Elche, Spain; <sup>2</sup>Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain; <sup>3</sup>Universitario de A Coruna, A Coruna, Spain; <sup>4</sup>Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

**Background:** Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterised by myocardial hypertrophy, myocyte disarray and interstitial remodelling with raised amounts of collagen type I/III. Increased myocardial collagen can be non-invasively assessed by late gadolinium-enhancement (LGE) using cardiac magnetic resonance imaging. Given that atrial fibrillation (AF) is a common complication in HCM and that interstitial fibrosis is one of the most important underlying mechanisms in AF development, the aim of the present study was to assess the prognostic implications of LGE in AF development in a cohort of patients with HCM.

**Methods:** Two hundred and forty-four patients (50.5±14.9 years; 169 males) with HCM in sinus rhythm were included. Peripheral bolus injection of Gadolinium-DTPA (0.2mmol/kg) was administered and late contrast-enhanced images were acquired using a segmented inversion-recovery sequence. Patients were arbitrary divided in three different categories according to the number of left ventricle segments with LGE: none segment, mild (1-3 segments) and severe enhancement (>4 segments). A complete follow-up was performed in all patients (789±456 days).

**Results:** 142 patients (58.2%) showed LGE. During follow-up, 35 patients (14.3%) developed AF. Multivariate Cox analysis is shown in table 1.

Table 1. Multivariate Cox analysis

|                               | HR   | 95%CI      | p value |
|-------------------------------|------|------------|---------|
| Previous AF                   | 9.08 | 3.41-24.17 | <0.001  |
| Severe LGE                    | 4.77 | 1.57-14.48 | 0.006   |
| Mild LGE                      | 3.79 | 1.12-12.85 | 0.032   |
| Obstruction                   | 2.46 | 1.02-5.92  | 0.043   |
| Enlarged left atrial diameter | 2.32 | 1.08-4.96  | 0.031   |

**Conclusions:** Late gadolinium-enhancement is independently associated with atrial fibrillation development, even after adjusting by different confounding variables.

Citation: Garcia Honrubia A, Marin F, Soler R, Gonzalez J, De La Morena G, Climent V, Monserrat L, Valdes M. Atrial fibrillation is predicted by late gadolinium enhancement in hypertrophic cardiomyopathy patients. *European Journal of Heart Failure Supplements* 2009, 8(2), Abstract 405.



# ATRIAL FIBRILLATION IS PREDICTED BY LATE GADOLINIUM ENHANCEMENT IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY PATIENTS

A. Garcia Honrubia<sup>1</sup>, F. Marin<sup>2</sup>, R. Soler<sup>3</sup>, J. Gonzalez<sup>2</sup>, G. De La Morena<sup>2</sup>, V. Climent<sup>4</sup>, L. Monserrat<sup>3</sup>, M. Valdes<sup>2</sup> - (1) Hospital de Elche, Elche, Spain (2) Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain (3) Universitario de A Coruna, A Coruna, Spain (4) Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain.

## Background:

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterised by myocardial hypertrophy, myocyte disarray and interstitial remodelling with raised amounts of collagen type I/III. Increased myocardial collagen can be non-invasively assessed by late gadolinium-enhancement (LGE) using cardiac magnetic resonance imaging. Given that atrial fibrillation (AF) is a common complication in HCM and that interstitial fibrosis is one of the most important underlying mechanisms in AF development, the aim of the present study was to assess the prognostic implications of LGE in AF development in a cohort of patients with HCM.

## Methods:

Two hundred and forty-four patients (50.5±14.9 years; 169 males) with HCM in sinus rhythm were included. Peripheral bolus injection of Gadolinium-DTPA (0.2mmol/Kg) was administered and late contrast-enhanced images were acquired using a segmented inversion-recovery sequence. Patients were arbitrary divided in three different categories according to the number of left ventricle segments with LGE: none segment, mild (1-3 segments) and severe enhancement (>4 segments).

## Results:

A complete follow-up was performed in all patients (789±456 days). 142 patients (58.2%) showed LGE. During follow-up, 35 patients (14.3%) developed AF. Multivariate Cox analysis is shown in table 1.

**Table 1. Multivariate Cox analysis**

|                               | HR   | 95% CI     | p value |
|-------------------------------|------|------------|---------|
| Previous AF                   | 9.08 | 3.41-24.17 | <0.001  |
| Severe LGE                    | 4.77 | 1.57-14.48 | 0.006   |
| Mild LGE                      | 3.79 | 1.12-12.85 | 0.032   |
| Obstruction                   | 2.46 | 1.02-5.92  | 0.043   |
| Enlarged left atrial diameter | 2.32 | 1.08-4.96  | 0.031   |

## Conclusions:

Late gadolinium-enhancement is independently associated with atrial fibrillation development, even after adjusting by different confounding variables.

# REVISTA ESPAÑOLA DE CARDIOLOGÍA

## 6000-44 - ANÁLISIS GENÉTICO DE DOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS EN PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

*Esteban Orenes-Piñero, Diana Hernández Romero, Ana I. Romero-Aniorte, Juan A. Vílchez, Vicente Climent, Antonio García-Honrubia, Luis Caballero y Mariano Valdés del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar (Murcia), Hospital General Universitario, Alicante y Hospital General Universitario de Elche (Alicante).*

### Resumen

**Introducción:** La miocardiopatía hipertrófica (MCH) se caracteriza por hipertrofia de cardiomiocitos y fibrosis. Es una enfermedad autosómica dominante debida a mutaciones en genes del sarcómero. Ha sido descrito una relativa baja tasa de mortalidad en estos pacientes y el diverso pronóstico parece estar determinado por diferentes factores clínicos y demográficos. Se ha sugerido que cambios en los genes no sarcoméricos podrían contribuir a la gran heterogeneidad observada en las manifestaciones fenotípicas de esta enfermedad.

**Métodos:** Se analizó 2 polimorfismos de genes no sarcoméricos en 165 pacientes de MCH ( $50,1 \pm 15,0$  años, 70,8% varones) y 136 controles de similares características. El polimorfismo del gen COL1A1 (Colágeno tipo I alfa-1) en la región reguladora, provoca una disminución en su síntesis. Otro polimorfismo, en el gen del receptor adrenérgico  $\beta$ -1 (ADRB1) se ha asociado a remodelado del ventrículo izquierdo. Los pacientes se sometieron a una mediana de seguimiento de 49,5 (25,8-77,0) meses, registrando los eventos de nuevo ingreso hospitalario y sus causas.

**Resultados:** La distribución de frecuencias alélicas de ambos polimorfismos no mostraron diferencias entre pacientes y controles (ambos  $p > 0,05$ ). 35 pacientes (21,2%) necesitaron ingreso hospitalario durante el seguimiento (18,5% por insuficiencia cardíaca, 22,2% por arritmias auriculares, 11,1% por arritmias ventriculares, 29,6% por cardiopatía isquémica, 14,8% por ictus y 3,7% por otras causas), con una tasa de ingreso del 8,75% y año. En el análisis de Cox se observó que los pacientes no portadores del alelo polimórfico del gen COL1A1, así como los portadores del polimorfismo en homocigosis del gen ADRB1 presentan mayor riesgo de ingreso hospitalario [HR: 3,01 (IC95% 1,36-6,64);  $p = 0,006$ ], [OR: 2,32 (1,18-6,59);  $p = 0,015$ ]. El análisis multivariado tras ajustar por variables clínicas y demográficas reveló que tanto la no presencia del alelo polimórfico de COL1A1 (2046G > T) [HR: 3,02 (1,33-6,84),  $p = 0,008$ ] como el polimorfismo ADRB1 (R389G) en homocigosis [OR: 2,01 (1,01-4,31);  $p = 0,046$ ], permanecieron como variables independientes predictivas de ingreso hospitalario.

**Conclusiones:** Nuestro estudio sugiere que los polimorfismos COL1A1 (2046G > T) y ADRB1 (R389G) son predictores independientes de un peor pronóstico en pacientes con MCH, apoyando la importancia de los genes no sarcoméricos en su fenotipo.

Esteban Orenes-Piñero<sup>1</sup>, Diana Hernández Romero<sup>1</sup>, Ana I. Romero-Aniorte<sup>1</sup>, Juan A. Vilchez<sup>1</sup>, Vicente Climent<sup>2</sup>, Antonio García-Honrubia<sup>3</sup>, Luis Caballero<sup>1</sup> y Mariano Valdés<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar. Murcia; <sup>2</sup> Hospital General Universitario, Alicante/Alacant; <sup>3</sup> Hospital General Universitario de Elche, Elche/Elx.

## Introducción

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) se caracteriza por hipertrofia de cardiomiocitos y fibrosis. Es una enfermedad autosómica dominante debida a mutaciones en genes del sarcómero. Ha sido descrito una relativa baja tasa de mortalidad en estos pacientes y el diverso pronóstico parece estar determinado por diferentes factores clínicos y demográficos. Se ha sugerido que cambios en los genes no sarcoméricos podrían contribuir a la gran heterogeneidad observada en las manifestaciones fenotípicas de esta enfermedad.

## Métodos

Se analizaron 2 polimorfismos de genes no sarcoméricos en 168 pacientes de MCH (50.1±15.0 años, 70.8% varones) y 136 controles de similares características. Los pacientes proceden de la consulta externa de tres hospitales (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia; Hospital General Universitario de Alicante y Hospital Universitario de Elche, Alicante). El criterio para el diagnóstico de MCH fue la presencia de un engrosamiento de la pared del ventrículo mayor de 15 mm sin una causa que justificara la hipertrofia ventricular. Son pacientes clínicamente estables, en una fase poco avanzada de la enfermedad, sin otras comorbilidades que pudieran enmascarar el efecto de los biomarcadores y sin cardiopatía isquémica. El polimorfismo del gen COL1A1 (Colágeno tipo I alfa-1) en la región reguladora, provoca una disminución en su síntesis. Otro polimorfismo, en el gen del receptor adrenérgico  $\beta$ -1 (ADRB1) se ha asociado a remodelado del ventrículo izquierdo. Los pacientes se sometieron a una mediana de seguimiento de 49.5 (25.8-77.0) meses, registrando los eventos de nuevo ingreso hospitalario y sus causas.

## Resultados

La distribución de frecuencias alélicas de ambos polimorfismos no mostraron diferencias entre pacientes y controles (ambos  $p > 0.05$ ). 36 pacientes (21.5%) necesitaron ingreso hospitalario durante el seguimiento (18.5% por insuficiencia cardiaca, 22.2% por arritmias auriculares, 11.1% por arritmias ventriculares, 29.6% por cardiopatía isquémica, 14.8% por ictus y 3.7% por otras causas), con una tasa de ingreso del 8.75% y año. En el análisis de Cox se observó que los pacientes no portadores del alelo polimórfico del gen COL1A1, así como los portadores del polimorfismo en homocigosis del gen ADRB1 presentan mayor riesgo de ingreso hospitalario [HR: 2.67 (IC95% 1.25-5.68);  $p=0.011$ ], [HR: 2.16 (1.11-4.21);  $p=0.015$ ]. El análisis multivariado tras ajustar por variables clínicas y demográficas reveló que la no presencia del alelo polimórfico de COL1A1 (2046G>T) [HR: 2.76 (1.26-6.05),  $p=0.011$ ] permaneció como variable independiente predictiva de ingreso hospitalario, mientras que el polimorfismo ADRB1 (R389G) en homocigosis [OR: 1.98 (0.99-4.02);  $p=0.057$ ], mostró una clara tendencia.

|         |                             | polimorfismo COL1A1 |            |                   |                      |
|---------|-----------------------------|---------------------|------------|-------------------|----------------------|
|         |                             | Frecuencia          | Porcentaje | Porcentaje válido | Porcentaje acumulado |
| Válidos | homocigótico silvestre "GG" | 96                  | 57,1       | 57,1              | 57,1                 |
|         | heterocigótico              | 61                  | 36,3       | 36,3              | 93,5                 |
|         | homocigótico deletéreo "TT" | 11                  | 6,5        | 6,5               | 100,0                |
|         | Total                       | 168                 | 100,0      | 100,0             |                      |

Tabla 3. Frecuencia del polimorfismo en el gen COL1A1

|         |                           | polimorfismo ADRB1 |            |                   |                      |
|---------|---------------------------|--------------------|------------|-------------------|----------------------|
|         |                           | Frecuencia         | Porcentaje | Porcentaje válido | Porcentaje acumulado |
| Válidos | homocigótico deletéreo CC | 75                 | 44,6       | 44,6              | 44,6                 |
|         | heterocigoto              | 75                 | 44,6       | 44,6              | 89,3                 |
|         | homocigótico silvestre GG | 18                 | 10,7       | 10,7              | 100,0                |
|         | Total                     | 168                | 100,0      | 100,0             |                      |

Tabla 4. Frecuencia del polimorfismo en el gen COL1A1

| Presencia polimorfismo COL1A1 | Ingreso hospitalario urgente |    |
|-------------------------------|------------------------------|----|
|                               | No                           | Sí |
| No                            | 67                           | 27 |
| Sí                            | 62                           | 9  |

Tabla 5. La presencia del polimorfismo COL1A1 disminuye el número de ingresos hospitalarios urgentes en pacientes con MCH

| Polimorfismo ADRB1 en homocigosis | Ingreso hospitalario urgente |    |
|-----------------------------------|------------------------------|----|
|                                   | No                           | Sí |
| No                                | 77                           | 15 |
| Sí                                | 52                           | 21 |

Tabla 6. La presencia del polimorfismo ADRB1 en homocigosis aumenta el número de ingresos hospitalarios urgentes en pacientes con MCH

| Variable          | Univariado       |       | Multivariado     |       |
|-------------------|------------------|-------|------------------|-------|
|                   | HR (IC95%)       | p     | HR (IC95%)       | p     |
| Edad              | 1,03 (1,00-1,06) | 0,023 | 1,03 (1,00-1,05) | 0,047 |
| Sexo              | 2,31 (1,97-4,47) | 0,013 | 1,81 (0,88-3,71) | 0,105 |
| FA previa         | 1,81 (0,85-3,86) | 0,122 | 1,22 (0,53-2,78) | 0,641 |
| Obstrucción       | 1,03 (0,52-2,07) | 0,925 |                  |       |
| nº segmentos      | 0,96 (0,86-1,07) | 0,487 |                  |       |
| COL1A1 presencia  | 2,67 (1,25-5,68) | 0,011 | 2,76 (1,26-6,05) | 0,011 |
| ADRB1 homocigosis | 2,16 (1,11-4,21) | 0,024 | 1,98 (0,99-4,02) | 0,057 |

Tabla 7. Asociación entre variables clínicas y genéticas y reingreso hospitalario urgente en pacientes con MCH

## Conclusión

Nuestro estudio sugiere que el polimorfismo COL1A1 (2046G>T) es un predictor independiente de un peor pronóstico en pacientes con MCH, mientras que el polimorfismo ADRB1 (R389G) muestra una clara tendencia, apoyando la importancia de los genes no sarcoméricos en el fenotipo de MCH.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado a cargo del proyecto de Investigación en Salud FIS PS09/00721, del Instituto de Salud Carlos III. El análisis de los polimorfismos se realizó en colaboración con el Instituto Inmunológico de Alicante. E. Orenes tiene contrato de investigación postdoctoral a través de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región e Murcia, FFIS. D. Hernández disfruta de un contrato postdoctoral del Instituto Carlos III.

# REVISTA ESPAÑOLA DE CARDIOLOGÍA

## 4007-8 - EFECTO SOBRE EL REALCE TARDÍO CON GADOLINIO DE DOS POLIMORFISMOS EN GENES NO SARCOMÉRICOS EN LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

*Esteban Orenes Piñero, Ana Isabel Romero Aniorte, José Manuel Andreu Cayuelas, Josefa González, Eloísa Feliu, Marina Martínez, Antonio García Honrubia y Diana Hernández Romero del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar (Murcia) y Hospital General Universitario, Alicante.*

### Resumen

**Introducción:** La miocardiopatía hipertrófica (MCH) se caracteriza por hipertrofia de cardiomiocitos y fibrosis. Es una enfermedad autosómica dominante con más de 400 mutaciones en genes del sarcómero; además, mutaciones en los genes no sarcoméricos participan en la heterogeneidad fenotípica de la enfermedad. El desarrollo de fibrosis miocárdica puede ser estudiado de manera no invasiva mediante el realce tardío de gadolinio en la resonancia magnética cardiaca, asociándose la presencia y la extensión de este realce con una expresión más grave de la enfermedad desde un punto de vista funcional y clínico. Recientemente se ha sugerido un importante papel pronóstico, pero poco se sabe de los factores predisponentes.

**Métodos:** Analizamos dos polimorfismos no sarcoméricos en 147 pacientes de MCH ( $49,2 \pm 15,0$  años, 71,4% varones) y 136 controles de similares características. Uno, perteneciente al sistema renina-angiotensina-aldosterona, codifica la ECA (enzima convertidora de la angiotensina) y su polimorfismo se ha asociado anteriormente con fibrosis e hipertrofia cardiaca. El polimorfismo del promotor del gen RETN (Resistina) controla la hipertrofia cardiaca y se asocia a aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, obesidad y diabetes. Para analizar el grado de fibrosis miocárdica se realizó resonancia magnética cardiaca con contraste de gadolinio y determinamos el número de segmentos afectados.

**Resultados:** La distribución de frecuencias alélicas no muestran diferencias significativas entre pacientes y controles en los polimorfismos de ECA (deleción de 287-bp en el intrón 16), y RETN (-420G > C) (ambos  $p > 0,05$ ). Asociamos la presencia de estos polimorfismos con el grado de fibrosis, atendiendo al número de segmentos afectados en la resonancia y encontramos la presencia del alelo polimórfico en el polimorfismo RETN (-420G > C) se asocia con mayor número de segmentos afectados ( $R^2$  corregida = 0,22,  $p = 0,04$ ) en nuestros pacientes.

**Conclusiones:** Nuestro estudio preliminar revela que el polimorfismo RETN (-420G > C) está asociado con mayor fibrosis cardiaca en pacientes con MCH valorada por resonancia magnética cardiaca. El estudio de la implicación fisiopatológica de la RETN en MCH y la elaboración de perfiles genéticos complejos en combinación con la utilización de las técnicas de imagen podrían ayudar a conocer mejor la evolución y gravedad de los pacientes con MCH.

**ANEXO V:**  
**PUBLICACIONES**

# Involvement of the $-420C>G$ *RETN* polymorphism in myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy

■ D. Hernández-Romero<sup>1,2\*</sup>, E. Orenes-Piñero<sup>1,2\*</sup>, A. García-Honrubia<sup>3</sup>, V. Climent<sup>4</sup>, A. I. Romero-Aniorte<sup>1,2</sup>, C. M. Martínez<sup>2,5</sup>, M. García-Bautista<sup>6</sup>, M. Martínez<sup>4</sup>, E. Feliu<sup>4</sup>, J. González<sup>1,2</sup>, S. Cánovas<sup>1</sup>, J. A. Montero-Argudo<sup>7</sup>, M. Valdés<sup>1,2</sup> & F. Marín<sup>1,2</sup>

From the <sup>1</sup>Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Universidad de Murcia; <sup>2</sup>Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias Virgen de la Arrixaca (IMIB), Murcia; <sup>3</sup>Hospital General Universitario de Elche; <sup>4</sup>Hospital General Universitario, Alicante; <sup>5</sup>CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid; <sup>6</sup>Departament of Molecular Biology, Centro Inmunológico de Alicante, Alicante; and <sup>7</sup>Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

**Abstract.** Hernández-Romero D, Orenes-Piñero E, García-Honrubia A, Climent V, Romero-Aniorte AI, Martínez CM, García-Bautista M, Martínez M, Feliu E, González J, Cánovas S, Montero-Argudo JA, Valdés M, Marín F (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Universidad de Murcia, Murcia; Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias Virgen de la Arrixaca (IMIB), Murcia; Hospital General Universitario de Elche, Alicante; Hospital General Universitario, Alicante; Instituto de Salud Carlos III, Madrid; Centro Inmunológico de Alicante; and Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain). Involvement of the  $-420C>G$  *RETN* polymorphism in myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Intern Med* 2014; doi: 10.1111/joim.12334.

**Aims.** Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterized by left ventricular hypertrophy and fibrosis. HCM is an autosomal-dominant disease caused by more than 400 mutations in sarcomeric genes. Changes in nonsarcomeric genes contribute to its phenotypic heterogeneity. Cardiac fibrosis can be studied using late gadolinium enhancement (LGE) cardiac magnetic resonance imaging. We evaluated the potential role of two polymorphisms in nonsarcomeric genes on interstitial fibrosis in HCM.

**Materials and methods.** Two polymorphisms in nonsarcomeric genes [*ACE* (deletion of 287 bp in the 16th intron) and *RETN* ( $-420C>G$ )] were analysed in 146 HCM patients. Cardiac fibrosis was assessed using LGE to determine the number of affected segments.

**Results.** Allelic frequencies in *ACE* and *RETN* polymorphisms were consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium (both  $P > 0.05$ ). We found that the presence of the polymorphic allele in the  $-420C>G$  *RETN* polymorphism was independently associated with the number of affected segments of LGE ( $P = 0.038$ ). Increased circulating resistin concentration, measured by enzyme-linked immunosorbent assay, was associated with a higher degree of cardiac fibrosis. Myocardial fibrosis, assessed by Masson's trichrome staining, was associated with the  $-420C>G$  *RETN* polymorphism in 46 tissue samples obtained by septal myectomy ( $P = 0.044$ ).

**Conclusions.** The  $-420C>G$  *RETN* polymorphism was independently associated with the degree of cardiac fibrosis, assessed by LGE, in patients with HCM. In addition, there was an association between the polymorphism and the circulating resistin levels as well as with myocardial fibrosis in tissues obtained by myectomy. Investigating the physiological implication of the *RETN* polymorphism in HCM in combination with the use of imaging technologies might help to establish the severity of disease in patients with HCM.

**Keywords:** angiotensin-converting enzyme, fibrosis, hypertrophic cardiomyopathy, late gadolinium enhancement, resistin.

**Abbreviations:** HCM, Hypertrophic cardiomyopathy; RAAS, Renin–angiotensin–aldosterone system; ACE, Angiotensin-converting enzyme; *RETN*, Resistin; LGE, Late gadolinium enhancement; Ang, Angiotensin; SNP, Single nucleotide polymorphism; CMR, Cardiac magnetic resonance.

\*These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a monogenic disease characterized by unexplained cardiac and myocyte hypertrophy, interstitial fibrosis and myocyte disarray [1, 2]. Cardiac remodelling seems to play an important role in the pathophysiology of HCM caused by alterations in collagen metabolism leading to fibrosis [3, 4]. There is accumulating evidence that fibrosis as detected by late gadolinium enhancement (LGE) in cardiovascular magnetic resonance (CMR) may predict spontaneous clinical arrhythmia and sudden cardiac death in different cardiovascular conditions [5]. Moreover, it has been hypothesized that the presence of LGE is associated with progressive ventricular dilatation and markers of sudden death [6], thus reflecting greater disease damage in patients with HCM.

The phenotypic expression of HCM is multifactorial, mostly secondary to more than 400 mutations in over a dozen genes encoding the sarcomere proteins [7, 8]. In addition, it has been postulated that several nonsarcomeric genes act as modifiers in HCM. Amongst these, polymorphisms in genes encoding proteins of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) are of particular interest [9]. This system contributes to ventricular hypertrophy through the effects mediated by circulating angiotensin (Ang) as well as local activation of the RAAS in the myocardium [10].

Angiotensin-converting enzyme (ACE) is a membrane-bound enzyme that converts Ang I to active Ang II and inactivates the vasodilator and natriuretic peptide bradykinin [11]. In addition to the effects on the circulating renin-angiotensin system, Ang II has local paracrine and autocrine actions. It has been reported that both the level and activity of ACE are increased in hypertrophied heart muscle [12, 13]. The most common polymorphism in the *ACE* gene is the presence [insertion (I)] or absence [deletion (D)] of a 287-base pair Alu repetitive sequence inside intron 16. ACE activity is highest in DD homozygotes and intermediate in ID heterozygotes [10].

Resistin, an adipocyte-derived peptide, belongs to a family of cysteine-rich secretory proteins [14]. The gene encoding resistin, *RETN*, is located on chromosome 19p13.3 [14] where several single nucleotide polymorphisms have been found. Amongst these, a polymorphism in the promoter region (-420C>G) has been associated with arteriosclerosis and

cerebrovascular disease [15]. Although there is evidence that resistin induces hypertrophy in neonatal cardiomyocytes and contractile dysfunction in adult cardiomyocytes of diabetic rats [16], to the best of our knowledge, the role of *RETN* in the pathophysiology of HCM has not yet been elucidated.

The aim of this study was to assess whether genotyping of two different polymorphisms in nonsarcomeric genes [*ACE* I/D and *RETN* (-420C>G) polymorphisms] in combination with imaging techniques, such as LGE CMR, might help physicians to predict the severity of disease in patients with HCM. To validate our findings, circulating resistin levels will be measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serum samples of HCM patients and myocardial fibrosis will be analysed in tissue samples from patients undergoing septal myectomy.

## Materials and methods

### Patients

We prospectively included patients diagnosed with HCM from three referral centres in south-eastern Spain (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca in Murcia, Hospital General Universitario in Alicante and Hospital General Universitario in Elche). All patients were clinically stable for the previous 6 months, without ischaemic heart disease and without the presence of comorbidities that could mask the effect of the analysed polymorphisms. HCM was diagnosed as previously described [17, 18].

A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram, standard echocardiography, symptom-limited treadmill exercise (Bruce's protocol), 24-h electrocardiogram Holter monitoring and blinded CMR imaging. All recruited subjects gave their informed consent to participate. The study was approved by the Ethics Committee for Clinical Investigation from the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia (PS09/00721-2009) in accordance with the Declaration of Helsinki (as amended in Edinburgh in 2000).

### Blood samples and genotyping

Venous blood was obtained in the early morning without trauma or stasis, by experienced staff, after the patient had fasted overnight for >12 h.

Serum fractions were obtained by centrifugation for 15 min at 3500 *g*. Aliquots were stored at -80 °C to allow batch analysis in a blinded fashion. DNA from peripheral blood was extracted using DNeasy Blood and Tissue Kit and the QIAcube System (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Genotyping of the *ACE* gene I/D polymorphism was based on a polymerase chain reaction (PCR) method described by Perkins *et al.* [10]. The PCR products were separated by electrophoresis on 3% agarose gels and visualized by ethidium bromide to determine the presence/absence of insertion. The SNP rs1862513 (*RETN*) was analysed by allelic discrimination using TaqMan probes in real-time PCR (TaqMan SNP Genotyping Assays; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Primers and probes are commercially available from Applied Biosystems. Standard PCR conditions, with an annealing temperature of 60 °C, were applied. Sequencing reactions were carried out using the BigDye terminator vs3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analysed by capillary electrophoresis using the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### *Resistin measurement in serum samples*

The circulating resistin level was measured in an independent cohort of 159 HCM patients (age 50.5 ± 14.9 years, 71.1% male) using the Assay-Max Human Resistin ELISA kit (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. Resistin standards and samples were sandwiched by a murine monoclonal antibody specific for resistin precoated onto a microplate-immobilized antibody and a biotinylated polyclonal antibody specific for resistin, recognized by a streptavidin-peroxidase conjugate. After addition of the peroxidase enzyme substrate, colour development was measured at 450 nm; readings at 570 nm were subtracted to correct for optical imperfections in the plate. The minimum detectable level of resistin was 0.2 ng mL<sup>-1</sup>. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 4.5% and 7.1%, respectively.

#### *CMR imaging*

All CMR images were obtained with a 1.5-T system (Gyroscan NT; Philips Medical Systems, Best, the Netherlands) in conjunction with a phased-array body coil and electrocardiogram gating. Scout images were obtained in three orthogonal planes

to determine the exact position and axis of the left ventricle. Delayed contrast-enhanced images were acquired 10 min after the injection of the contrast material, according to the method of Dumont *et al.* [19], with an inversion recovery T1-weighted sequence in three short-axis views taken at the base, midpapillary muscles. The time of inversion was adjusted for each patient (between 200 and 400 ms) to achieve optimal suppression of the normal myocardium [20].

All CMR images were analysed on a satellite workstation console with commercial image post-processing software (EasyVision, version 4.0; Philips Medical Systems and Mass Suite 6.1; MEDIS Medical Imaging Systems, Leiden, the Netherlands). LGE was considered present when the signal intensity of any area within the myocardium was highly hyperintense and persisted in the same slice after swapping the phase encoding to exclude artefact images. All measurements (presenting a coefficient of variation <5%) were performed by two observers; their joint opinion was reached by consensus.

The American Heart Association 17-segment model for the left ventricle [21] was used to analyse wall thickness, contractile function and delayed enhancement per segment.

#### *Assessment of myocardial fibrosis in patients undergoing septal myectomy*

All recruited subjects gave their informed consent to participate in the study. All surgical procedures were performed under cardiopulmonary bypass, with mild hypothermia (30 °C), cardioplegic arrest of the heart and left ventricular venting through the right superior pulmonary vein. During isolated surgery, myectomy samples of the left ventricular subvalvular septum weighing about 50–80 mg were removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Once the tissue samples had been histologically processed, they were paraffin embedded and cut into sections (2–3 µm thick). For histochemical evaluation of connective tissue infiltration within myocardial tissues, Masson's trichrome staining of sections from affected specimens was performed with an automatic staining system (Dako Artisan; Dako, Carpinteria, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The degree of connective tissue infiltration was measured qualitatively on a scale of 0–4 (0, negative; 1, mild; 2, medium; 3, high; 4,



very high). All determinations were blinded and performed twice to ensure the repeatability of the results. An Axio Scope A1 transmitted-light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) was used for the analysis.

#### Statistical analysis

Continuous variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation for normally distributed variables and as median (interquartile range) for non-normally distributed variables. Categorical variables are presented as frequency (percentage). Group comparisons for continuous variables were performed using the unpaired *t*-test for independent samples or the Mann–Whitney *U*-test (as appropriate). Comparisons of discrete variables were performed using chi-squared or Fisher's exact tests (as appropriate). Correlation between two continuous variables was assessed using the Pearson or Spearman tests (as appropriate).

Linear regression analyses were carried out to test the predictive discrimination of several demographic, echocardiographic, genetic, CMR, effort test and Holter variables to identify the association with LGE. Only those variables with values of  $P < 0.15$  in the univariate analysis were incorporated into the multivariate model. *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Linear regression analysis was performed to evaluate the association between the myocardial fibrosis and the -420C>G *RETN* in tissues obtained by myectomy. A high or very high degree of connective tissue infiltration (grade 3 or 4, with Masson's trichrome staining) was considered to be a high degree of fibrosis. Statistical analyses were performed using SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

#### Results

A total of 146 HCM patients (age 49.0  $\pm$  15.2 years, 72.6% male) were included in the analyses of two polymorphisms in nonsarcomeric genes. Baseline characteristics of these patients are shown in Table 1. Data on the genotype frequencies of *RETN* (-420C>G) and *ACE* (I/D) polymorphisms are shown in Table 2. The distributions of allelic frequencies were consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium (all  $P > 0.05$ ).

**Table 1** Demographic and clinical baseline characteristics of the patients included in the analysis

| Variables                                 | Patients (n = 146) |
|---|--------------------|
| Age, years                                | 49.0 $\pm$ 15.2    |
| Sex male                                  | 106 (72.6)         |
| Hypertension                              | 51 (34.9)          |
| Diabetes mellitus                         | 12 (8.2)           |
| Family history for HCM                    | 53 (36.3)          |
| NYHA class II–IV                          | 74 (50.7)          |
| Previous syncope                          | 15 (9.6)           |
| Previous AF                               | 22 (15.1)          |
| Previous angina                           | 36 (24.7)          |
| Maximum LV wall thickness, mm             | 19.7 (13.0–38.0)   |
| Subaortic obstruction (gradient >30 mmHg) | 49 (34.0)          |
| % LV ejection fraction                    | 67.8 $\pm$ 12.6    |
| Nonsustained ventricular tachycardia      | 50 (34.2)          |
| Left atrial diameter, mm                  | 42.6 $\pm$ 7.4     |
| Left atrial volume, ml                    | 72.3 $\pm$ 16.5    |
| Number of LGE segments/patient            | 2.9 (0–11)         |

HCM, hypertrophic cardiomyopathy; NYHA, New York Heart Association; AF, atrial fibrillation; LV, left ventricular; LGE, late gadolinium enhancement. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, frequency (%) or median (interquartile range), as appropriate.

#### *RETN* polymorphism is associated with an increase in cardiac fibrosis

Linear regression analysis showed that the presence of the *RETN* (-420C>G) polymorphism was associated with an increase in the number of segments of LGE in the CMR scan ( $P = 0.034$ ) and, consequently, with an increase in cardiac fibrosis (Fig. 1a). The same procedure was used for the analysis of the association between the *ACE* (I/D) polymorphism and the LGE (Fig. 1b). However, in this case, we did not observe a relationship between the presence of the polymorphism and the number of segments with LGE ( $P = 0.444$ ), indicating that the *ACE* polymorphism was not associated with cardiac fibrosis in this cohort of HCM patients.

We explored the possibility of other univariate predictors of cardiac fibrosis by regression analysis including several clinical, echocardiographic and

**Table 2** Genotype frequencies of *RETN* (-420C>G) and *ACE* (I/D) polymorphisms in patients with hypertrophic cardiomyopathy

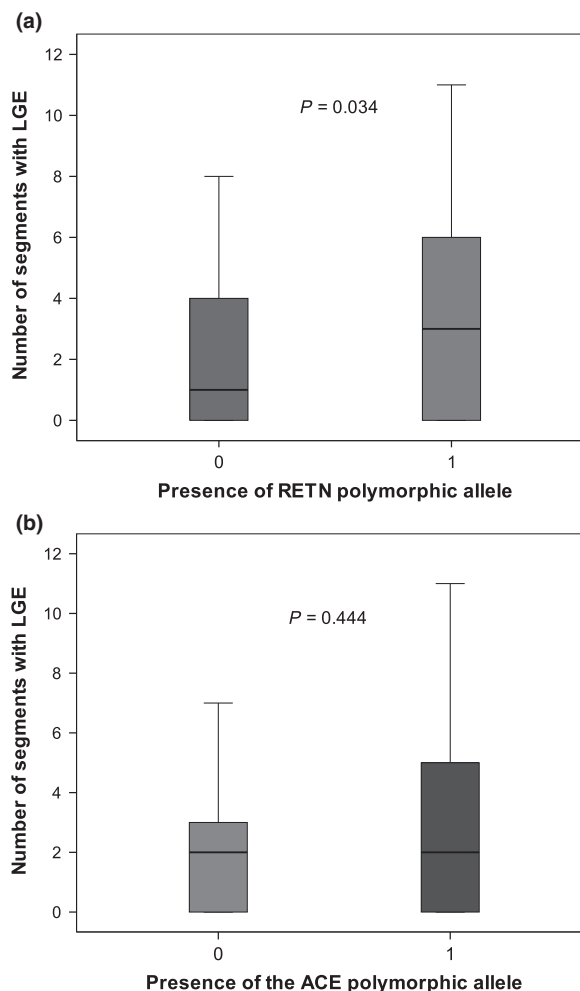
| Genotype frequency | Patients (n = 146) | Percentage |
|--------------------|--------------------|------------|
| <i>RETN</i>        |                    |            |
| C/C                | 75                 | 51.4       |
| C/G                | 59                 | 40.4       |
| G/G                | 12                 | 8.2        |
| Total              | 146                | 100        |
| <i>ACE</i>         |                    |            |
| D/D                | 61                 | 41.8       |
| D/I                | 67                 | 45.9       |
| I/I                | 18                 | 12.3       |
| Total              | 146                | 100        |

demographic variables and the number of segments presenting LGE (Table 3). Only the presence of the *RETN* (-420C>G) polymorphism was significantly associated with the number of segments with LGE ( $R^2$  corrected = 0.024;  $P = 0.034$ ) and thus with an increase in cardiac fibrosis. As age showed  $P = 0.080$  was included in the multivariate analysis (Table 3). The presence of the -420C>G *RETN* polymorphism ( $R^2$  corrected = 0.031;  $P = 0.038$ ) was the only independent predictor of LGE in our multivariate analysis; the association with age did not reach significance.

Next, we measured resistin levels by ELISA in serum samples from an independent cohort of 159 HCM patients (age  $50.5 \pm 14.9$  years, 71.1% male). Of interest, we observed that the presence of the G allele in the *RETN* polymorphism was significantly associated with an increase in circulating resistin levels ( $P < 0.001$ ; Fig. 2).

#### *RETN* polymorphism is associated with myocardial fibrosis in tissues obtained by cardiac myectomy

We obtained 46 samples of myocardial tissue by septal myectomy. All tissues were genotyped for the *RETN* polymorphism: 18 (39.1%) samples were CC, 16 (34.8%) CG and 12 (26.1%) GG. When evaluating myocardial fibrosis by Masson's trichrome staining, 28 (60.9%) of the myocardial samples showed low or medium levels of fibrosis (connective tissue infiltration grade 0, 1 or 2), whereas 18 (39.1%) had a high level of fibrosis (grade 3 or 4; Fig. 3). We found a significant association between

**Fig. 1** Association between the number of segments with late gadolinium enhancement (LGE) and the polymorphisms in two nonsarcomeric genes, *RETN* -420C>G (a) and *ACE* (I/D) (b), in patients with hypertrophic cardiomyopathy. 0 = absence of the polymorphism; 1 = presence of the polymorphism.

the -420C>G *RETN* polymorphism and the interstitial fibrosis in myocardial tissues (B-coefficient = 0.49, 95% confidence interval 0.015–0.962,  $P = 0.044$ ; Table 4).

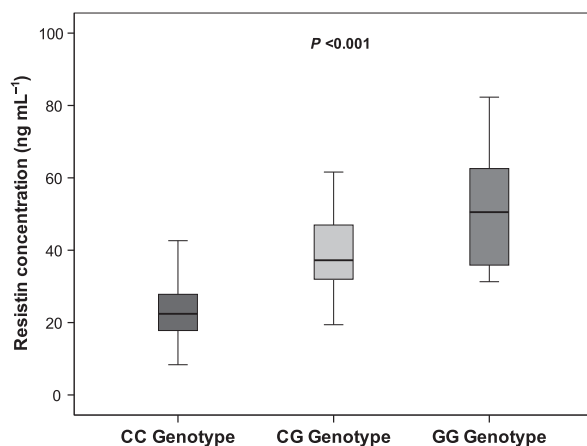
#### Discussion

In this study, we have shown that the presence of a polymorphism in the promoter of the *RETN* gene (-420C>G) is associated with cardiac fibrosis, determined as an increase in the number of segments with LGE in CMR imaging, even after

**Table 3** Association between different demographic, clinical and genetic variables and LGE

| Variable                                      | Univariate      |              | Multivariate    |              |
|---|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|   | Corrected $R^2$ | $P$          | Corrected $R^2$ | $P$          |
| Age   | 0.015           | 0.080        |                 | 0.067        |
| Sex   | 0.004           | 0.218        |                 |              |
| Previous AF                                   | -0.007          | 0.980        |                 |              |
| Subaortic obstruction (gradient >30 mmHg)     | 0.001           | 0.282        |                 |              |
| Presence of <i>RETN</i> polymorphism          | 0.024           | <b>0.034</b> | 0.031           | <b>0.038</b> |
| Presence of <i>ACE</i> polymorphism           | -0.003          | 0.444        |                 |              |
| Abnormal blood pressure response <sup>a</sup> | -0.007          | 0.786        |                 |              |
| Left ventricular ejection fraction            | -0.007          | 0.840        |                 |              |

<sup>a</sup>In the effort test; AF, atrial fibrillation; LGE, late gadolinium enhancement; Significant associations are shown in bold.



**Fig. 2** Relation between the *RETN* genotype and the resistin concentration. The presence of the G420 allele in the *RETN* gene is significantly associated with resistin levels in patients with hypertrophic cardiomyopathy.

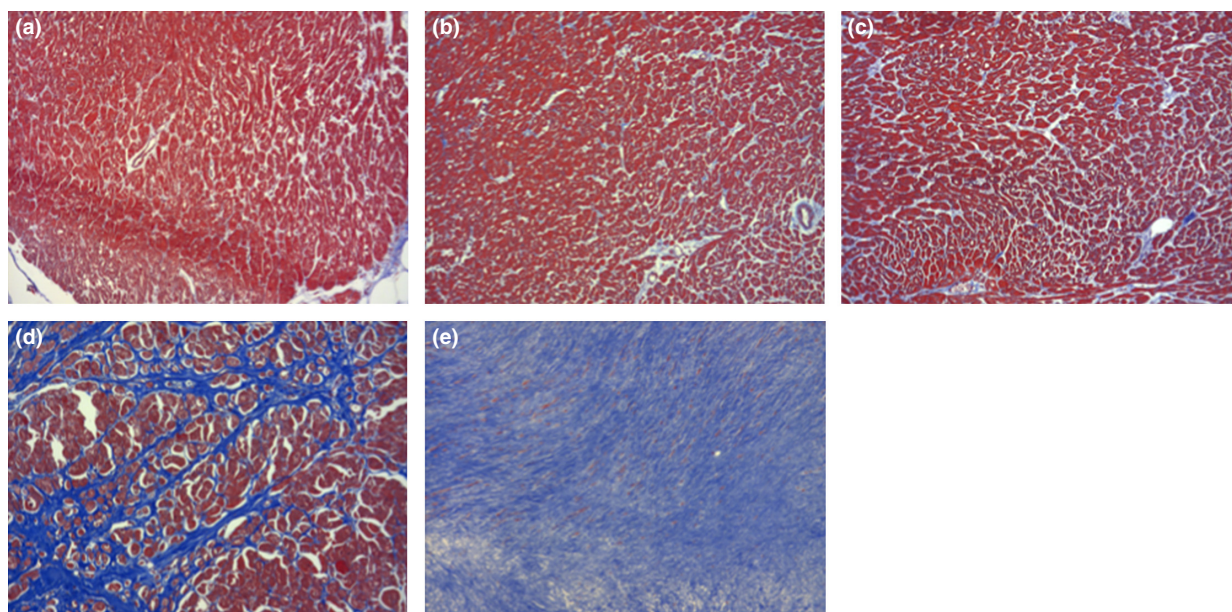
adjusting for other potential confounders. We have confirmed this association in an analysis of myocardial fibrosis in HCM patients undergoing septal myectomy.

To our knowledge, this is the first study to demonstrate this interesting association between the -420C>G *RETN* polymorphism and the presence of interstitial cardiac fibrosis in HCM. This polymorphism in the *RETN* promoter region has previously been associated with obesity [6], insulin sensitivity and type 2 diabetes [14], arteriosclerosis and cerebrovascular disease [16]. Moreover, it was previously shown that the presence of the -420C>G *RETN* polymorphism was significantly

associated with an increased risk of HCM in a study including 105 HCM patients; however, the underlying pathophysiological role of *RETN* in HCM was not investigated [22].

The present study was conducted in a clinically stable series of patients without ischaemic heart disease, as this condition could have masked the effect of the analysed polymorphisms. In the multivariate regression analysis, the presence of the *RETN* polymorphism was significantly associated with the number of segments with LGE after adjusting for other potential confounders. In addition, we re-analysed our data excluding patients with hypertension and/or diabetes; the association between the polymorphism and the LGE was even stronger than in the entire cohort, supporting the contribution of hypertension and diabetes as confounding factors (data not shown).

We and others have demonstrated that the *RETN* -420G allele is associated with elevated expression of resistin mRNA [23, 24] and increased circulating resistin levels in humans. In this study, we have demonstrated that HCM patients with the -420GG *RETN* genotype had the highest levels of resistin, followed by those with the CG and then the CC genotype. There is evidence that serum resistin concentration is correlated with levels of cardiac injury biomarkers and that resistin levels increase with the severity of myocardial ischaemic injury [25]. Overexpression of *RETN* in cultured neonatal rat ventricular myocytes significantly increased cell size and expression of atrial natriuretic factor and beta-myosin heavy chain, probably due to the observed activation of the mitogen-activated protein kinases and other transcription factors that



**Fig. 3** Classification of myocardial fibrosis assessed by Masson's trichrome staining: grade 0 (a); grade 1 (b); grade 2 (c); grade 3 (d); and grade 4 (e). Magnification  $\times 100$ .

**Table 4** Association between the myocardial fibrosis and the -420C>G *RETN* polymorphism in cardiac tissues obtained by myectomy

| Model         | Nonstandardized | Standardized |         | 95% confidence interval |              |             |             |
|---------------|-----------------|--------------|---------|-------------------------|--------------|-------------|-------------|
|               | coefficients    | coefficients | $\beta$ | $t$                     | $P$ -value   | Lower limit | Upper limit |
| High fibrosis | 0.488           | 0.235        | 0.299   | 2.078                   | <b>0.044</b> | 0.015       | 0.962       |
| (Constant)    | 1.679           | 0.147        |         | 11.422                  | 0.000        | 1.382       | 1.975       |

Significant associations are shown in bold.

could be involved in the hypertrophic response [16]. When *RETN* was overexpressed in adult cultured cardiomyocytes, myocyte mechanics were altered by reducing cell contractility as well as contraction and relaxation velocities [16]. These interesting findings, obtained in an *in vitro* model, would be of great relevance in the pathophysiology of *RETN*, after validation in human analysis.

Although little is known about the role of resistin in the pathophysiology of HCM, we hypothesized that the presence of the -420C>G *RETN* polymorphism is associated with increased circulating resistin levels and subsequently with an increase in cardiac fibrosis, a pathophysiological hallmark of HCM. Our analyses performed in myocardial tissues of

patients with HCM undergoing septal myectomy support our hypothesis as we found that, in these tissues, myocardial fibrosis is associated with the -420C>G *RETN* polymorphism.

On the other hand, the *ACE* (I/D) polymorphism was not correlated with cardiac fibrosis in our cohort of patients with HCM. The role of the *ACE* polymorphism in HCM is controversial. The first study to investigate the role of this polymorphism in HCM showed that the DD genotype was more common in HCM families with a high incidence of sudden cardiac death [26]. Subsequent studies provided further evidence of the modifying effects of the *ACE* gene by showing an association between the I/D genotypes and the severity of HCM [27, 28].

By contrast, in an analysis of the impact of *ACE* on HCM in a Japanese population, no association between the *ACE* genotypes was detected [29]. Also, the findings of a study in 104 Dutch patients did not support a role for the I/D polymorphism as a modifier in this disease [30]. Another large-scale investigation was performed within the Framingham Heart Study in 2439 subjects [31], and no association was found between the *ACE* genotypes and the echocardiographic left ventricular hypertrophy. One possible explanation for the conflicting results may be that the association between the *ACE* I/D genotype and the expression of cardiac hypertrophy is dependent on its causal mutation, and a significant association is present in those with the R403Q mutation in the  $\beta$ -myosin heavy chain but not in other [9].

The findings of the present study as well as previous results from our group [17] highlight the importance of nonsarcomeric genes in the pathophysiology, severity and prognosis of HCM. In both studies, we selected clinically stable HCM patients, but the study designs and end-points and the data analyses were different in the two studies, and therefore, the inclusion of the new data within our previous publication was not possible.

The potential limitations of this study should be noted. First, although the study was conducted in three different hospitals, most patients were Caucasian, and therefore, the data should be extrapolated to other ethnic groups with caution. Secondly, the sample size of the present study was limited, possibly resulting in loss of statistical significance in some of the analyses. Thus, larger studies are required to confirm our observations. However, the results of this study provide valuable insights and may serve to guide future studies in this area.

### Conclusion

The results obtained in the present study reveal for the first time that the presence of the polymorphism in the promoter of the *RETN* gene (-420C>G) is significantly associated with cardiac fibrosis assessed as an increased number of segments showing LGE in CMR imaging, as well as with myocardial fibrosis in tissues of patients with HCM. Our findings highlight the importance of nonsarcomeric genes in determining the HCM phenotype and suggest that analysis of the -420C>G *RETN* polymorphism in combination

with imaging techniques may help to predict the severity of HCM.

### Acknowledgements

We thank Dr. Jesús Gomez-Plana for the kind donation of myocardial tissue samples and Dr. Gonzalo de la Morena, José Manuel Andreu-Cayuelas and Luis Caballero for collaboration in this study.

### Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) and in part by Funding FEDER (grant number PS09/00721), the Department of Molecular Biology, Centro Inmunológico de Alicante (Spain), Instituto de Salud Carlos III and Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias Virgen de la Arrixaca (IMIB, Murcia, Spain) (grant numbers CD09/00010 and APOYO\_020/2014 to DHR, RAICMUR\_012/2014 to AIRA and APOYO\_041/2014 to EOP).

### Conflict of interest statement

No conflicts of interest to declare.

### References

- Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, Jover E, de la Morena G, Valdés M, Marín F. An insight of novel pharmacological therapies in hypertrophic cardiomyopathy. *Med Chem* 2011; **7**: 275–85.
- Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004; **363**: 1881–91.
- Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- $\beta$ 1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006; **118**: 10–24.
- Roldán V, Marín F, Gimeno JR *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2008; **156**: 85–91.
- Assomull RG, Prasad SK, Lyne J *et al.* Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; **48**: 1977–85.
- Moon JC, McKenna WJ, McCrohon JA, Elliott PM, Smith GC, Pennell DJ. Toward clinical risk assessment in hypertrophic cardiomyopathy with gadolinium cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1561–7.
- Kaufman BD, Auerbach S, Reddy S *et al.* RAAS gene polymorphisms influence progression of pediatric hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genet* 2007; **122**: 515–23.
- Ho CY, Seidman CE. A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2006; **113**: 858–62.

- 9 Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S *et al.* 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**: 270–5.
  - 10 Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG *et al.* 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**: 2457–62.
  - 11 Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, Jover E, Valdés M, Lip GY, Marín F. Impact of polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; **12**: 521–30.
  - 12 Danser AHJ, Schalekamp ADH. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart* 1996; **76**: 28–32.
  - 13 Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1913–20.
  - 14 Stepan CM, Bailey ST, Bhat S *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; **409**: 307–12.
  - 15 Tang NP, Wang LS, Yang L *et al.* A polymorphism in the resistin gene promoter and the risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Clin Endocrinol* 2008; **68**: 82–7.
  - 16 Kim M, Oh JK, Sakata S *et al.* Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**: 270–80.
  - 17 Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, Romero-Aniorte AI *et al.* Prognostic value of two polymorphisms in non-sarcomeric genes for the development of atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *QJM* 2014; **107**: 613–21.
  - 18 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.
  - 19 Dumont C, Monserrat L, Soler R *et al.* Clinical significance of late gadolinium enhancement on cardiovascular magnetic resonance in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2007; **60**: 15–23.
  - 20 Bogaert J, Taylor AM, van Kerckhove F, Dymarkowski S. Use of inversion recovery contrast-enhanced MRI for cardiac imaging: spectrum of applications. *Am J Roentgenol* 2004; **182**: 609–15.
  - 21 Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V *et al.* Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 2002; **105**: 5439–42.
  - 22 Hussain S, Asghar M, Javed Q. Resistin gene promoter region polymorphism and the risk of hypertrophic cardiomyopathy in patients. *Transl Res* 2010; **155**: 142–7.
  - 23 Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 2520–4.
  - 24 Cho YM, Youn BS, Chung SS *et al.* Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentration in humans. *Diabetologia* 2004; **47**: 559–65.
  - 25 Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y *et al.* Novel resistin promoter polymorphisms: association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 2004; **36**: 564–70.
  - 26 Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993; **342**: 1085–6.
  - 27 Tesson F, Dufour C, Moolman JC *et al.* The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 831–8.
  - 28 Dellgren G, Eriksson MJ, Blange I, Brodin LA, Rådegran K, Sylvén C. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism influences degree of left ventricular hypertrophy and its regression in patients undergoing operation for aortic stenosis. *Am J Cardiol* 1999; **15**: 909–13.
  - 29 Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hypertens* 1997; **10**: 921–8.
  - 30 Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA *et al.* AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998; **32**: 825–30.
  - 31 Lindpaintner K, Lee M, Larson MG *et al.* Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1023–8.
- Correspondence:* Diana Hernández-Romero, PhD, or Francisco Marín, Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, El Palmar, Murcia, Spain.  
(fax: 0034-868888115; e-mail: dianahr@um.es or fcomarino@hotmail.com). ■

# Prognostic value of two polymorphisms in non-sarcomeric genes for the development of atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy

E. ORENES-PIÑERO<sup>1</sup>, D. HERNÁNDEZ-ROMERO<sup>1</sup>, A.I. ROMERO-ANIORTE<sup>1</sup>, M. MARTÍNEZ<sup>2</sup>, A. GARCÍA-HONRUBIA<sup>3</sup>, L. CABALLERO<sup>1</sup>, N. GARRIGOS-GÓMEZ<sup>4</sup>, J.M. ANDREU-CAYUELAS<sup>1</sup>, J. GONZÁLEZ<sup>1</sup>, E. FELIU<sup>2</sup>, V. CLIMENT<sup>2</sup>, F. NICOLÁS-RUIZ<sup>5</sup>, G. DE LA MORENA<sup>1</sup>, M. VALDÉS<sup>1</sup>, G.Y.H. LIP<sup>6</sup> and F. MARÍN<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Cardiology, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB), Universidad de Murcia, Murcia, <sup>2</sup>Department of Cardiology, Hospital General Universitario, Alicante, <sup>3</sup>Department of Cardiology, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, <sup>4</sup>Department of Molecular Biology, Centro Inmunológico de Alicante, Alicante, <sup>5</sup>Department of Radioimmunoanalysis, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain and <sup>6</sup>Centre for Cardiovascular Sciences, City Hospital, University of Birmingham, Birmingham, UK

Address correspondence to F. Marín, Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, El Palmar, Murcia, Spain. email: fcomarino@hotmail.com

Received 20 January 2014 and in revised form 21 February 2014

## Summary

**Background:** Several non-sarcomeric genes have been postulated to act as modifiers in the phenotypic manifestations of hypertrophic cardiomyopathy (HCM). The development of atrial fibrillation (AF) in HCM has adverse prognostic implications with increased thromboembolism and functional class impairment.

**Aim:** We tested the hypothesis that 2 non-sarcomeric genes [*CYP11B2* (−344T>C) and *COL1A1* (2046G>T)] are associated with the development of AF.

**Design:** Prospective study.

**Methods:** Two polymorphisms in non-sarcomeric genes [*CYP11B2* (−344T>C) and *COL1A1* (2046G>T)] were analysed in 159 HCM patients (49.3 ± 14.9 years, 70.6% male) and 136 controls. All subjects were clinically stable and in sinus rhythm at entry in the study, without ischemic heart disease or other significant co-morbidities that could mask the effect of the analysed polymorphisms (i.e. previous AF). Thirty-nine patients

(24.4%) developed AF during a median follow-up of 49.5 months.

**Results:** Patients with the −344T>C polymorphism in *CYP11B2* gene had a higher risk for AF development [HR: 3.31 (95% CI 1.29–8.50); *P*=0.008]. In a multivariate analysis, the presence of the C allele in *CYP11B2* gene [HR: 3.02 (1.01–8.99); *P*=0.047], previous AF [HR: 2.81 (1.09–7.23); *P*=0.033] and a left atrial diameter of ≥42 mm [HR: 2.69 (1.01–7.18); *P*=0.048] were independent predictors of AF development. The presence of the polymorphic allele was associated with higher aldosterone serum levels.

**Conclusion:** We have shown for the first time that the *CYP11B2* polymorphism is an independent predictor for AF development in HCM patients. This highlights the importance of non-sarcomeric genes in the phenotypic heterogeneity of HCM. The association with higher aldosterone serum levels could relate to greater fibrosis and cardiac remodelling.

## Introduction

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a monogenic cardiac disease with an autosomal dominant pattern of heritability and different penetrance characterized by cardiomyocyte hypertrophy, myofibrillar disarray and fibrosis.<sup>1,2</sup> The phenotypic expression of HCM is multi-factorial with majority of cases occurring secondary to mutations in genes encoding the sarcomere proteins.<sup>3</sup> However, a group of non-sarcomeric genes have been postulated to act as modifiers in HCM. In particular, polymorphisms in genes encoding proteins of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) and proteins associated with collagen synthesis have attracted much interest.<sup>4</sup>

The RAAS system contributes to ventricular hypertrophy through effects mediated by circulating angiotensin as well as local activation of RAAS in the myocardium.<sup>5</sup> Aldosterone secretion is regulated primarily by the RAAS<sup>6</sup> and it is synthesized from deoxycorticosterone by a mitochondrial cytochrome P450 enzyme, aldosterone synthase (*CYP11B2*).<sup>7</sup> On the other hand, activated fibroblasts are the most important cells depositing type I collagen in all tissues and its excessive synthesis results in fibrosis. Indeed, transcription of collagen type I, alpha 1 (*COL1A1*) gene is increased 3- to 10-fold in activated fibroblasts.<sup>8,9</sup>

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia in patients with HCM.<sup>10</sup> The onset of AF represents an adverse prognostic feature for HCM patients, conferring an increased mortality and morbidity.<sup>11</sup> AF independently increases the risk of ischemic stroke by approximately 4-fold, and is also associated with heart failure and death from any cause.<sup>11</sup>

In this study, we tested the hypothesis that two non-sarcomeric genes [*CYP11B2* (–344T>C), SNP ID Number: rs1799998; and *COL1A1* (2046G>T), SNP ID Number: rs1800012] are associated with the development of AF.

## Methods

We prospectively recruited 159 HCM patients (49.3 ± 14.9 years, 70.6% males), included after performing a cardiac magnetic resonance (CMR) and 136 healthy controls from three referral centres in southeastern Spain. Patients and controls were clinically stable at entry in the study, without ischemic heart disease or presence of any other significant co-morbidities (i.e. valvular disease or severe hypertension) that could mask the effect of the analysed polymorphisms. The diagnosis of HCM was based on the presence of unexplained left

ventricular hypertrophy, or in accordance with criteria for the diagnosis of familial disease in patients with at least one first-degree relative who has an unequivocal diagnosis.<sup>12</sup> A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram (ECG), standard echocardiography, symptom limited treadmill exercise (Bruce protocol), 24-h electrocardiogram-Holter monitoring and a blinded magnetic resonance study. All patients were included in the study after CMR, so patients with pacemakers and ICDs were excluded because it is not recommended to perform CMRs in patients with implantable devices. All recruited subjects gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the local Research Committees (Ethic Committee of Clinic Investigation of the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca on 24 April 2009 for the project entitled 'Hypertrophic cardiomyopathy and tissue remodelling: role of biomarkers') in accordance with the Declaration of Helsinki, as amended in Edinburgh in 2000.

AF was documented by 12-lead ECG when patients attended our hospital with symptoms of palpitation, dyspnoea and/or chest discomfort, and if asymptomatic, during regular follow-up visits at the dedicated HCM clinics. An episode of AF of 2 min or more was considered as 'AF development' and patients were followed up for a median of 49.5 [interquartile range (IQR) 25.8–77.0] months.

## Blood samples and laboratory assays

Venous blood was collected without trauma or stasis in the morning, by specialized staff, with the patient fasting for >12 h. Buffy coat was obtained from plasma samples by centrifugation for 15 min at 3500 g. Aliquots were stored at –80°C to allow batch analysis in a blinded fashion. DNA from peripheral blood was extracted using DNeasy Blood and Tissue kit and the QIAcube system (Qiagen, Valencia, CA, USA). After DNA extraction, PCR products were separated by electrophoresis on 3% agarose gels and visualized by ethidium bromide. The analysis of the SNPs rs1799998 (*CYP11B2*) and rs1800012 (*COL1A1*) was approached by allelic discrimination using TaqMan probes on real time PCR (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Primers and probes are commercially available from Applied Biosystems. Standard PCR conditions, with 60°C of annealing temperature, were applied. Sequencing reactions were done by BigDye terminator vs3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analysed by capillary electrophoresis using the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).



## Aldosterone measurement

Serum aldosterone levels were measured in the 159 patients using a competitive radioimmunoassay (Immunotech SAS, Marseille, France). In brief, 50  $\mu$ l of serum samples and calibrators were incubated using antibody coated tubes with 500  $\mu$ l of tracer labelled with  $I^{125}$ . After 3 h of incubation with continuous shaking, the content of the tubes were sucked and then, the radioactivity was determined using a gamma counter. A standard curve was developed and aldosterone values were determined by interpolation with the curve.

## Cardiac magnetic resonance

All CMR images were obtained with a 1.5-T system (Gyrosan NT; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) in conjunction with a phased-array body coil and electrocardiogram gating. Scout images were obtained in three orthogonal planes to determine the exact position and axis of the left ventricle. Delayed contrast-enhanced images were acquired 10 min after the injection of the contrast material according to a previous report,<sup>13</sup> with an inversion recovery T1-weighted sequence (repetition time/echo time ms, 8/4.5, flip angle 15°, (Field of view), 400 mm; matrix, 144  $f \times 256$ ; and section thickness, 10 mm) in three short-axis views taken at the base, midpapillary muscles. The time of inversion was adjusted for each patient between 200 and 400 ms to achieve optimal suppression of normal myocardium.<sup>14</sup> All CMR images were analysed on a satellite workstation console with commercial image post-processing software (EasyVision, version 4.0; Philips Medical Systems and Mass Suite 6.1; MEDIS Medical Imaging Systems, Leiden, The Netherlands) by two observers with experience in cardiac MR imaging, whose joint opinion was reached by consensus. The CMR studies were read by experienced observers blinded to the clinical information. The American Heart Association 17-segment model for the left ventricle<sup>15</sup> was used to analyse wall thickness, contractile function and delayed enhancement per segment. Late gadolinium enhancement (LGE) was considered present when the signal intensity of any area within the myocardium was highly hyperintense and persists in the same slice after swapping the phase encoding in order to exclude artefact images.

## 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 (IQR). The comparison of discrete variables was done by  $\chi^2$  test or Fisher test (as appropriate). Comparisons of the groups for continuous variables were performed with analysis of variance test or the Kruskal–Wallis test (as appropriate). Receiver operating characteristic (ROC) curves analyses were generated to test the predictive discrimination of different continuous variables (i.e. age and left atrial diameter) to identify AF development during follow-up. We constructed areas under the ROC for sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. The cut-off point with the best sensitivity and specificity was chosen for each case, as assessed by receiver–operator characteristic curves. We analysed those variables associated with AF development. The overall AF occurrence-free survival rates were calculated using the Kaplan–Meier method, and differences determined using the log-rank test. The effect on prognosis was calculated for several clinical, echocardiographic, effort test, Holter and CMR variables by using a Cox proportional hazards regression. Only variables showing  $P$ -values  $<0.15$  were included in the multivariate Cox hazard model. All  $P$ -values  $<0.05$  were accepted as independently predictive for the AF outcome. Statistical analyses were performed using SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL).

## Results

A total of 159 HCM patients ( $49.3 \pm 14.9$  years, 70.6% males) (Table 1) and 136 controls were included. Data on genotype frequencies in patients and controls of *CYP11B2* (–344T>C) and *COL1A1* (2046G>T) polymorphisms are listed in Table 2. There were no significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium in the HCM patient and control group ( $P > 0.05$ ). Allele and genotype frequencies did not differ markedly between patients and controls and were similar to previously reported numbers in normal Caucasian populations.<sup>9,16,17</sup>

## AF development during follow-up

During follow-up, 39 patients (24.4%) developed AF, with an annual rate of 9.75%/year. Survival analysis (Cox regression) showed that the presence of the polymorphism in the *CYP11B2* gene promoter region was significantly associated with a higher risk of developing AF in HCM patients [HR: 3.31 (95% CI 1.29–8.50);  $P = 0.008$ ] (Figure 1A). The presence of the polymorphism in the *COL1A1* (2046G>T) gene showed a non-significant trend towards a

**Table 1** Demographic and clinical baseline characteristics of the patients included in the analysis of the two polymorphisms in non-sarcomeric genes

| Variables                                 | Total patients (159) | Patients with AF (39) | Patients without AF (120) |
|---|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Age                                       | 49.3 ± 14.9          | 53.5 ± 11.1           | 47.6 ± 15.9               |
| Sex male (%)                              | 112 (70.6)           | 29 (74.4)             | 85 (70.8)                 |
| Hypertension (%)                          | 53 (33.3)            | 15 (38.5)             | 38 (31.7)                 |
| Diabetes mellitus (%)                     | 13 (8.2)             | 4 (10.2)              | 9 (7.5)                   |
| NYHA class II–IV (%)                      | 72 (45.2)            | 21 (53.8)             | 51 (42.5)                 |
| Previous syncope (%)                      | 16 (10.1)            | 3 (7.7)               | 13 (10.8)                 |
| Previous AF (%)                           | 21 (13.2)            | 11 (28.2)             | 10 (8.3)                  |
| Previous angina (%)                       | 36 (22.6)            | 8 (20.5)              | 38 (23.3)                 |
| Maximum LV wall thickness (mm)            | 20.1 (17.2–24.5)     | 20.4 (15.0–26.0)      | 20.7 (13.0–31.0)          |
| Obstructive (gradient >30 mm Hg) (%)      | 57 (35.8)            | 13 (33.3)             | 44 (36.7)                 |
| LV ejection fraction (%)                  | 69.4 ± 9.8           | 67 ± 8.2              | 70.4 ± 9.7                |
| Non-sustained ventricular tachycardia (%) | 54 (33.9)            | 14 (35.9)             | 40 (33.3)                 |
| Left atrial diameter (mm)                 | 42.2 ± 7.4           | 45.9 ± 8.3            | 41.0 ± 6.8                |
| Number of LGE segments/patient            | 2.0 (0–5.2)          | 3.8 (0–9.0)           | 2.8 (0–11.0)              |
| Drugs                                     |                      |                       |                           |
| ACE inhibitors (%)                        | 12 (7.5)             | 3 (7.7)               | 9 (7.5)                   |
| ARBs (%)                                  | 16 (10.1)            | 2 (5.1)               | 14 (11.7)                 |
| Beta-blockers (%)                         | 119 (71.9)           | 28 (71.8)             | 91 (75.8)                 |
| Disopiramide (%)                          | 11 (6.9)             | 2 (5.1)               | 9 (7.5)                   |

NYHA, New York Heart Association; LV, Left ventricle; ACE inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors. ARBs, angiotensin II receptor blockers. Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation or median (25th–75th percentiles).

**Table 2** Genotype frequencies of *CYP11B2* (–344T>C) and *COL1A1* (2046G>T) polymorphisms showed no significant differences between patients and controls

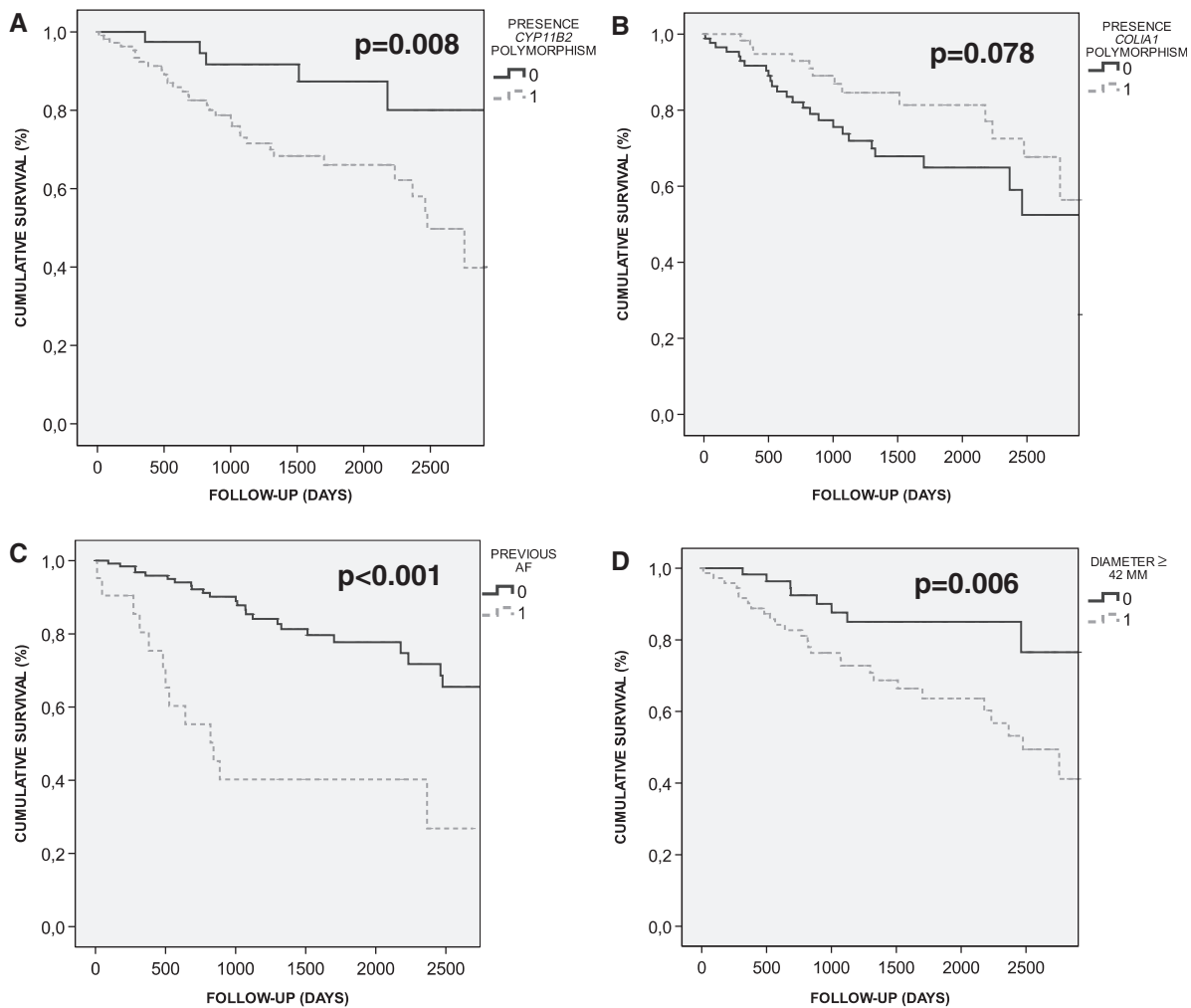
| Genotype frequency | Patients (n = 159) | Percentage (%) | Controls (n = 136) | Percentage (%) | P-value |
|--------------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|---------|
| <i>CYP11B2</i>     |                    |                |                    |                |         |
| T/T                | 42                 | 26.4           | 42                 | 30.9           | 0.698   |
| T/C                | 81                 | 50.9           | 65                 | 47.8           |         |
| C/C                | 36                 | 22.6           | 29                 | 21.3           |         |
| Total              | 159                | 100            | 136                | 100            |         |
| <i>COL1A1</i>      |                    |                |                    |                |         |
| G/G                | 91                 | 57.2           | 93                 | 68.4           | 0.086   |
| G/T                | 57                 | 35.8           | 39                 | 28.7           |         |
| T/T                | 11                 | 6.9            | 4                  | 2.9            |         |
| Total              | 159                | 100            | 136                | 100            |         |

lower risk of developing AF [HR: 0.55 (95% CI 0.28–1.08);  $P=0.078$ ] (Figure 1B).

Other potential predictors of AF development using univariate Cox regression analysis including several clinical and demographic variables are shown in Table 3. The presence of previous AF [HR: 4.41 (95% CI 2.22–8.67);  $P<0.001$ ] (Figure 1C), a left atrial diameter of  $\geq 42$  mm [HR: 2.89 (95% CI 1.31–6.34);  $P=0.008$ ] (Figure 1D) and age [HR: 1.03 (95% CI 1.00–1.05);  $P=0.030$ ] were also significantly associated with AF development.

The presence of LGE or sex was not associated with AF development. Both gene polymorphisms were not significantly associated with left atrial diameter (both  $P>0.05$ ; data not shown).

On multivariate analysis (Table 3), the presence of the polymorphism in the *CYP11B2* (–344T>C) gene promoter region [HR: 3.02 (95% CI 1.01–8.99);  $P=0.047$ ], previous AF [HR: 2.81 (95% CI 1.09–7.23);  $P=0.033$ ] and left atrial diameter of  $\geq 42$  mm [HR: 2.69 (95% CI 1.01–7.18);  $P=0.048$ ] were independent predictors for AF development.



**Figure 1.** Kaplan–Meier cumulative survival free of AF development curve in the univariate analyses. This figure indicates the effect of different demographic, clinical and genetic variables on AF development during follow-up in HCM patients. 0 implies absence and 1 implies presence. (A) The presence of the polymorphic allele of *CYP11B2* gene (–344C) is associated with increased AF occurrence due to higher aldosterone biosynthesis; (B) the presence of the polymorphic allele of *COL1A1* gene (2046T) shows a trend towards protective role; (C) previous AF is associated with poor event-free survival; and (D) left atrial diameter of  $\geq 42$  mm is also associated with AF development during follow-up.

### Aldosterone levels are influenced by *CYP11B2* polymorphism

An increase in aldosterone levels was associated with the presence of the polymorphic allele *CYP11B2* (–344C) ( $P < 0.001$ ) in 159 HCM patients (72.5% men, mean age  $49.8 \pm 15.3$ ). Patients carrying the wild type allele (TT) showed a median concentration of aldosterone of 52 pg/ml (IQR 31–60), whereas patients carrying one polymorphic allele (TC) showed a median of 95.5 pg/ml (IQR 70.2–127.5). Patients with the two polymorphic alleles (CC) showed the highest levels of aldosterone in serum (median 209.5, IQR 155.7–268.7) (Figure 2). Kruskal–Wallis test was performed to confirm that aldosterone levels were significantly

associated with the presence of the polymorphic allele *CYP11B2* (Figure 2).

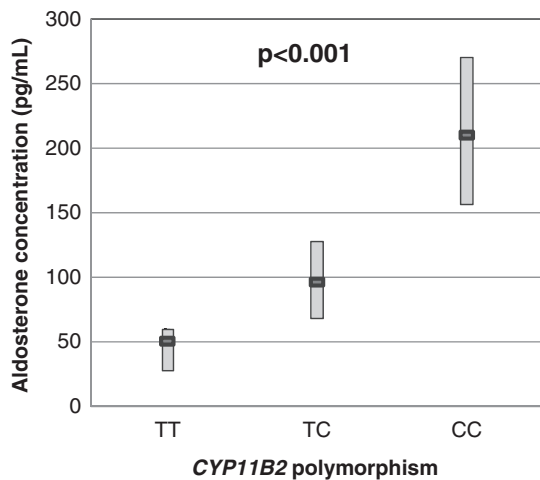
### Discussion

This is the first study to show that *CYP11B2* gene polymorphism (–344T>C) in the aldosterone synthase gene is an independent predictor of AF development in HCM patients. This polymorphism is located in the transcriptional regulatory region of *CYP11B2*, 344 nucleotides before the start of the protein coding sequence. This position can be either a thymine or cytosine (–344T>C). Of note, this polymorphism in the *CYP11B2* promoter region has been previously associated with atrial

**Table 3** Association of different demographic, clinical and genetic variables with AF development during follow-up

| Variable                                      | Univariate              |                  | Multivariate            |              |
|---|-------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
|   | HR (95% CI)             | P                | HR (95% CI)             | P            |
| Age   | <b>1.03 (1.00–1.05)</b> | <b>0.030</b>     | 1.01 (0.97–1.03)        | 0.832        |
| Sex   | 1.18 (0.58–2.39)        | 0.642            |                         |              |
| Previous AF                                   | <b>4.41 (2.22–8.67)</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>2.81 (1.09–7.23)</b> | <b>0.033</b> |
| Atrial diameter $\geq$ 42 mm                  | <b>2.89 (1.31–6.34)</b> | <b>0.006</b>     | <b>2.69 (1.01–7.18)</b> | <b>0.048</b> |
| Late gadolinium enhancement                   | 1.01 (0.92–1.12)        | 0.785            |                         |              |
| Presence <i>COL1A1</i> polymorphism           | 0.55 (0.28–1.08)        | 0.078            | 0.61 (0.28–1.34)        | 0.219        |
| Presence <i>CYP11B2</i> polymorphism          | <b>3.31 (1.29–8.50)</b> | <b>0.008</b>     | <b>3.02 (1.01–8.99)</b> | <b>0.047</b> |
| Hypertension                                  | 1.54 (0.79–2.98)        | 0.199            |                         |              |
| Non sustained ventricular tachycardia         | 0.99 (0.51–1.92)        | 0.982            |                         |              |
| Abnormal blood pressure response <sup>a</sup> | 0.81 (0.40–1.64)        | 0.550            |                         |              |
| Maximum left ventricular thickness            | 1.02 (0.95–1.09)        | 0.617            |                         |              |
| Left ventricular ejection fraction (%)        | 0.98 (0.95–1.01)        | 0.164            |                         |              |
| Obstructive (gradient >30 mmHg)               | 0.96 (0.50–1.85)        | 0.902            |                         |              |
| ACE inhibitors                                | 1.08 (0.33–3.53)        | 0.903            |                         |              |
| ARBs  | 0.42 (0.09–1.93)        | 0.266            |                         |              |
| Disopiramide                                  | 0.29 (0.04–2.34)        | 0.244            |                         |              |

LV, left ventricle; ACE inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs, angiotensin II receptor blockers. Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median (25th–75th percentiles). <sup>a</sup>On effort testing.



**Figure 2.** Influence of aldosterone synthase gene (*CYP11B2*) on aldosterone serum levels. Aldosterone serum levels in 159 patients with HCM. Patients were segregated depending on the polymorphism in aldosterone synthase gene (*CYP11B2*) (TT, wild type; TC, heterozygote; CC, polymorphic gene). Median and IQRs (25th and 75th) are represented for each genotype.

remodelling in a series of hypertensive patients<sup>18</sup> or with AF development in heart failure patients.<sup>17</sup> Indeed, our observations highlight the role of the *CYP11B2* gene polymorphism in the secretion of serum aldosterone and confirm the results obtained in the multivariate analysis regarding the role of the polymorphic gene and AF development.

One recent study, investigating polymorphisms of RAAS genes in patients with different variants of HCM and their effects on morphofunctional parameters of the heart, failed to find a relationship between *CYP11B2* gene (–344T>C) polymorphism and the development of AF in a cohort of HCM patients.<sup>19</sup>

As a member of the RAAS, aldosterone is the principal mineralocorticoid hormone and has been shown to play a major role in cardiac fibrosis and remodelling.<sup>18</sup> Aldosterone can directly induce myocardial cell hypertrophy via activation of the mineralocorticoid receptors, a member of the steroid/thyroid/retinoid nuclear receptor family of ligand-dependent transcription factors.<sup>20</sup> More specifically, aldosterone is produced in the heart, particularly in HCM subjects because their cardiac aldosterone synthase (*CYP11B2*) mRNA levels are 7-fold increased as compared with age- and gender-matched normal donor hearts.<sup>21</sup> Recent reports suggest that aldosterone may also be involved in atrial structural and electrical remodelling by increasing collagen biosynthesis and cardiomyocytes apoptosis.<sup>19,22</sup> In addition, blockade of the aldosterone receptor using spironolactone prevents the incidence of AF, perhaps offering a new therapeutic approach for this arrhythmia.<sup>23</sup>

Although there are conflicting data about the functional significance and clinical implications, some studies suggest that –344T>C *CYP11B2*

polymorphism is associated with increased constitutive aldosterone production<sup>24</sup> which subsequently leads to cardiac fibrosis and remodelling, being a molecular target for the pathogenesis of left ventricular hypertrophy, amongst other cardiovascular diseases.<sup>25</sup> The  $-344T>C$  polymorphism in the aldosterone synthase gene is located immediately adjacent to a binding site for a transcription factor, SF-1, that is thought to be essential for expression of steroid biosynthetic enzymes in the adrenal cortex.<sup>26</sup> *In vitro*, the  $-344C$  allele binds SF-1 approximately 4-fold more strongly than does the  $-344T$  allele and has been demonstrated to affect the transcription of *CYP11B2* increasing aldosterone production as well as serum aldosterone level.<sup>24</sup> Importantly, high expression of the aldosterone synthase gene induced by the presence of the  $344C$  allele may cause a high tissue aldosterone concentration, which subsequently causes atrial fibrosis, conduction heterogeneity and increased the substrate for the development of AF. Importantly, we have shown in this study that the levels of serum aldosterone are significantly associated with the presence of the polymorphic allele in the *CYP11B2* gene in our cohort of HCM patients (Figure 2).

We found that a left atrial diameter of  $\geq 42$  mm was also independently associated with AF development in HCM patients, consistent with previous reports indicating that left atrial size is an independent risk factor of AF development,<sup>17</sup> even in HCM patients. The most common form of AF is associated with structural and electrical changes, given that the longer the AF persists, the more difficult it is to restore sinus rhythm and to prevent recurrence. Indeed, 'AF begets AF', so that AF alters atrial electrophysiology in a way that favours AF initiation and maintenance.<sup>27</sup> In this setting, we confirm that the presence of previous AF is another variable associated with AF development during follow-up. It is important to remark that, in the multivariate analysis the association of the C allele in *CYP11B2* gene with the occurrence of AF was of a borderline significance. This decreasing of significance of this genetic variable as compared with the univariate analysis can be assumed as previous AF is a more powerful predictor of AF development as previously described in the literature.<sup>28</sup>

We have observed that the presence of the *COL1A1* (2046G>T) polymorphism was associated with a non-significant trend towards a protective role for AF development in HCM patients on the univariate analysis. This polymorphism was identified in a regulatory region of *COL1A1* (2046G>T) at a recognition site for the transcription factor Sp1 that is significantly related to collagen synthesis.<sup>9</sup>

TT homozygotes have significantly lower bone mineral density, reflecting lower collagen synthesis due to the presence of the T allele.<sup>9</sup>

This study has several limitations. Although our study was conducted in three different hospitals, all patients and controls were Caucasians, and the data should not be extrapolated to other ethnic groups. Indeed, the frequency of the C allele in the *CYP11B2* gene is lower in people of African origin than white and South Asian subjects.<sup>29</sup> Second, this study is relatively small, and larger studies are required to confirm our observations. Moreover, patients and control in our cohorts were not comparable in age and sex; however, all the analyses were developed in the patient cohort and this limitation shows less importance. Third, patients could not be included consecutively because only patients with HCM and with CMR were selected for this study, which could result in a selection bias. Finally, as asymptomatic AF detection may be extremely difficult, although a complete history and clinical examination was performed including not only routine 12-lead ECG but also a 24-h ECG Holter, some asymptomatic AF patients can be missed in this study.

## Conclusion

We have shown for the first time that the *CYP11B2* polymorphism is an independent predictor for AF development in HCM patients. This highlights the importance of non-sarcomeric genes in the phenotypic heterogeneity of HCM. This is a pilot study and despite the promising results, further analyses with larger cohorts are needed to assess the importance of this polymorphism.

## Funding

This work was supported by an FIS PS09/00721 project for the 'Instituto de Salud Carlos III', partially by Funding FEDER and by Department of Molecular Biology, Centro Inmunológico de Alicante (Spain). Dr Orenes-Piñero is supported by a postdoctoral contract from 'Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia', Murcia, Spain. Dr Hernández-Romero is supported by a postdoctoral contract from 'Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, IMIB', Murcia, Spain. Until January 2014, she held a 'Sara Borrell' contract from the Instituto de Salud Carlos III. Ana Romero has a contract of support to clinical investigation (RAIC-Mur) from 'Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia', Murcia, Spain. Dr Luis Caballero is

supported by a Rio Hortega grant by the 'Instituto de Salud Carlos III' (Spain).

*Conflict of interest:* None declared.

## References

- Pedrosa RP, Drager LF, Genta PR, Amaro AC, Antunes MO, Matsumoto AY, *et al.* Obstructive sleep apnea is common and independently associated with atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Chest* 2010; **137**:1078–84.
- Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004; **363**:1881–91.
- Kaufman BD, Auerbach S, Reddy S, Manlhiot C, Deng L, Prakash A, *et al.* RAAS gene polymorphisms influence progression of pediatric hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genet* 2007; **122**:515–23.
- Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schröder D, *et al.* 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**:270–5.
- Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, *et al.* 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**:2457–62.
- White PC. Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med* 1994; **331**:250–8.
- Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, *et al.* The product of the *CYP11B2* gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 1991; **5**:1513–22.
- Challa AA, Vukmirovic M, Blackmon J, Stefanovic B. Withaferin-a reduces type I collagen expression in vitro and inhibits development of myocardial fibrosis in vivo. *PLoS One* 2012; **7**:e42989.
- Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 1996; **14**:203–5.
- Varnava AM, Elliott PM, Mahon N, Davies MJ, McKenna WJ. Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2001; **88**:275–9.
- Wolf P, Abbott R, Kannel W. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham study. *Stroke* 1991; **22**:983–8.
- 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.
- Dumont CA, Monserrat L, Soler R, Rodríguez E, Fernández 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.
- Bogaert J, Taylor AM, Van Kerckhove F, Dymarkowski S. Use of inversion recovery contrast-enhanced MRI for cardiac imaging: spectrum of applications. *Am J Roentgenol* 2004; **182**:609–15.
- 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 healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 2002; **105**:5439–42.
- Stella P, Bigatti G, Tizzoni L, Barlassina C, Lanzani C, Bianchi G, *et al.* Association between aldosterone synthase (*CYP11B2*) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**:265–70.
- Amir O, Amir RE, Paz H, Mor R, Sagiv M, Lewis BS. Aldosterone synthase gene polymorphism as a determinant of atrial fibrillation in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 2008; **102**:326–9.
- Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Guarda E, Zhou G, Sriram K. Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone. *Basic Res Cardiol* 1993; **88**:107–24.
- Belenkov YN, Privalova EV, Kaplunova VY, Stambol'skiĭ DV, Fomin AA. Analysis of morpho-functional parameters of the heart and polymorphisms of Renin-Angiotensin-aldosterone system genes in patients with different variants of the course of hypertrophic cardiomyopathy. *Kardiologiya* 2010; **50**:27–34.
- Yoshida Y, Morimoto T, Takaya T, Kawamura T, Sunagawa Y, Wada H, *et al.* Aldosterone signaling associates with p300/GATA4 transcriptional pathway during the hypertrophic response of cardiomyocytes. *Circ J* 2010; **74**:156–62.
- Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, *et al.* Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; **109**:1284–91.
- Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, *et al.* Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:758–70.
- Zhao J, Li J, Li W, Li Y, Shan H, Gong Y, *et al.* Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol* 2010; **159**:1584–94.
- Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, *et al.* Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; **11**:856–60.
- Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, Jover E, Valdés M, Lip GY, Marín F. Impact of polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; **12**:521–30.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 1992; **6**:1249–58.
- Orenes-Piñero E, Montoro-García S, Banerjee A, Valdés M, Lip GY, Marín F. Pre and post-operative treatments for

*Polymorphisms associated to AF development in HCM*

- prevention of atrial fibrillation after cardiac surgery. *Mini Rev Med Chem* 2012; **12**:1419–31.
28. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; **92**:1954–68.
29. Barbato A, Russo P, Siani A, Folkerd EJ, Miller MA, Venezia A, *et al.* Aldosterone synthase gene (*CYP11B2*) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. *J Hypertens* 2004; **22**:1895–901.

## **Clinical implications of non sarcomeric gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy**

Running title: Non sarcomeric gene polymorphisms in HCM

Antonio García-Honrubia<sup>1</sup> MD; Diana Hernández-Romero<sup>2\*</sup> PhD; Esteban Orenes-Piñero<sup>2</sup> PhD; Ana Isabel Romero-Aniorte<sup>2</sup> BNSc; Vicente Climent<sup>3</sup> MD, PhD; Miriam García<sup>4</sup> PhD; Noemí Garrigos-Gómez<sup>4</sup> PhD; Concepción Moro<sup>5</sup> MD, PhD; Mariano Valdés<sup>2</sup> MD, PhD; Francisco Marín<sup>2</sup> MD, PhD.

<sup>1</sup>Department of Cardiology, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain;

<sup>2</sup>Department of Cardiology, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, University of Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain

<sup>3</sup>Department of Cardiology, Hospital General Universitario, Alicante, Spain;

<sup>4</sup>Department of Molecular Biology, Centro Inmunológico de Alicante, Spain

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Alcalá, Madrid, Spain.

### **\*Address for corresponding:**

Diana Hernández-Romero PhD

Department of Cardiology

Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca

Ctra Madrid-Cartagena, s/n, Murcia 30120, Spain

e-mail: [dianahr@um.es](mailto:dianahr@um.es) Phone: +34 868888151; Fax: +34 868888115

**Word count** : 1853



## **Abstract**

**Introduction:** Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterized by cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis. Although is an autosomal dominant trait, a group of non-sarcomeric genes have been postulated as modifiers of the phenotypic heterogeneity.

**Material and Methods:** We prospectively recruited 168 HCM patients and 136 healthy controls from 3 referral centres. Patients and controls were clinically stable at entry in the study. Nine polymorphisms previously associated with ventricular remodeling were determined: I/D ACE, AGTR1(A1666C), CYP11B2(C344T), PGC1- $\alpha$ (G482S), COL1A1(G2046T), ADRB1(R389G), NOS3(G894T), RETN(-420C>G), CALM3(-34T>A). Their potential influence on prognosis, assessed by hospital admissions and their cause were recorded.

**Results:** The median follow-up time was 49.5 months. Allele and genotype frequencies did not differ between patients and controls. Thirty six patients (21.5%) required urgent hospitalization (18.5% for heart failure, 22.2% for atrial arrhythmias, 11.1% for ventricular arrhythmias, 29.6% for ischemic heart disease, 14.8% for stroke and 3.7% for other reasons) with a hospitalization rate of 8.75% per year. Multivariate analysis showed an independent predictive value for non-carriers of polymorphic COL1A1 allele [HR:2.76(1.26-6.05), p=0.011] and a trend in homozygous carriers of ADRB1 Arg389 variant [HR:1.98(0.99-4.02); p=0.057].

**Conclusion:** Our study suggests that COL1A1 polymorphism (2046G>T) is an independent predictor of prognosis in HCM patients supporting the importance of non-sarcomeric genes on clinical prognosis in HCM.

**Key Words**

Polymorphisms, non-sarcomeric genes, hypertrophic cardiomyopathy, prognosis.

## **Introduction**

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a relatively common cardiovascular disease with a reported prevalence of 0.02-0.23% in adults. HCM is defined by the presence of increased left ventricular wall thickness that is not solely explained by abnormal loading conditions (1). Cardiomyocyte hypertrophy, myofibrillar disarray and fibrosis are the main structural characteristics (2).

Clinical presentation and course show a marked heterogeneity (1), while its pathogenesis is not completely understood with different pathophysiological pathways proposed and several biomarkers identified (3). Patients may remain asymptomatic or stable over long periods of time with normal longevity. However, many patients may suffer adverse clinical events with potential premature death. Sudden cardiac death due to ventricular tachyarrhythmia is probably the most dreaded complication and, hence, has focused most efforts (4). In addition, heart failure, cardiac arrhythmias and stroke are the most common events for clinical admission in HCM patients (5, 6).

Mutations in cardiac sarcomeric protein genes with an autosomal dominant pattern of heritability are the most frequent aetiology. However, a group of non-sarcomeric genes have been postulated to act as modifiers in HCM which could explain the observed heterogeneity. In particular, polymorphisms in genes encoding proteins of the renin-angiotensin-aldosterone system (7), proteins associated with collagen synthesis (8) and  $\beta$ 1-adrenergic receptor gene (9) have attracted much interest. Recently, non-sarcomeric proteins related with inherited heart disease have also been related and have rekindled interest in this field (10). We performed a research project to identify potential candidate polymorphisms in non-sarcomeric proteins that could be associated with the clinical prognosis in HCM patients [Table 1].

We therefore hypothesized that the cited non-sarcomeric genes are associated with the clinical prognosis in HCM patients.

## **Material and Methods**

We prospectively recruited HCM patients after performing cardiac magnetic resonance (CMR) and healthy controls from 3 referral centres in south-eastern Spain. Patients and controls were clinically stable at entry in the study, without ischemic heart disease or presence of any other significant comorbidities that could mask the effect of the analyzed polymorphisms. The diagnosis of HCM was based on the presence of unexplained left ventricular hypertrophy  $\geq 15$  mm, or in accordance with criteria for the diagnosis of familial disease in patients with at least one first-degree relative who has an unequivocal diagnosis (1). A complete history and clinical examination was performed, including 12-lead electrocardiogram, standard echocardiography, symptom limited treadmill exercise (Bruce protocol), 24 hour electrocardiogram-Holter monitoring and a blinded magnetic resonance study. All patients were included in the study after CMR, so patients with previous pacemakers or implantable cardioverter-defibrillators (ICD) were excluded.

All recruited subjects gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. The study was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki, as amended in Edinburgh in 2000.

During follow up, deaths and all urgent hospitalizations and their cause were recorded. Urgent hospitalization was defined as any non-scheduled hospital admission in which the patient had to stay at least one night. Heart failure diagnosis was based on related signs and symptoms. Atrial and ventricular arrhythmias were documented with surface electrocardiogram. Sudden cardiac death was defined as an unexpected death due to

cardiac causes that occurs within 1 hour of symptom onset. Cardiac ischemic event was established with the combination of usual clinical, electrocardiographic or enzymatic manifestations. Stroke diagnosis was assessed with signs, symptoms and neuroimaging.

### **Blood samples and laboratory assays**

Venous blood was collected without trauma or stasis in the morning, by specialized staff, with the patient fasting for >12 hours. Buffy coat was obtained from plasma samples by centrifugation for 15 minutes at 3500g. Aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to allow batch analysis in a blinded fashion. DNA from peripheral blood was extracted using DNeasy Blood and Tissue kit and the QIAcube system (Qiagen, Valencia, CA, USA). After DNA extraction, PCR products were separated by electrophoresis on 3% agarose gels and visualized by ethidium bromide. The analysis of the SNPs was approached by allelic discrimination using TaqMan probes on real time PCR (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Primers and probes are commercially available from Applied Biosystems. Standard PCR conditions, with  $60^{\circ}\text{C}$  of annealing temperature, were applied. Sequencing reactions were done by BigDye terminator vs3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed by capillary electrophoresis using the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **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). The comparison of discrete variables was done by  $\chi^2$  test or Fisher test (as appropriate). Comparisons of continuous variables among different discrete variables were performed by ANOVA test (or Kruskal Wallis as appropriate).

The effect on prognosis was calculated for several clinical, echocardiographic, effort test, Holter and CMR variables by using a Cox proportional hazards regression. Only variables showing p values  $<0.15$  were included in the multivariate Cox hazard model. All p values  $<0.05$  were accepted as independently predictive for the AF outcome. Statistical analyses were performed using SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

## Results

A total of 168 HCM patients ( $49.8 \pm 15.2$  years, 70.8% males) [Table 2] and 136 controls were included. The median follow-up time was 49.5 months (IQR 25.8-77.0).

Allele and genotype frequencies did not differ markedly between patients and controls and were similar to previously reported numbers in normal Caucasian populations (21,22). There were no significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium in the HCM patient and control group ( $p > 0.05$ ). Causal sarcomeric mutations were analyzed for 115 (68.4%) of our patients, and we were able to identify them in 69 (41.1%) patients.

Thirty six patients (21.4%) required urgent hospitalization during follow-up: 5 (13.9%) for heart failure, 10 (27.8%) for atrial arrhythmias, 3 (8.3%) for ventricular arrhythmias, 8 (22.2%) for cardiac ischemic event, 5 (13.9%) for stroke and 5 (13.9%) for other reasons (one for syncope, one for palpitations and 3 non cardiovascular-related) with a hospitalization rate of 8.75% per year. There were no sudden cardiac deaths during follow-up among our patients.

Age [HR: 1.03 (95% CI 1.00-1.06);  $p=0.023$ ] and male sex [HR: 2.31 (95% CI 1.97-4.47);  $p=0.013$ ], were significantly associated with urgent hospitalization. Related to analyzed polymorphisms in non-sarcomeric proteins, survival analysis (Cox regression) showed that non-carriers of polymorphic COL1A1 allele (COL1A1 G/G) presented higher urgent hospitalization rate [HR: 2.67 (IC95% 1.25-5.68);  $p=0.011$ ] as did homozygous carriers of ADRB1 Arg (C) allele (ADRB1 C/C) ([HR: 2.16 (1.11-4.21);  $p=0.024$ ], [Table 3]. For the rest of the studied polymorphisms we did not find any significant association. Hence, we focused on deep into these two polymorphisms. Data



on genotype frequencies patients and controls of COL1A1 (2046G>T) and ADRB1 (R389G) polymorphisms are listed in Table 4.

Non-carriers of polymorphic COL1A1 and homozygous carriers of the Arg389 variant in ADRB1 gene had a worse event-free survival at follow-up. [Log rank  $p=0.08$  and  $0.020$ , respectively (Fig 1A and 1B, respectively)].

No association with prognosis was found for causal sarcomeric mutations. After adjusting for demographic and clinical variables, age [HR: 1.03 (95% CI 1.00-1.05);  $p=0.047$ ] and non-carriers of polymorphic COL1A1 allele [HR: 2.76 (1.26-6.05),  $p=0.011$ ] remained as independent predictive variables. Meanwhile, homozygous carriers of the Arg389 variant in ADRB1 gene exhibited a clear trend [HR: 1.98 (0.99-4.02);  $p=0.057$ ], [Table 5].

## **Discussion**

This is the first study to show that polymorphic COL1A1 (2046T) allele is an independent predictor of better prognosis through less urgent hospitalization in HCM patients.

This polymorphism affects a binding site for the transcription factor Sp1 within the first intron of the COL1A1 gene, in a region that has been previously shown to be important for regulation of collagen transcription. Functional effects on collagen gene regulation that leads to abnormal production of collagen and reduced bone strength by affecting bone density and quality have been previously described (16). In fact, it is associated with reduced bone mineral density and could predispose to incident vertebral fractures in women, independent of bone mineral density (23). Musculoskeletal soft tissue pathologies as cruciate ligament ruptures, shoulder dislocation (24) and pelvic organ prolapse in women (25) have also been associated. On cardiovascular pathophysiology, it has been proposed to play a role in the regulation of arterial compliance (26) and on myocardial infarction (27). However, there are also reports indicating the lack of these associations and the functionality of this polymorphism is still controversial. Extracellular matrix is a dynamic structure involved in the control of numerous cellular functions and plays a central role in myocardial adaptation to stress by facilitating cardiac remodeling (28). Increased extracellular matrix leads to interstitial fibrosis under increasing amounts of collagen type I and III (29). In fact, collagen turnover is enhanced in HCM patients and collagen type I synthesis prevails over its degradation (30,31). Furthermore, in a previous study we investigated the implications of collagen peptides in tissue remodeling and clinical prognosis (32). We found that different peptides of collagen type I/III associated with some important clinical findings, indicating the

complexity of the processes participating in HCM pathophysiology. In addition, the underlying mechanisms affecting transcription factor Sp1 and its role in the collagen turnover modulation are not well understood. Thereby, COL1A1 (2046G>T) polymorphism that affects a main component of interstitial fibrosis may lead to changes in the biomechanical and material properties and turnover and could explain the differences in clinical events in our patients.

The ADRB1 is a key cell surface signaling protein expressed in the heart and other organs that mediates the actions of catecholamines of the sympathetic nervous system. ADRB1 Arg389 allele is associated with slightly increase in basal and three fold stimulated adenylate cyclase activity and increased sensitivity to stimulation (33).

Chronic stimulation of the ADRB1 leads to hypertrophy and heart failure in ADRB1 transgenic mice that over-expressed ADRB1 (34). In humans, this polymorphism has been related with augmented risk of congestive heart failure (35) and also with improved beta-blockers response in heart failure patients (22). Thyroid hormones are important elements of the regulation of ADRB1 expression and the density of ADRB1 in myocardium. In fact, expression during thyrotoxicosis is considerably increased and ADRB1 Arg389 has been recently related with left ventricular hypertrophy in humans (36). This genetic variation may explain differences on pathophysiologic characteristics that confer higher risk of left ventricular hypertrophy in human essential hypertension (9), a common clinical feature in hypertension and a powerful independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Moreover, it has been related with atrial fibrillation in systolic heart failure (37). Thus, this polymorphism with augmented activity and associated with relevant clinical events in other cardiovascular arena could also account for the worse prognosis seen in our HCM patients.

## **Limitations**

Our study was conducted in three monographic medical consultations which could result in a selection bias. It is known that these monographic outpatient clinics tend to accumulate more symptomatic patients with poor prognosis. On the other hand, patients were included after performing CMR. For this reason previously pacemakers and ICDs carriers were excluded. This could have prevented more symptomatic or worse prognosis patients entered the study. And finally, limited sample prevents the individualized analysis of each event.

## **Conclusion**

Our study suggests that COL1A1 polymorphism (2046G>T) is an independent predictor of prognosis in patients with HCM, while polymorphism ADRB1 (R389G) shows a trend, supporting the importance of non- sarcomeric genes on clinical prognosis in HCM patients.

## **Acknowledgements/ Disclosure of interests**

We thank Luis Caballero for his valuable collaboration in this study. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Spain), and in part by Funding FEDER (grant number PS09/00721), the Department of Molecular Biology, Centro Inmunológico de Alicante (Spain), Instituto de Salud Carlos III (RETIC, RD12/0042/0049) and Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias Virgen de la

Arrixaca (IMIB, Murcia, Spain) (grant numbers RAICMUR\_012/2014 to AR and APOYO\_041/2014 to EOP and RD12/0042/0049 to DHR).

### **Contributions**

A. García-Honrubia: collected data, analyzed data, wrote paper.

D. Hernández-Romero: designed study, collected data, analyzed data, discussed results and corrected paper.

E. Orenes-Piñero: collected data, analyzed data.

A.I. Romero-Aniorte: collected data.

V. Climent: designed study.

M. García: collected data and analyzed data.

N. Garrigos-Gómez: collected data and analyzed data.

C. Moro: discussed results and design.

M. Valdés: discussed design and provided resources.

F. Marín: designed study, corrected paper, discussed results and provided resources.

## REFERENCES

1. Elliott PM, Anastakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014 ;35(39):2733–79.
2. Maron BJ, Sato N, Roberts WC, Edwards JE, Chandra RS. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum. Comparison of fetuses and infants with and without congenital heart disease and patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979;60(3):685–96.
3. Cambronero F, Marín F, Roldán V, Hernández-Romero D, Valdés M, Lip GYH. Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur Heart J*. 2009;30(2):139–51.
4. O'Mahony C, Jichi F, Pavlou M, Monserrat L, Anastakis A, Rapezzi C, et al. A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM risk-SCD). *Eur Heart J*. 2014; 35(30):2010–20.
5. Olivotto I, Cecchi F, Casey SA, Dolaro A, Traverse JH, Maron BJ. Impact of atrial fibrillation on the clinical course of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2001; 104(21):2517–24.
6. Cecchi F, Olivotto I, Monterege A, Santoro G, Dolaro A, Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy in Tuscany: clinical course and outcome in an unselected regional population. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26(6):1529-36.
7. Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, Jover E, Valdés M, Lip GYH, Marín F. Impact of polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. 2011;12(4):521–30.
8. Challa AA, Vukmirovic M, Blackmon J, Stefanovic B. Withaferin-A reduces type I collagen expression in vitro and inhibits development of myocardial fibrosis in vivo. *PLoS One*. 2012;7(8):e42989.
9. Fu C, Wang H, Wang S, Shi Y, Zhou X, Sun K, et al. Association of beta 1-adrenergic receptor gene polymorphisms with left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin Biochem*. 2008;41(10-11):773–8.
10. Lopes LR, Syrris P, Guttman OP, O'Mahony C, Tang HC, Dalageorgou C, et al. Novel genotype-phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Br Card Soc*. 2015;101(4):294–301.
11. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1634–8.
12. Perkins MJ, Driest SLV, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, et al. 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(22):2457–62.

13. Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schroder D, et al. 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(3):270–5.
14. Orenes-Piñero E, Hernández-Romero D, Romero-Aniorte AI, Martínez M, García-Honrubia A, Caballero L, et al. Prognostic value of two polymorphisms in non-sarcomeric genes for the development of atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *QJM*. 2014;107(8):613–21.
15. Wang S, Fu C, Wang H, Shi Y, Xu X, Chen J, et al. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha gene are associated with hypertrophic cardiomyopathy and not with hypertension hypertrophy. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):962–7.
16. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SFA, Robins SP, et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest*. 2001;107(7):899–907.
17. Rohard I, Schaefer E, Kampmann C, Beck M, Gal A. Association between polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and left posterior wall thickness (LPWT) of the heart in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*. 2008;31 Suppl 2:S349–56.
18. Ogimoto A, Shigematsu Y, Nakura J, Hara Y, Ohtsuka T, Kohara K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in patients with coexistent hypertrophic cardiomyopathy and coronary spastic angina. *J Mol Med Berl Ger*. 2005;83(8):619–25.
19. Hernández-Romero D, Orenes-Piñero E, García-Honrubia A, Climent V, Romero-Aniorte AI, Martínez CM, et al. Involvement of the -420C>G RETN polymorphism in myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Intern Med*. 2015;278(1):50-8.
20. Friedrich FW, Bausero P, Sun Y, Treszl A, Krämer E, Juhr D, et al. A new polymorphism in human calmodulin III gene promoter is a potential modifier gene for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2009;30(13):1648–55.
21. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I  $\alpha$  1 gene. *Nat Genet*. 1996;14(2):203–5.
22. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, et al. A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11288–93.
23. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, et al. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med*. 2006;3(4):e90.
24. Collins M, Raleigh SM. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. *Med Sport Sci*. 2009;54:136–49.

25. Cartwright R, Kirby AC, Tikkinen KAO, Mangera A, Thiagamorthy G, Rajan P, et al. Systematic review and metaanalysis of genetic association studies of urinary symptoms and prolapse in women. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 212(2):199.e1-24.
26. Brull DJ, Murray LJ, Boreham CA, Ralston SH, Montgomery HE, Gallagher AM, et al. Effect of a COL1A1 Sp1 binding site polymorphism on arterial pulse wave velocity: an index of compliance. *Hypertension.* 2001;38(3):444–8.
27. Speer G, Szenthe P, Kósa JP, Tabák AG, Folhoffer A, Fuszek P, et al. Myocardial infarction is associated with Spl binding site polymorphism of collagen type 1A1 gene. *Acta Cardiol.* 2006;61(3):321–5.
28. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002;90(5):520–30.
29. 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(6):1041–50.
30. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, et al. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003;108(12):1455–60.
31. Roldán V, Marín F, Gimeno JR, Ruiz-Espejo F, González J, Feliu E, et al. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2008;156(1):85–91.
32. Vílchez JA, Hernández-Romero D, Ruiz-Espejo F, Garcia-Honrubia A, Valdés M, Martínez-Hernández P, Marín F. Collagen peptides, interstitial remodelling and sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *CCLM* 2011; 49(9):1569-71.
33. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A Gain-of-function Polymorphism in a G-protein Coupling Domain of the Human  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12670–4.
34. Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Raynolds MV, Sastravaha A, et al. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(5):817–30.
35. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347(15):1135–42.
36. Babenko AY, Grineva EN, Savitskaja DA, Kravchuk EN, Solncev VN, Kostareva AA. Polymorphisms of  $\beta$  1-adrenoreceptor gene and cardiovascular complications in patients with thyrotoxicosis. *BioMed Res Int.* 2014;2014:402897.
37. Nascimento BC de, Pereira SB, Ribeiro GS, Mesquita ET. Beta1-adrenergic receptor polymorphisms associated with atrial fibrillation in systolic heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98(5):384–9.



**Figure legends:**

**Figure 1.** Kaplan–Meier cumulative survival free of urgent hospitalization curve in the univariate analyses. (A) The absence of the polymorphic allele of COL1A1 gene is associated with increased urgent hospitalization. (B) The homozygous carriage of the Arg389 (CC) variant of ADRB1 gene shows a trend towards urgent hospitalization.

**Table 1.** Candidate polymorphisms in non-sarcomeric proteins.

| <b>Polymorphism</b>    | <b>Effect</b>  | <b>Ref.</b> |
|------------------------|--|-------------|
| I/D ACE                | Hypertrophy in general population  | (11)        |
|                        | Severe hypertrophy in HCM patients   | (12)        |
| AGTR1(A1666C)          | Expression of hypertrophy in HCM   | (13)        |
| CYP11B2 (C344T)        | Predictor of atrial fibrillation development in HCM  | (14)        |
| PGC1- $\alpha$ (G482S) | Greater ventricular thickness in HCM   | (15)        |
| COLIA1 (G2046T)        | Impaired collagen synthesis and shift in the biomechanical and material properties of bone | (16)        |
| ADRB1 (R389G)          | Higher risk of left ventricular hypertrophy in human essential hypertension                | (9)         |
| NOS3 (G894T)           | Increased wall thickness in Fabry disease  | (17)        |
|                        | Coronary spastic angina in HCM patients  | (18)        |
| RETN (-420C>G)         | Cardiac fibrosis in HCM  | (19)        |
| CALM3 (-34T>A)         | Development of hypertrophy in HCM  | (20)        |

**Table 2.** Demographic and clinical baseline characteristics of the patients included in the analysis of the two polymorphisms in non-sarcomeric genes.

| <b>Variables</b>                             | <b>Patients (168)</b> |
|--|-----------------------|
| Age  | 49.8 ± 15.2           |
| Sex male (%)                                 | 120 (71.4)            |
| Hypertension (%)                             | 59 (35.1)             |
| Diabetes mellitus (%)                        | 14 (8.3)              |
| NYHA class II-IV (%)                         | 74 (44.0)             |
| Previous syncope (%)                         | 17 (10.1)             |
| Previous AF (%)                              | 22 (13.1)             |
| Previous angina (%)                          | 38 (22.6)             |
| Maximum LV wall thickness, mm (median, IQR)  | 20.5 (17.2-24.5)      |
| Obstructive (gradient >30 mm Hg) (%)         | 57 (33.9)             |
| LV Ejection fraction (%)                     | 69.3 ± 9.8            |
| Non-sustained ventricular tachycardia (%)    | 56 (33.3)             |
| Left atrial diameter (mm)                    | 42.5 ± 7.5            |
| Number of LGE segments/patient (median, IQR) | 2.0 (0-5.2)           |
| <b>Drugs</b>                                 |                       |
| ACE inhibitors (%)                           | 14 (8.3)              |
| ARBs (%)                                     | 16 (9.5)              |
| Beta-blockers (%)                            | 121 (72.0)            |
| Disopiramide (%)                             | 12 (7.1)              |

NYHA, New York Heart Association; AF, atrial fibrillation; IQR, interquartile range; LV, left ventricle; LGE, late gadolinium enhancement; ACE, Angiotensin Converting Enzyme; ARBs, Angiotensin Receptor Blocker

**Table 3.** Association of the studied polymorphisms with urgent hospitalization during follow-up.

| <b>Polymorphism</b>    | <b>Condition</b>                                | <b>p</b>     |
|------------------------|---|--------------|
|                        | <b>(homozygous/presence polymorphic allele)</b> |              |
| I/D ACE                | homozygous                                      | 0.814        |
|                        | presence  | 0.387        |
| AGTR1(A1666C)          | homozygous                                      | 0.474        |
|                        | presence  | 0.564        |
| CYP11B2 (C344T)        | homozygous                                      | 0.973        |
|                        | presence  | 0.941        |
| PGC1- $\alpha$ (G482S) | homozygous                                      | 0.976        |
|                        | presence  | 0.634        |
| COLIA1 (G2046T)        | homozygous                                      | 0.570        |
|                        | presence  | <b>0.011</b> |
| ADRB1 (R389G)          | homozygous                                      | <b>0.024</b> |
|                        | presence  | 0.478        |
| NOS3 (G894T)           | homozygous                                      | 0.960        |
|                        | presence  | 0.245        |
| RETN (-420C>G)         | homozygous                                      | 0.524        |
|                        | presence  | 0.217        |
| CALM3 (-34T>A)         | homozygous                                      | 0.785        |
|                        | presence  | 0.272        |

**Table 4.** Genotype frequencies of COL1A1 (2046G>T) and ADRB1 (R389G) polymorphisms.

| <b>Genotype</b>  | <b>Patients</b> | <b>Percentage</b> | <b>Controls</b> | <b>Percentage</b> | <b>p-value</b> |
|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| <b>Frequency</b> | <b>(n=168)</b>  | <b>(%)</b>        | <b>(n=136)</b>  | <b>(%)</b>        |                |
| <b>COL1A1</b>    |                 |                   |                 |                   |                |
| G/G              | 96              | 57.1              | 93              | 68.4              |                |
| G/T              | 61              | 36.3              | 39              | 28.7              |                |
| T/T              | 11              | 6.5               | 4               | 2.9               |                |
| Total            | 168             | 100               | 136             | 100               | 0.089          |
| <b>ADRB1</b>     |                 |                   |                 |                   |                |
| C/C              | 75              | 44.6              | 61              | 44.9              |                |
| C/G              | 75              | 44.6              | 63              | 46.3              |                |
| G/G              | 18              | 10.7              | 12              | 8.8               |                |
| 00               | 168             | 100               | 136             | 100               | 0.852          |

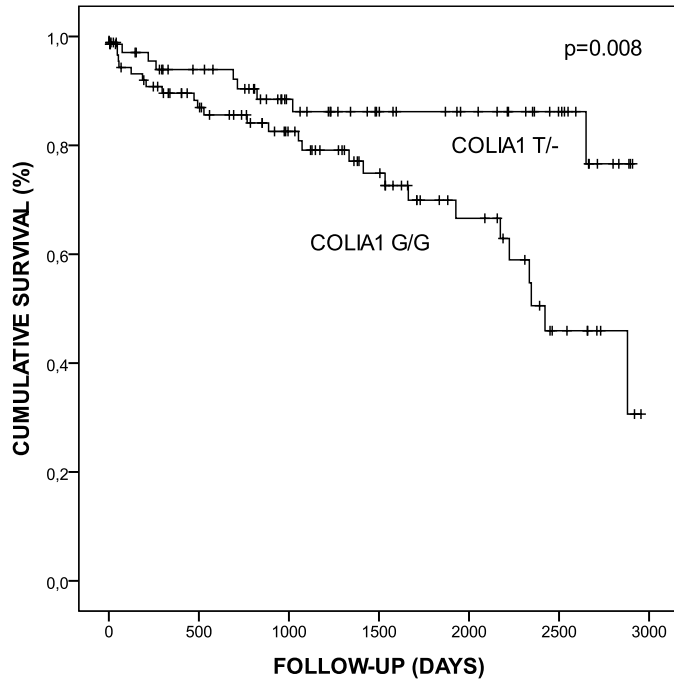
**Table 5.** Association of different demographic, clinical and genetic variables with urgent hospitalization during follow-up.

| Variable  | Univariate              |              | Multivariate            |              |
|---|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
|   | HR (95% CI)             | p            | HR (95% CI)             | p            |
| Age   | <b>1.03 (1.00-1.06)</b> | <b>0.023</b> | <b>1.03 (1.00-1.05)</b> | <b>0.047</b> |
| Sex male  | <b>2.31 (1.97-4.47)</b> | <b>0.013</b> | 1.81 (0.88-3.71)        | 0.105        |
| Previous AF                                     | 1.81 (0.85-3.86)        | 0.122        | 1.22 (0.53-2.78)        | 0.641        |
| Hypertension                                    | 1.56 (0.72-3.35)        | 0.259        |                         |              |
| Diabetes mellitus                               | 0.70 (0.15-3.36)        | 0.656        |                         |              |
| Obstructive (gradient > 30 mmHg)                | 1.03 (0.52-2.07)        | 0.925        |                         |              |
| Late gadolinium enhancement                     | 0.96 (0.86-1.07)        | 0.487        |                         |              |
| NYHA  | 1.50 (0.84-2.68)        | 0.173        |                         |              |
| Ejection fraction                               | 0.97 (0.93-1.01)        | 0.207        |                         |              |
| Abnormal blood pressure response in effort test | 1.76 (0.79-3.92)        | 0.168        |                         |              |
| COLA1A G/G                                      | <b>2.67 (1.25-5.68)</b> | <b>0.011</b> | <b>2.76 (1.26-6.05)</b> | <b>0.011</b> |
| ADRB1 C/C                                       | <b>2.16 (1.11-4.21)</b> | <b>0.024</b> | 1.98 (0.99-4.02)        | 0.057        |

AF, atrial fibrillation; NYHA, New York Heart Association Functional Classification.

**Figure 1:**

**A)**



**B)**

