

Biomarcadores en hipertensión pulmonar de causa cardiaca izquierda. Valor diagnóstico y pronóstico

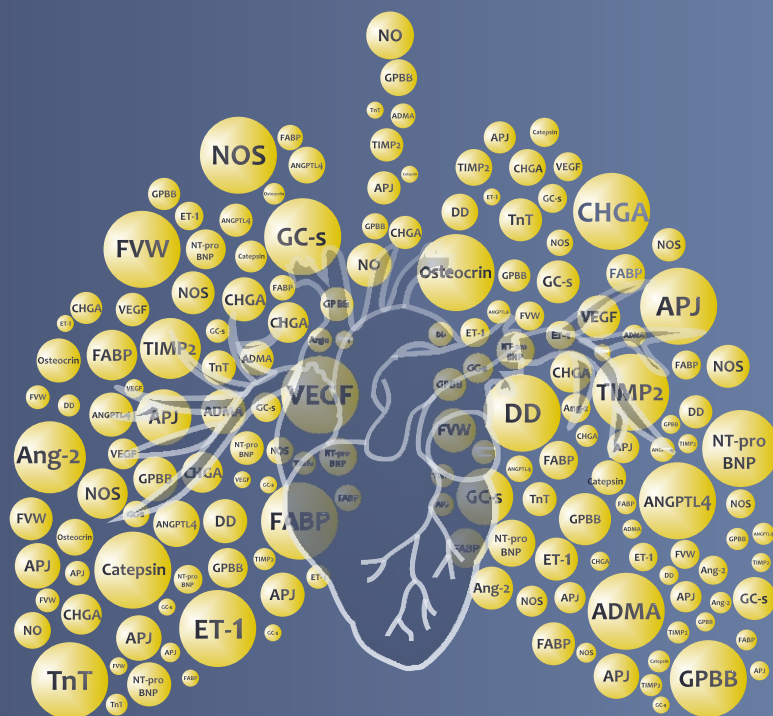
Tesis doctoral

Doctorando

Josep Lluís Melero Ferrer
Licenciado en Medicina

Directores de la tesis

Dr. Luis Almenar Bonet
Dr. José Enrique O'Connor Blasco



Valencia, 2015

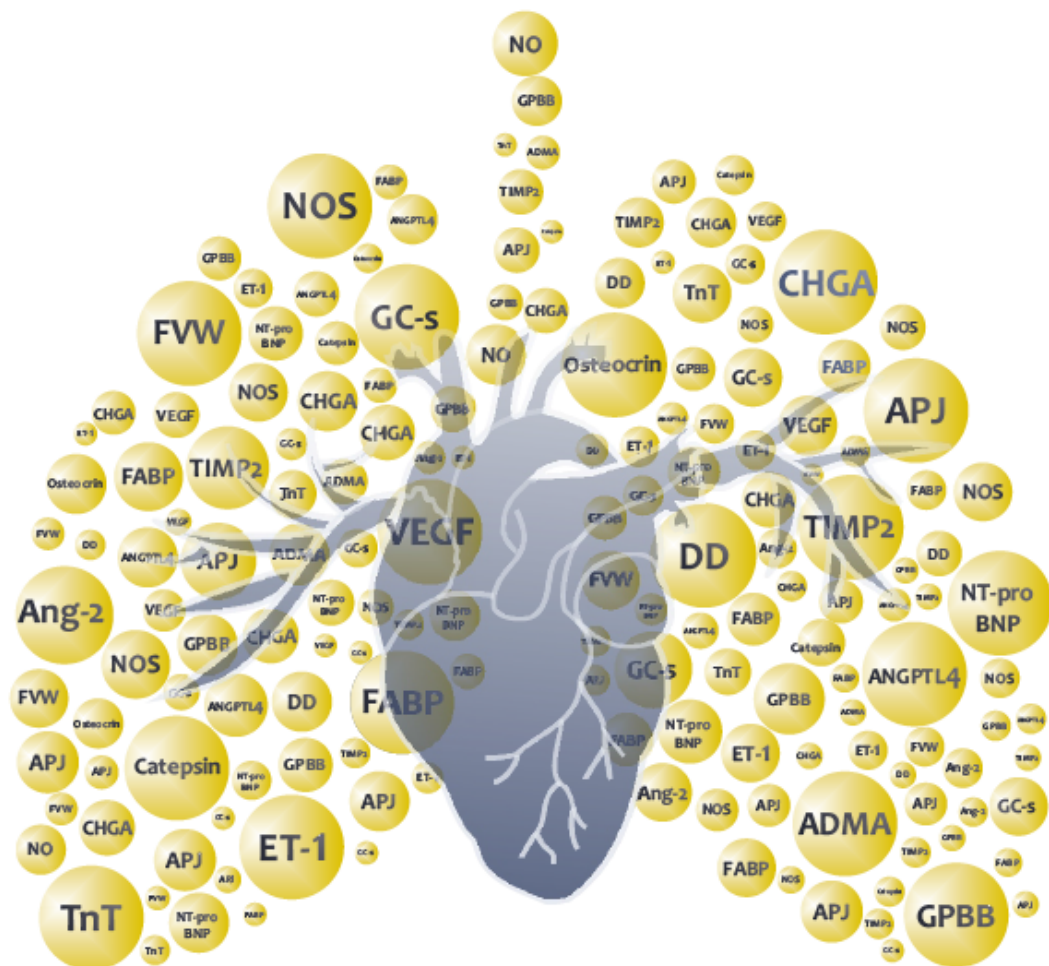
Universitat de València
Departament de Bioquímica
Programa de doctorat 030E
Bioquímica clínica-mèdica i immunologia



Biomarcadores en hipertensión pulmonar de causa cardiaca izquierda. Valor diagnóstico y pronóstico

Memoria realizada por D. Josep Lluís Melero Ferrer para optar al grado de Doctor por la Universitat de València – Estudi General.

Tesis doctoral dirigida por los doctores Luis Almenar Bonet y José Enrique O'Connor Blasco.




Los doctores D. Luis Almenar Bonet y José Enrique O'Connor Blasco, como directores de tesis, certifican que D. Josep Lluís Melero Ferrer ha realizado el estudio titulado: "Biomarcadores en hipertensión pulmonar de causa cardiaca izquierda. Valor diagnóstico y pronóstico".

Siguiendo el programa de doctorado 030E del departamento de Bioquímica regulado por el RD 778/1998, y en cumplimiento de la normativa vigente, el doctorando defiende el presente proyecto para optar al grado de doctor por la Universitat de València.

Directores



Dr. Luis Almenar Bonet



Dr. J. Enrique O'Connor Blasco

A Tatiana, mi mujer, mi compañera de vida y de aventura, por su amor y apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A mis padres, Luis y Mari, que siempre han creído en mí y nunca me han fallado.

A Carolina, la princesita prometida, cuya llegada nos llena de ilusión.

Agradecimientos

Es posible que la parte más difícil de todo el proyecto de investigación sea expresar aquí, en unas pocas líneas, toda la gratitud que tengo hacia todas aquellas personas que han permitido de una u otra forma que pudiera llevar a cabo la presente tesis doctoral.

En primer lugar, gracias a mi mujer, Tatiana, porque nada de esto hubiera sido posible sin su colaboración y comprensión. Gracias, cariño, por tu paciencia y tu amor sin límites, por conseguir que mantuviera la calma en los momentos difíciles y por ayudarme a levantarme cada vez que me he caído al suelo. Gracias por hacer que sentirse feliz sea tan fácil cuando se está a tu lado.

Gracias también a mis padres, Luis y Mari, por servirme de ejemplo, por guiarme por el camino correcto y por haberme enseñado desde pequeño a esforzarme por lo que realmente quería, y por apoyar y defender mis decisiones aunque no fueran acertadas. Gracias a mis abuelos, Amparo y Pepe, por su cariño incondicional. A ti yayo, allá donde estés, seguro que te sentirás orgulloso de este trabajo.

Gracias especialmente al doctor Luis Almenar, por haber pensado en mí desde el primer momento para este proyecto, por haber alimentado en mí el fuego de la investigación biomédica del cual sólo quedaban rescoldos tras los años previos, por siempre estar pensando en el siguiente paso a dar y nunca conformarte. Gracias Luis, por tu dedicación a este proyecto y por dirigir la tesis con total disponibilidad.

Gracias al doctor Ignacio Sánchez Lázaro por su colaboración e implicación desinteresada en el proyecto. Gracias Nacho, por dedicarme tu tiempo a resolver mis dudas y temores, por tus consejos y por tu ilusión incansable que transmites al resto del equipo.

Gracias también a las compañeras del centro de investigación, las doctoras Virtudes Vila, Vicenta Martínez y especialmente a Sandra Dolz, por involucrarse completamente en el proyecto y convertirlo en realidad. Sin su participación y conocimientos no hubiera sido posible desarrollarlo. Sin duda, la pieza clave de esta tesis.

Mi agradecimiento también al Dr. J. Enrique O'Connor, al que conozco desde primer curso de medicina, por su labor de codirector de esta tesis. Siempre, con la amabilidad que lo caracteriza, ha facilitado que la investigación siguiera su curso.

Mi más sincera gratitud a la Dra. Lola Domenech y a todo el personal de la unidad de Hemodinámica, por su colaboración y capacidad de trabajo. Gracias a su ayuda, las cosas han sido mucho más sencillas.

Quisiera agradecer también aquí a los doctores Joaquín Rueda, Ana Osa, Miguel Ángel Arnau y Anastasio Quesada su apoyo y amistad durante los cinco años de la residencia de Cardiología. A parte de ser un referente clínico y científico, son personas que dejan su impronta personal a las que llevaré siempre en el corazón. Gracias también al Dr. Luis Martínez Dolz por su apoyo y buen hacer, siempre promoviendo la superación.

Gracias también a Mónica Cebrián, por su ayuda en los retoques finales de este trabajo y por aportar esa dosis de optimismo y alegría que hace que el trabajo diario sea mucho más fácil de lidiar.

Gracias, por último, al resto de compañeros del Servicio de Cardiología, adjuntos, becarios y residentes, por su apoyo y generosidad, y muy en especial a mi compañera Raquel López, quien después de haber compartido cinco años de andanzas, no me ha defraudado ni un solo día y nunca me ha faltado su cariño y comprensión.

Gracias de nuevo, a todos y cada uno de vosotros, porque sin vuestra ayuda no hubiera escrito ni la primera página de esta tesis.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



SERVICIO DE **CARDIOLOGÍA**
Hospital Universitario y Politécnico La Fe



Unidad de Insuficiencia
Cardíaca y Trasplante

ÍNDICE

0 – Lista de abreviaturas, tablas y figuras	21
I- Introducción	37
II- Hipótesis	125
III- Objetivos	129
IV- Metodología	133
V- Resultados	179
VI- Discusión	245
VII- Conclusiones	287
VIII- Anexos	293
IX- Bibliografía	329

0.	Lista de abreviaturas, tablas y figuras	23
I.	Introducción	37
1.	Aspectos generales	39
2.	Clasificación y definiciones	41
2.1	Definición de hipertensión pulmonar	41
2.2	Clasificación de hipertensión pulmonar	43
2.3	Tipos de hipertensión pulmonar por cardiopatía izquierda	46
3.	Etiopatogenia	50
3.1	Hipertensión pulmonar inducida por ejercicio	55
4.	Epidemiología	56
5.	Diagnóstico	53
5.1	Evaluación no invasiva	54
5.2	Evaluación invasiva	65
6.	Tratamiento	67
6.1	Tratamiento de la insuficiencia cardiaca	67
6.2	Tratamiento vasodilatador pulmonar	68
6.3	Tratamiento de la enfermedad valvular	70
6.4	Trasplante cardiaco	70
7.	Pronóstico	72
8.	Expectativas futuras	73
9.	Biopatología de la hipertensión pulmonar	74
10.	El endotelio sano	77
10.1	Estructura endotelial	78
10.2	Funciones del endotelio	79
10.3	Estrés oxidativo y función endotelial	85

11. Síntesis y metabolismo del óxido nítrico endotelial	88
11.1 Visión general	88
11.2 Síntesis y transporte de arginina	89
11.3 Óxido nítrico sintasas	91
11.4 Vía de señalización del óxido nítrico	95
12. Síntesis y metabolismo de la endotelina	97
12.1 Síntesis y regulación de la endotelina	97
12.2 Vía de señalización de la endotelina	99
13. Disfunción endotelial en la hipertensión pulmonar	101
13.1 Cambios en el fenotipo y estructura endotelial	101
13.2 Alteraciones en la síntesis y disponibilidad de factores vasodilatadores.	104
13.3 Alteraciones en la concentración de factores vasoconstrictores	106
13.4 Inflamación e hipercoagulabilidad.	107
13.5 Estrés oxidativo	108
14. Biomarcadores en hipertensión pulmonar	111
14.1 Biomarcadores de origen miocárdico	112
14.2 Biomarcadores de origen endotelial	115
14.3 Biomarcadores de la vía de la hemostasia	119
14.4 Biomarcadores de inflamación y remodelado	119
14.5 Biomarcadores de estrés oxidativo	122
II. Hipótesis	125
III. Objetivos	129

IV. Métodos	133
1. Diseño del estudio	135
2. Criterios de inclusión y de exclusión	135
2.1 Criterios de inclusión	135
2.2 Criterios de exclusión	135
2.3 Selección de candidatos	136
3. Tamaño muestral	136
4. Variables analizadas y material utilizado	138
4.1 Variables clínicas	138
4.2 Variables analíticas	138
4.3 Variables electrocardiográficas	139
4.4 Variables ecocardiográficas	140
4.5 Variables hemodinámicas	141
4.6 Obtención y procesamiento de las muestras	144
4.7 Análisis preliminar semicuantitativo de un panel de proteínas mediante tecnología	144
4.8 Variables biológicas	145
5. Panel microarray	146
5.1 Introducción	146
5.2 Material necesario	149
5.3 Protocolo	150
5.4 Lectura de señales	155
5.5 Proteínas incluidas en el microarray	157
5.6 Interpretación de las señales leídas	136
6. Enzimoimmunoensayo (ELISA)	163
6.1 Introducción	163
6.2 Material necesario	165
6.3 Protocolo	166

7.	Análisis estadístico	172
8.	Limitaciones del estudio	175
9.	Aspectos éticos	177
V.	Resultados	179
1.	Características generales de la muestra	181
1.1.	Inclusión de pacientes.	181
1.2.	Características de los pacientes	182
2.	Comparación de las características basales entre los distintos grupos según su perfil hemodinámico.	187
2.1	Comparación entre los 4 grupos	187
2.2	Comparación entre 3 grupos diferenciando entre componente poscapilar y precapilar a partir del GTP.	191
2.3	Comparación entre 3 grupos diferenciando entre componente poscapilar y precapilar a partir del gradiente diastólico.	194
3.	Resultados obtenidos en el panel de proteínas (microarray).	198
3.1	Consideraciones previas a la interpretación de las lecturas de intensidad de señal.	198
3.2	Análisis de las lecturas de intensidad de señal.	201
4.	Resultados obtenidos en el enzoinmunoensayo (ELISA)	210
4.1	Consideraciones previas	210
4.2	Comparación entre grupos según su perfil hemodinámico	211
4.3	Detección de la presencia o no del componente precapilar de la hipertensión pulmonar.	218

4.4	Detección de la disfunción ventricular derecha.	219
4.5	Relación con el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses.	221
4.6	Correlación con parámetros hemodinámicos	221
4.7	Pacientes con miocardiopatía dilatada	224
4.8	Pacientes con cardiopatía isquémica	229
4.9	Curvas ROC y puntos de corte para cada uno de los objetivos secundarios	235
5.	Análisis multivariado	240
VI.	Discusión	245
1.	Diseño e inclusión de pacientes	247
2.	Método empleado: microarray y ELISA	249
3.	Comparación de las características basales entre los distintos grupos según su perfil hemodinámico	253
4.	Panel de proteínas (microarray).	256
5.	ELISA: Comparación entre grupos según su perfil hemodinámico	262
6.	ELISA: Detección de la presencia o no del componente precapilar de la hipertensión pulmonar	266
7.	ELISA: Detección de la disfunción ventricular derecha medida por ecocardiografía	267
8.	ELISA: Relación con el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses	270
9.	ELISA: Correlación con parámetros hemodinámicos	272
10.	ELISA: Miocardiopatía dilatada	273
11.	ELISA: Cardiopatía isquémica	277

12.	Curvas ROC	280
13.	Análisis multivariante	281
14.	Perspectivas de futuro.	283
VII.	Conclusiones	287
VIII.	Anexos	293
1.	Resultados completos de los análisis estadísticos realizados a las proteínas estudiadas.	295
2.	Hoja de información al paciente	325
IX.	Bibliografía	329

Listado de abreviaturas, tablas y figuras

LISTADO DE ABREVIATURAS

\cdot OH	Radical hidroxilo
Δ A-V O ₂	Diferencia arterio-venosa de oxígeno
5-LO	Lipooxigenasa 5
6MM	6 minutos marcha
AA	Aminoácido
AcFol	Ácido fólico
ACO	Anticoagulantes orales
AD	Aurícula derecha
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADP	Adenosina difostato
AI	Aurícula izquierda
Akt	Proteína quinasa B
ALT	Alanina aminotransferas
Ang II	Angiotensina II
ANGPTL4	Angiopoyetina like 4
AP1	Proteína activadora 1
APJ	Receptor de apelina
ARAI	Antagonistas del receptor de la angiotensina
Arg	Arginasa
Arg-CH ₃	Metilarginina
ARM	Antagonistas del receptor mineralcorticoide
ASL	Argininosuccinato liasa
ASS	Argininosuccinato sintasa

ATP	Adenosina trifosfato
BB	Betabloqueantes
BH ₂	Dihidrobiopterina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BNP	Péptido natriurético cerebral
BSA	Albúmina bovina sérica
CaMKII	Quinasa Ca ²⁺ /calmodulina dependiente tipo II
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAT	Proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos
CCD	Cateterismo cardiaco derecho
CEC	Células endoteliales circulantes
cGMP	Guanina monofosfato cíclico
CI	Cardiopatía isquémica
Cis	Cistationina
COX	Ciclooxigenasa
Cy3	Cianina
ddH ₂ O	Agua doble destilada
DAG	Diacilglicerol
DAI	Desfibrilador automático implantable
DAVI	Dispositivos de asistencia ventricular izquierda
DDAH	Dimetil-arginina dimetilaminohidrolasa
DPD	Diferencia de presión diastólica
DPN	Disnea paroxística nocturna
EA	Estenosis aórtica

ECE	Enzima convertidora de endotelinas
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EM	Estenosis mitral
ELISA	Enzimoimmunoensayo (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ET-1	Endotelina 1
F	French
FABP	Proteínas ligadoras de ácidos grasos
FEVI	Fracción de eyección ventricular izquierda
FGFb	Factor de crecimiento derivado de fibroblastos
FLAP	Proteína activadora de lipooxigenasa 5
FOXO1	Forkhead box protein O1
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
fvW	Factor de von Willebrand
GC	Gasto cardiaco
GDF-15	Factor de crecimiento y diferenciación 15
GPC	Guías de práctica clínica
GTP	Gradiente transpulmonar, Guanosin trifosfato
H-FABP	Proteína ligadora de ácidos grasos de tipo cardiaco
HAP	Hipertensión arterial pulmonar
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HIF-1	Factor inducible por la hipoxia-1
HP	Hipertensión pulmonar

HPCI	Hipertensión pulmonar por cardiopatía izquierda
HPM	Hipertensión pulmonar mixta
HPMI	Hipertensión pulmonar mixta irreversible
HPMR	Hipertensión pulmonar mixta reversible
HPP	Hipertensión pulmonar poscapilar
HPTEC	Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica
IA	Insuficiencia aórtica
IC	Insuficiencia cardiaca, Índice cardiaco
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IECA	inhibidores de la enzima convertidora de angiotensinógeno
ICFEVI-p	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo preservada
ICFEVI-r	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo reducida
IL	Interleuquinas
IM	Insuficiencia mitral
IMC	Índice de masa coroporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inmunitaria
IP3	Inositol trifosfato
IT	Insuficiencia tricuspídea
KLF4	Kruppel like factor 4
L-NAME	L-nitroarginina monometil éster
L-NMMA	L-NH-mono-metil-arginina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteín lipasa

LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAT	Metiotina adenosina transferasa
MCD	Miocardopatía dilatada
MCI	Miocardopatía isquémica
Met	Metionina
MLCK	Quinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MMP	Metaloproteasas de la matriz
MPC	Micropartículas circulantes
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrógeno
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NHP	Sin hipertensión pulmonar
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOXs	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrógeno oxidasas
NT-proBNP	Fragmento N-terminal del propéptido natriurético cerebral
NYHA	New York Heart Association
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OAT	Ornitino aminotransferasa
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPN	Osteopontina

OTC	Ornitino transcarboxilasa
PAI	Presión aurícula izquierda
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PAD	Presión aurícula derecha
PAMT	Proteína arginina metil transferasa
PaO ₂	Presión arterial de oxígeno
PdAP	Presión diastólica de arteria pulmonar
PAPm	Presión arterial pulmonar media
PsAP	Presión sistólica de arteria pulmonar
PBS	Tampón fosfato sódico
PCP	Presión capilar pulmonar
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGI ₂	Prostaciclina
Pi	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfoinosítido-3-quinasa
PI3P	Fosfatidil-inositol trifosfato
PKG	Proteína quinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PNA	Péptido natriurético atrial
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PTDVI	Presión telediastólica del ventrículo izquierdo
PVC	Presión venosa central
PvO ₂	Presión venosa de oxígeno

RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Retículo sarcoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RVP	Resistencias vasculares pulmonares
RVS	Resistencias vasculares sistémicas
SAH	S-adenosilhomocisteína hidrolasa
sCD40L	Ligando soluble de CD40
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SOD	Superóxido dismutasa
TAPSE	<i>Tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TGF- β	Factor de crecimiento transformador β
TIMP	Inhibidor tisular del metaloproteinasa
TnT	Troponina T
TnT-as	Troponina T de alta sensibilidad
t-PA	Activador del plasminógeno tisular
TRC	Terapia de resincronización cardiaca
Trp	Triptófano
TRCP	Transportador de canales catiónicos
TSVD	Tracto de salida del ventrículo derecho
TXA ₂	Tromboxano A ₂
Val	Valina

VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
VO ₂	Consumo de oxígeno
UW	Unidades Wood
X/XO	Sistema xantina oxidoreductasa
XOR	Xantina oxidoreductasa

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Clasificación actualizada de la hipertensión pulmonar (pág. 42)
Tabla 2	Definiciones hemodinámicas de hipertensión pulmonar (pág. 44)
Tabla 3	Definición propuesta para la hipertensión pulmonar por cardiopatía izquierda (pág. 47)
Tabla 4	Factores que indican mayor probabilidad de HP de causa izquierda (pág. 59)
Tabla 5	Estimación de parámetros hemodinámicos por ecocardiografía doppler (pág.62)
Tabla 6	Sustancias secretadas por el endotelio (pág. 80)
Tabla 7	Vías de señalización dependientes de ROS (pág. 87)
Tabla 8	Efectos fisiológicos de los ROS (pág. 88)
Tabla 9	Localización y funciones de las NOS (pág. 92)
Tabla 10	Biomarcadores en hipertensión pulmonar (pág. 123)
Tabla 11	Proteínas incluidas en el microarray L-507 (pág. 158)
Tabla 12	Proteínas incluidas en el microarray L-493 (pág. 160)
Tabla 13	Parámetros ecocardiográficos más relevantes de los pacientes incluidos en el estudio. (pág. 185)

Tabla 14	Parámetros analíticos más relevantes de los pacientes incluidos en el estudio (pág. 186)
Tabla 15	Comparación de las características basales entre los 4 grupos hemodinámicos del estudio (ANOVA) (pág. 188)
Tabla 16	Comparación de las características basales entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función del GTP (ANOVA) (pág. 191)
Tabla 17	Comparación de las características basales entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función de la DPD (ANOVA) (pág. 195)
Tabla 18	Lista de proteínas que alcanzaron diferencias de más de 3 veces entre los pacientes sin HP y HP mixta irreversible (pág. 204)
Tabla 19	Diferencias intergrupos entre los 4 grupos hemodinámicos del estudio (ANOVA) (pág. 212)
Tabla 20	Diferencias intergrupos entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función del GTP (ANOVA) (pág. 212)
Tabla 21	Diferencias intergrupos entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función de la DPD (ANOVA) (pág. 213)
Tabla 22	Proteínas que alcanzaron la significación estadística diferenciando ausencia y presencia de hipertensión pulmonar (t-Student) (pág. 215)
Tabla 23	Proteínas que alcanzaron la significación estadística diferenciando ausencia y presencia de componente precapilar de la HP (t-Student) (pág. 218)
Tabla 24	Proteínas que alcanzaron la significación estadística diferenciando ausencia y presencia de disfunción ventricular derecha (t-Student) (pág. 219)
Tabla 25	Proteínas que alcanzaron la significación estadística en relación con el evento muerte o trasplante cardiaco (t-Student) (pág. 221)
Tabla 26	Relación de proteínas y sus correlaciones significativas con parámetros hemodinámicos (R de Pearson) (pág. 222)
Tabla 27	Listado de proteínas que han obtenido diferencias estadísticas significativas o correlación con parámetros hemodinámicos en pacientes con MCD (pág. 225)

- Tabla 28 Listado de proteínas que han obtenido diferencias estadísticas significativas o correlación con parámetros hemodinámicos en pacientes con CI (pág. 229)
- Tabla 29 Listado de proteínas que han obtenido un área bajo la curva mayor de 0,75 en la curva COR en la muestra completa, y en los subgrupos de MCD y MCI para cada uno de los objetivos marcados. (pág. 199)
- Tabla 30 Asociación entre las distintas variables analizadas y la presencia o no de HP en la muestra completa (pág. 241)
- Tabla 31 Asociación entre las distintas variables analizadas y la presencia o no de componente precapilar en la muestra completa (pág. 242)
- Tabla 32 Asociación entre las distintas variables analizadas y la presencia o no de disfunción ventricular derecha en la muestra completa (pág. 243).
- Figura 1 Clasificación “topográfica” de la hipertensión pulmonar (pág. 45)
- Figura 2 Hallazgos anatomopatológicos en la HP (pág. 54)
- Figura 3 Doppler espectral de los flujos transtricuspídeo y pulmonar (pág.63)
- Figura 4 Algoritmo diagnóstico para diferenciar entre HPCI y HAP (pág. 64)
- Figura 5 Fisiopatología de la hipertensión pulmonar (pág. 76)
- Figura 6 Función vasomotora del endotelio sano (pág. 82)
- Figura 7 Fórmula de la arginina y de sus aminoácidos derivados ornitina y citrulina. (pág. 89)
- Figura 8 Metabolismo de la arginina en el organismo humano (pág. 90)
- Figura 9 Síntesis y vía de señalización del NO (pág. 93)
- Figura 10 Síntesis endógena de ADMA (pág. 95)
- Figura 11 Síntesis y vía de señalización de la endotelina (pág. 100)
- Figura 12 Papel de la disfunción endotelial en la HP (pág. 103)
- Figura 13 Papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la HP (pág. 110)
- Figura 14 Electrocardiograma *Pagewriter TC70 cardiograph® Phillips®* (pág. 139)

- Figura 15 Ecocardiógrafo *iE33 xMATRIX® Phillips®* (pág. 140)
- Figura 16 Cómo se utiliza el microarray 126AAH-BLG-1000 (pág. 149)
- Figura 17 Preparación de las muestras para su utilización (pág. 52)
- Figura 18 Escáner láser de microarrays InnoScan 710 (pág. 156)
- Figura 19 Resultados típicos obtenibles con el L-507 (pág. 162)
- Figura 20 ELISA tipo sándwich (pág. 164)
- Figura 21 Placa de pocillos de ELISA (pág. 168)
- Figura 22 Espectrofotómetro ELx800 (pág. 171)
- Figura 23 Representación gráfica de las etiologías de los pacientes incluidos en el estudio (pág. 182)
- Figura 24 Distribución de los distintos tratamientos por grupos terapéuticos de los pacientes incluidos en el estudio (pág. 219)
- Figura 25 Señales de fluorescencia de los chips de vidrio correspondientes a los paneles de proteínas de cada uno de los 4 grupos estudiados (pág. 200)
- Figura 26 Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 17 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre grupos consecutivos (pág. 203)
- Figura 27 Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 50 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos de SHP e HPMI (pág. 207)
- Figura 28 Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 50 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos de SHP e HPMI (2) (pág. 208)
- Figura 29 Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 50 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos de SHP e HPMI (3) (pág. 235)
- Figura 30 Diagrama de cajas para varias proteínas analizadas que alcanzaron resultados significativos entre los distintos grupos analizados (pág. 216)

- Figura 31 Diagrama de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron resultados significativos entre pacientes con y sin hipertensión pulmonar (pág. 217)
- Figura 32 Diagramas de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron resultados significativos entre pacientes con y sin componente precapilar y con y sin disfunción ventricular derecha. (pág. 220)
- Figura 33 Correlaciones entre proteínas y parámetros hemodinámicos con un coeficiente R mayor de 0,5 (pág. 223)
- Figura 34 Diagramas de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron los resultados más significativos en pacientes con miocardiopatía dilatada (pág. 227)
- Figura 35 Correlaciones entre proteínas y parámetros hemodinámicos con un coeficiente R mayor de 0,5 en pacientes con miocardiopatía dilatada (pág. 228)
- Figura 36 Diagramas de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron los resultados más significativos en pacientes con cardiopatía isquémica (pág. 232)
- Figura 37 Correlaciones entre proteínas y parámetros hemodinámicos con un coeficiente mayor de 0,5 (pág. 233)
- Figura 38 Representación gráfica de las curvas ROC con un área bajo la curva mayor de 0,80 para cada uno de los objetivos marcados. (pág. 239)

I. INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales

El lecho vascular pulmonar constituye un circuito de alto flujo y baja resistencia capaz de acomodar grandes incrementos en el flujo sanguíneo sin que suponga un aumento de las presiones intravasculares pulmonares. La hipertensión pulmonar (HP) es una entidad nosológica producida por diferentes enfermedades, que se caracteriza por el desarrollo de cambios moleculares y del sustrato anatómico de la circulación pulmonar. Estos cambios llevan a un aumento de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) y por tanto, a una pérdida en la capacidad de acomodar incrementos en el flujo pulmonar, que con el tiempo conduce al desarrollo de insuficiencia cardiaca derecha, y finalmente la muerte^{1, 2}.

Aunque la HP puede aparecer en el seno de enfermedades pulmonares, o más raramente diagnosticarse en su forma arterial idiopática, la cardiopatía izquierda (básicamente IC izquierda) es la principal etiología de la HP en nuestro medio. A su vez, la HP es una complicación frecuente en la IC izquierda, independientemente de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) o de la existencia o no de enfermedad valvular^{3, 4}. La aparición de HP se asocia un desarrollo de síntomas más graves, menor tolerancia al esfuerzo y a un peor pronóstico⁵⁻⁷, sea cual sea la FEVI o la clase funcional previa del paciente. El pronóstico es aún más funesto cuando se asocia a disfunción del ventrículo derecho^{7, 8} (VD).

La insuficiencia cardiaca (IC) se ha convertido en una auténtica epidemia en los últimos años, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, motivo por el que esta patología y

sus costes asociados suponen una importante carga para el sistema sanitario⁹. A pesar de los avances terapéuticos que se han desarrollado en la última década, el pronóstico de los pacientes con IC¹⁰ dista mucho de ser óptimo. La mayoría de ensayos clínicos realizados en los dos últimos lustros arrojan resultados neutros o aportan escaso beneficio¹¹. Uno de los motivos barajados para este hecho, es que muchos de los nuevos fármacos investigados actúan sobre mecanismos patogénicos que ya tienen actualmente un tratamiento efectivo, como es el caso del bloqueo neurohumoral, por lo que es muy poco probable conseguir una reducción significativa adicional de la morbimortalidad actuando sobre estas vías. Por este motivo, es importante conseguir desarrollar fármacos específicos dirigidos a nuevas vías patogénicas relevantes en las distintas formas de presentación que tiene la IC.

En los últimos años, la HP por cardiopatía izquierda (HPCI) se ha convertido en un problema emergente y en este contexto la toma de decisiones resulta muy compleja y plantea numerosos problemas diagnósticos y terapéuticos. La prevalencia exacta de la HPCI no es del todo conocida, debido entre otras causas a los siguientes factores: 1) los datos disponibles actualmente están extraídos de estudios epidemiológicos en pacientes con IC o provienen de centros terciarios de referencia^{7, 12-13}; 2) el diagnóstico de HP está basado en hallazgos ecocardiográficos con puntos de corte muy diversos; 3) las poblaciones estudiadas son muy heterogéneas respecto a edad, síntomas o FEVI; y 4) no en todos los estudios se disponía de datos hemodinámicos mediante cateterización cardiaca. Como resultado de todo lo enunciado, se han

documentado prevalencias que varían entre el 25 y el 100% de la población estudiada.

2. Clasificación y definiciones

2.1 Definición de hipertensión pulmonar

La definición de HP ha evolucionado durante las últimas décadas. Hoy está ampliamente aceptado que 20 mmHg es el valor superior de la normalidad de la presión arterial pulmonar media (PAPm). Se define HP a toda aquella condición hemodinámica en la que la PAPm sea ≥ 25 mmHg en reposo, siendo este criterio válido para los 5 tipos de HP aceptados actualmente según la clasificación de Dana Point^{1, 14, 15} [tabla 1].

La presión de enclavamiento pulmonar o presión capilar pulmonar (PCP) es un parámetro hemodinámico imprescindible para poder identificar y caracterizar el tipo de HP así como para derivar otros parámetros hemodinámicos importantes como las resistencias vasculares pulmonares (RVP) o el gasto cardiaco (GC). Cuando la PCP es ≤ 15 mmHg, decimos que se trata de una HP precapilar, y cuando es mayor del citado valor, de una HP poscapilar. Las RVP están elevadas en los casos de HP precapilar, debiendo ser > 3 unidades Wood (UW). El último parámetro útil para clasificar y diferenciar los distintos tipos de HP es el gradiente transpulmonar (GTP) que es la diferencia entre el la PAPm y la PCP (PAPm-PCP). Se ha establecido un valor umbral de 12 mmHg para hablar de la existencia o no de un componente reactivo asociado al componente

pasivo de las HP poscapilares. La tabla 2 recoge las definiciones hemodinámicas de HP.

TABLA 1: Clasificación actualizada de la hipertensión pulmonar¹⁵	
1. Hipertensión arterial pulmonar (HAP)	
1.1	HAP idiopática
1.2	HAP hereditaria
1.2.1	BMPR2
1.2.2	ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3	Desconocida
1.3	Inducida por fármacos y toxinas
1.4	Asociada a:
1.4.1	Enfermedades del tejido conectivo
1.4.2	Infección por VIH
1.4.3	Hipertensión portal
1.4.4	Cardiopatías congénitas
1.4.5	Esquistosomiasis
1'	Enfermedad pulmonar venooclusiva y/o hemangiomatosis capilar pulmonar
1''	Hipertensión pulmonar persistente del neonato.
2. Hipertensión pulmonar por cardiopatía izquierda (HPCI)	
2.1	Insuficiencia cardíaca sistólica (fracción de eyección reducida)
2.2	Insuficiencia cardíaca diastólica (fracción de eyección preservada)
2.3	Enfermedad valvular
2.4	Lesiones congénitas y adquiridas de los tractos de entrada o salida del ventrículo izquierdo

2.5 Miocardiopatías congénitas
3. Hipertensión arterial por enfermedades pulmonares o hipoxia
3.1 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
3.2 Enfermedad intersticial pulmonar
3.3 Otras enfermedades pulmonares con patrón mixto restrictivo y obstructivo
3.4 Síndrome de apnea-hipopnea del sueño
3.5 Enfermedades con hipoventilación alveolar
3.6 Exposición crónica a grandes altitudes
3.7 Alteraciones del desarrollo
4. Hipertensión pulmonar por enfermedad tromboembólica crónica
5. Hipertensión pulmonar con mecanismo poco claro o multifactorial
5.1 Enfermedades hematológicas: anemia hemolítica crónica, síndromes mieloproliferativos, esplenectomía.
5.2 Enfermedades sistémicas: sarcoidosis, histiocitosis de células de Langerhans, linfangioleiomiomatosis.
5.3 Enfermedades metabólicas: enfermedad por depósito de glucógeno, enfermedad de Gaucher, alteraciones tiroideas.
5.4 Otros: obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosante, insuficiencia renal crónica, hipertensión pulmonar segmentaria.

2.2 Clasificación de la hipertensión pulmonar

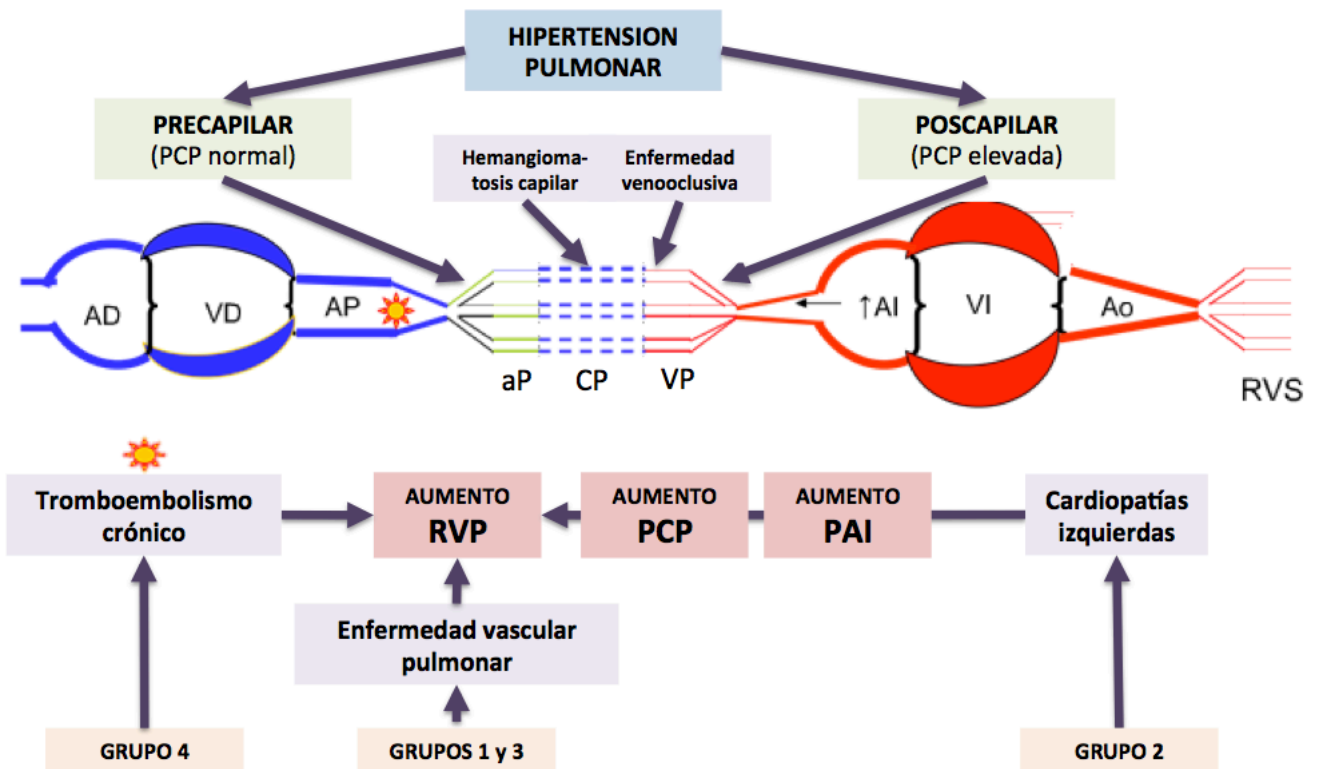
La clasificación de la HP que está vigente actualmente es la fue acordada en el 4º Simposio Internacional de HP que tuvo lugar en Dana Point, California en 2009¹⁴, y que fue actualizada en el 5º Simposio Internacional

de HP celebrado en Niza el año 2013¹⁵. La clasificación comprende 5 grupos diferenciados entre sí por sus características fisiopatológicas y por sus opciones terapéuticas (figura 1):

TABLA 2: Definiciones hemodinámicas de hipertensión pulmonar		
Definición	Características	Tipo
HP	PAPm \geq 25 mmHg	Todos
HP precapilar	PAPm \geq 25 mmHg PCP \leq 15 mmHg GC normal o disminuido	Grupo 1 Grupo 3 Grupo 4 Grupo 5
HP poscapilar	PAPm \geq 25 mmHg PCP $>$ 15 mmHg GC normal o disminuido	Grupo 2
Pasiva	GTP \leq 12 mmHg	
Reactiva	GTP $>$ 12 mmHg	

- **Grupo 1: Hipertensión arterial pulmonar (HAP);** se debe generalmente a anomalías en la pared de las arteriolas pulmonares, aunque también incluye la enfermedad venooclusiva pulmonar (enmarcada como grupo 1'). Los cambios histológicos subyacentes dependen de la etiología concreta.
- **Grupo 2: Hipertensión pulmonar debida a cardiopatía izquierda (HPCI);** secundaria a la transmisión retrógrada hacia las venas pulmonares de presiones elevadas de llenado de las cámaras izquierdas.

Figura 1: Clasificación “topográfica” de la hipertensión pulmonar



AD: aurícula derecha; VD: ventrículo derecho; AP: arteria pulmonar; aP: arteriolas pulmonares; CP: capilares pulmonares; VP: vénulas y venas pulmonares; AI: aurícula izquierda; VI: ventrículo izquierdo; Ao: aorta; RVS: resistencias vasculares sistémicas; RVP: resistencias vasculares pulmonares; PCP: presión capilar pulmonar; PAI: presión aurícula izquierda.

- **Grupo 3: Hipertensión pulmonar por enfermedades pulmonares o hipoxia;** la HP se debe a alteraciones en las arteriolas precapilares por enfermedades pulmonares o hipoxemia, y hasta cierto punto se puede entender como una respuesta fisiológica.
- **Grupo 4: Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC);** la HP se debe a una obstrucción mecánica de las arterias y arteriolas pulmonares derivadas de la embolia pulmonar.

- **Grupo 5: Hipertensión pulmonar por mecanismos poco claros o multifactoriales;** es un cajón de sastre que abarca procesos hasta ahora desconocidos o que no encajan en ninguna de las categorías anteriores.

2.3 Tipos de hipertensión pulmonar por cardiopatía izquierda

Dentro de la HP del grupo 2, podemos diferenciar distintos subgrupos en función de la etiología y de las características hemodinámicas de la HP. La primera clasificación, la etiológica, reconoce los siguientes tipos¹⁶:

- Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo reducida (ICFEVI-r); previamente conocido como disfunción sistólica (FEVI < 50%) y que agrupa sobre todo a pacientes con miocardiopatía dilatada (MCD) y miocardiopatía isquémica (MCI).
- Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo preservada (ICFEVI-p); previamente conocido como disfunción diastólica (FEVI >50%) y que agrupa a diversas enfermedades como cardiopatía hipertensiva, enfermedad coronaria, cardiopatía diabética, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía restrictiva o pericarditis constrictiva.
- Enfermedades valvulares: incluye tanto afectación de la válvula aórtica (estenosis/regurgitación) como de la válvula mitral (estenosis/regurgitación), así como la HP persistente después de la reparación quirúrgica de una valvulopatía.

- Lesiones congénitas y adquiridas de los tractos de entrada o salida del ventrículo izquierdo y miocardiopatías congénitas, este subgrupo ha sido recientemente añadido tras la actualización de la clasificación de Dana Point en 2013¹⁵.

Desde el punto de vista hemodinámico, existen dos subtipos (poscapilar y precapilar) que se diferencian por la presencia o ausencia de enfermedad vascular pulmonar, que puede coexistir con una PCP elevada. El GTP y las RVP (que se calculan dividiendo el GTP por el gasto cardiaco), nos ayudan a diferenciar entre los subtipos del HP del grupo 2^{1,17}. El GTP normal es 6 ± 2 mmHg¹⁸, pero en la práctica clínica se consideran normales GTP de hasta 12 mmHg. De la misma forma, los valores normales de RVP son $0,9 \pm 0,4$ UW, pero valores en la práctica habitual se aceptan valores de hasta 3 UW para diferenciar el componente precapilar del poscapilar. A su vez, la HP precapilar puede subdividirse entre reversible o irreversible en función de la respuesta del GTP y las RVP a los test de vasorreactividad.

TABLA 3: Definición propuesta para la hipertensión pulmonar por cardiopatía izquierda

Terminología	PCP	DPD (PAPd-PCP)
HP poscapilar (aislada)	> 15 mmHg	< 7 mmHg
HP mixta (precapilar combinada con poscapilar)	> 15 mmHg	≥ 7 mmHg

No obstante, en la literatura especializada se han utilizado múltiples términos y puntos de corte para definir este componente reactivo y sus subtipos. Esta ambigüedad lleva a la confusión y a la aparición de términos

como “HP desproporcionada” que no se basan en ningún parámetro hemodinámico claro¹. Recientemente, un grupo de expertos¹⁹ ha propuesto realizar la diferenciación entre un subtipo y otro en función de un nuevo parámetro hemodinámico, la diferencia de presión diastólica (DPD), que se calcula restando a la presión diastólica de la arteria pulmonar la PCP. La ventaja que aporta este nuevo parámetro es que a diferencia del GTP que es influenciado por todos los determinantes de la PAPm (flujo pulmonar, resistencias y presión de llenado del VI) la presión diastólica se mantiene constante, lo que probablemente refleja una menor sensibilidad del árbol vascular pulmonar a la distensibilidad de sus paredes^{20,21}. Por ello, estos autores consideran que la DPD es el parámetro que mejor puede valorar la existencia de enfermedad vascular pulmonar. En sujetos sanos el DPD varía entre 1 y 3 mmHg, aunque valores de hasta 5 mmHg se pueden considerar normales²². El punto de corte propuesto para este parámetro que nos permita diferenciar entre HP poscapilar y precapilar es el de 7 mmHg [tabla 3].

HPCI poscapilar o pasiva

Se considera que la HP es poscapilar o pasiva cuando la principal causa de la elevación de la PAPm es la transmisión retrógrada de presiones elevadas de llenado de las cavidades izquierdas (que pueden ser potenciadas por la aparición de regurgitación mitral con el ejercicio o la pérdida de la distensibilidad auricular²³). En este caso, tanto el GTP (o DPD) como las RVP son normales. Este tipo de HP es la forma más prevalente, y aparece en fases iniciales de la IC. La ausencia de un GTP/DPD elevado implica que no hay alteraciones significativas de la estructura o función del lecho arterial pulmonar. Este tipo de HP puede

tratarse con terapias dirigidas a la IC, como son los diuréticos o vasodilatadores sistémicos. Estos pacientes no serían candidatos a recibir tratamiento con agentes selectivos de la circulación pulmonar.

HPCI mixta, precapilar o reactiva

Se conoce como HP mixta, reactiva o precapilar a aquella en la elevación de la PAPm es debida tanto a una PCP elevada como al desarrollo de alteraciones estructurales y funcionales de las arterias pulmonares. En este caso el GTP (o DPD) y las RVP estarán elevados¹. A su vez, la HP precapilar puede subdividirse entre reversible o irreversible en función de la respuesta del GTP y las RVP a diferentes intervenciones terapéuticas conocidas como test de vasorreactividad (por ejemplo inhalación de óxido nítrico –NO). A diferencia de la HP pasiva, la reactiva sí que se considera que pudiera beneficiarse de recibir tratamiento con vasodilatadores pulmonares, ya que éstos pueden revertir el componente reactivo y reducir el GTP/DPD y las RVP a niveles aceptables en un porcentaje de pacientes.

Estos pacientes a los que se puede revertir el componente reactivo sólo presentan cambios funcionales pero no estructurales de su árbol arterial pulmonar. La existencia o no de reversibilidad tiene una importancia capital para indicar o contraindicar un trasplante cardiaco y es un indicador pronóstico de la supervivencia postrasplante²⁴. Si las RVP no se reducen por debajo de 3 UW se considera que son irreversibles. En este estado se habrían consumado ya una serie de cambios histológicos en la pared de las arterias y arteriolas pulmonares, que pueden ser indistinguibles de otras formas de HP precapilar^{1,2}. Sin embargo, la

evidencia clínica, y estudios más recientes muestran que la no respuesta al el test de vasorreactividad no implica irreversibilidad^{24,25,26}.

La valoración de la reversibilidad de las RVP se suele hacer de forma aguda tras la administración de un fármaco, como es el caso del NO inhalado. No obstante, hay un grupo de pacientes que pese a no ser respondedores a la intervención farmacológica aguda se ha documentado que presentan una reversibilidad tardía objetivada después del trasplante o del implante de una asistencia ventricular^{25,26}. La posibilidad de este hecho ha de contemplarse cuando se evalúa la potencial idoneidad de un paciente como candidato a trasplante. Aunque la reversibilidad aguda es un importante criterio de selección, han de considerarse alternativas terapéuticas más a medio plazo, si el paciente no es respondedor. Se han objetivado descensos de las RVP tras varios días o semanas de tratamiento combinado con diuréticos, inhibidores de la fosfodiesterasa y agentes vasoactivos²⁴. Por estos motivos, fuera de la selección de candidatos a trasplante, el test de vasorreactividad no tiene utilidad para diferenciar entre grupos hemodinámicos o pronósticos dentro de la HP mixta.

3. Etiopatogenia

Podemos decir que la HPCI se debe a un aumento de las presiones de llenado del corazón izquierdo a la que puede asociarse vasoconstricción pulmonar arterial reactiva y posteriormente remodelado de la pared arteriolar²⁷. Aquellos pacientes con IC con tratamiento médico óptimo y que desarrollan HP suponen un reto terapéutico.

Se cree que la gravedad de la HPCI depende más de la exposición prolongada en el tiempo a la hiperpresión venosa en la circulación pulmonar que a la FEVI o a la clase funcional del paciente^{12,28}. Por tanto, las presiones de llenado del VI y la existencia de regurgitación mitral juegan un papel determinante en el desarrollo y progresión de la HP²⁹. La elevación crónica de las presiones de llenado del VI se refleja en una dilatación de la aurícula izquierda, que se correlaciona de forma intensa con la PAPs tanto en pacientes con FEVI-r como FEVI-p^{30,31}. La gravedad de la HP evoluciona de forma paralela a la gravedad de la insuficiencia mitral en pacientes con IC avanzada. La predisposición genética también juega un papel en el desarrollo de HPCI, aunque los datos disponibles hasta la fecha ofrecen datos conflictivos^{32,33}.

La importancia de la disfunción diastólica en el desarrollo de HP en pacientes con IC FEVI-r está siendo cada vez más reconocida¹². En este grupo de pacientes, la presencia de un llenado restrictivo, más que la FEVI o el gasto cardiaco, es el dato que mejor se correlaciona con la gravedad de la HP. En un estudio, los mejores predictores de probabilidad de desarrollar HP fueron los parámetros de función diastólica (cociente $E/e' > 15$ y tiempo de deceleración de onda E < 150 ms) y la presencia de insuficiencia mitral.

La disfunción diastólica, asociada con enfermedad valvular o FEVI-r es el mediador común de la HPCI. Las personas ancianas son más vulnerables a desarrollar HP debido a un aumento de la rigidez de las paredes vasculares (incluidas las pulmonares) directamente relacionado con el envejecimiento, y que es más acusado en el sexo femenino³⁴. La prevalencia de la disfunción diastólica en la población general varía del

11,1 al 34,7% según la población estudiada, los criterios aplicados y el tipo de prueba de imagen utilizada. Al igual que la disfunción diastólica, la PAP normal también aumenta con la edad, lo que indica que se trata de un proceso común de envejecimiento vascular.

El papel de la HP en la IC aguda está menos estudiado. Es característico de esta enfermedad un empeoramiento agudo de la situación hemodinámica, pero existen muy pocos estudios que hayan documentado los cambios en estos parámetros a lo largo del tiempo y sus repercusiones a corto y largo plazo. En pacientes ambulatorios, cambios dinámicos en la PAP predicen eventos clínicos de IC aguda³⁵. Además, elevaciones mantenidas en las presiones de llenado del VI predicen eventos de descompensación tanto en pacientes con IC FEVI-r como IC FEVI-p³⁶. En un estudio³⁷ con 242 pacientes, se documentó la existencia de un componente de HP pasivo, rápidamente reversible tras 48 h de tratamiento con diuréticos y vasodilatadores, y que se debía a una sobrecarga de volumen.

En las enfermedades valvulares, las alteraciones estructurales resultan en alteraciones hemodinámicas que llevan a la HP. La prevalencia de la misma incrementa en paralelo a la gravedad de la valvulopatía y a los síntomas asociados. La valvulopatía mitral, tanto estenosis como insuficiencia, provoca un aumento de la presión de la aurícula izquierda, que a su vez es la que nos lleva a la aparición de HP. De hecho, esta valvulopatía se considera el prototipo de enfermedad cardíaca que provoca HP³⁸ y su aparición juega un papel primordial en el manejo de la enfermedad primaria³⁹. La estenosis aórtica provoca HP debido a la hipertrofia del VI y a la disfunción diastólica del mismo, que es la que ocasiona el aumento de las presiones pulmonares. Aunque de forma

menos frecuente, la insuficiencia aórtica (IA) puede conducir a una situación de HP debido a una elevación crónica de la presión de llenado del VI, que a su vez provoca un aumento de presión en la AI y por tanto de las presiones pulmonares.

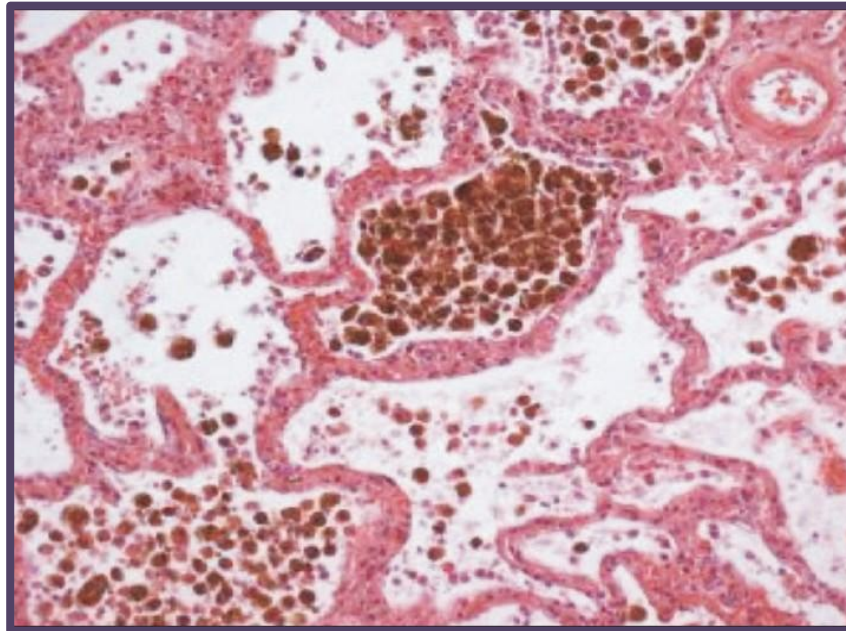
La principal complicación de la HP es la afectación del VD. La exposición crónica del VD a una poscarga elevada, y muy frecuentemente también, a una precarga aumentada debido a la dilatación ventricular y a la insuficiencia tricuspídea (IT) funcional resultante, provoca un deterioro de la función sistólica del VD. El pronóstico de los pacientes con HP se ensombrece con el desarrollo de disfunción del VD^{7,8}. Su aparición conlleva el empeoramiento de los síntomas de IC, facilitando la formación de edemas al aumentar la presión venosa central (PVC). Además, se forma un círculo vicioso de aumento de las RVP debido a la acumulación de líquido intersticial pulmonar. La disfunción del VD causa dilatación auricular, lo que lleva a la liberación de péptidos natriuréticos, pero a su vez, aumenta la presión venosa renal, lo que ocasiona una reducción de la presión de filtración a nivel del glomérulo. Esto último lleva a una menor excreción de sodio, entrando en un círculo vicioso que puede conducir a un estado de IC refractaria⁴⁰.

A nivel anatomopatológico, la HPCI se caracteriza por presentar unas venas pulmonares dilatadas y de paredes engrosadas, dilatación capilar pulmonar, edema intersticial, hemorragia alveolar y dilatación de vasos y ganglios linfáticos. Las arteriolas y arterias más distales pueden presentar hipertrofia de la capa media y fibrosis intimal como consecuencia del resultado de la remodelación de la pared vascular mediada por las células

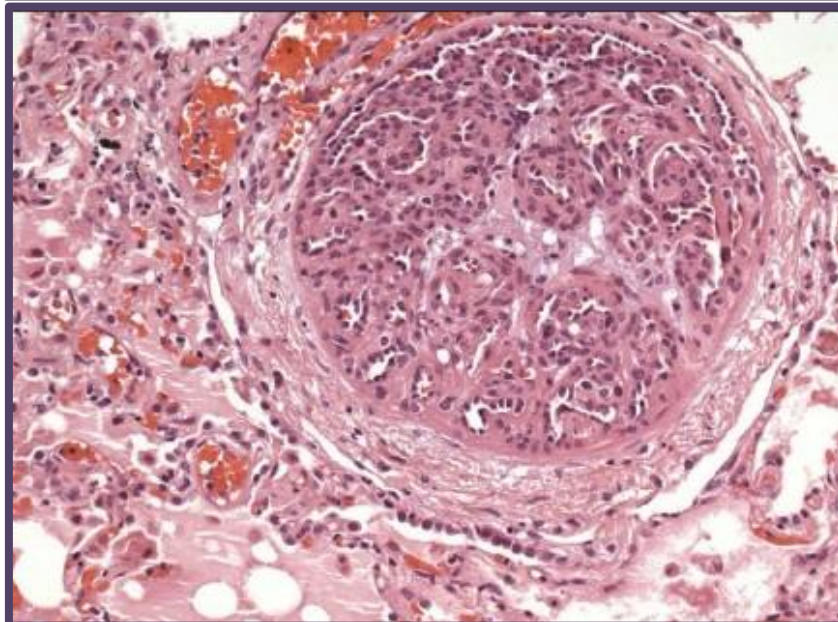
musculares lisas⁴¹. La extensión y el patrón de remodelado vascular es similar al que se objetiva en las HP del grupo 1⁴² (figura 2).

Figura 2: Hallazgos anatomopatológicos en la HP

a)



b)



a) HP poscapilar: venas pulmonares dilatadas y de paredes engrosadas, dilatación capilar pulmonar, edema intersticial, hemorragia alveolar; b) HP precapilar: proliferación intimal e hipertrofia de la media dando lugar a lesiones plexiformes, con múltiples canales capilares en su luz rodeados de células endoteliales abombadas (típicas de la HP del grupo 1).

3.1 Hipertensión pulmonar inducida por ejercicio

Aunque la mayoría de los datos disponibles acerca de la fisiopatología de la HP se basan en estudios realizados en reposo, los pacientes desarrollan síntomas de HP más frecuentemente durante el ejercicio⁴³. Hasta hace poco, la respuesta de la PAP al ejercicio se consideraba como un criterio diagnóstico de HP, ya que el ejercicio es un estresante fisiológico que puede destapar HP ocultas en reposo¹. Sin embargo, su papel en la evaluación de la HP ha sido cuestionado debido sobre todo a que la PAPm aumenta durante el ejercicio con el envejecimiento¹⁸ y a la existencia de múltiples tipos y protocolos de test de esfuerzo⁴⁴. La HP inducida por el ejercicio es común en pacientes con IC⁴⁵ y se considera factor pronóstico, especialmente si se acompaña de un aumento de las presiones de llenado del VI⁴⁶. La respuesta de la PAP a un aumento del gasto cardiaco durante el ejercicio, proporciona una valiosa visión de la fisiopatología de la intolerancia al ejercicio y la reserva cardiovascular⁴⁶. En un estudio con pacientes con IC FEVI-p, un 88% de ellos desarrollaron PAPm \geq 30 mmHg durante el ejercicio⁴³. Se ha postulado que la HP inducida por ejercicio sería una parte inicial del espectro continuo que va desde la ausencia de HP a la HP con enfermedad vascular pulmonar severa⁴⁷.

La obtención de datos hemodinámicos fiables durante el ejercicio es dificultosa, debido a las oscilaciones de la presión intratorácica en el contexto del aumento de la frecuencia respiratoria y el volumen corriente⁴⁸. Por ello es preferible realizar la valoración durante un ejercicio submáximo. Los cambios objetivados en la PCP durante un ejercicio gradual no son lineales, sino que la mayor parte del aumento (80%) ocurre durante los estados iniciales del ejercicio⁴³.

Las maniobras de provocación como son el ejercicio o la sobrecarga salina pueden desenmascarar aumentos excesivos de la PAP durante un estrés moderado en pacientes con disfunción diastólica con riesgo de desarrollar IC. En estos pacientes con PAP normal en reposo y ausencia de signos de congestión y elevación de biomarcadores de IC, la información aportada con el ejercicio puede ser relevante para el manejo de su enfermedad⁴³.

4. Epidemiología

La prevalencia real de la HPCI, particularmente en casos de ICFEVI-p, es incierta, si bien los datos disponibles sugieren que afecta a una amplia proporción de pacientes con IC. En el estudio comunitario de Buersi et al¹³, que incluye a más de 1000 pacientes, se documentó una presión sistólica de arteria pulmonar > 35 mmHg, medida por ecocardiografía, en un 79% de pacientes. Según los criterios diagnósticos empleados en otros estudios, la prevalencia oscila entre 50 y 80%^{12,28}. Cabe destacar aquí que, utilizar un valor de PsAP de 25 mmHg como criterio diagnóstico de HP, lleva a la sobreestimación como consecuencia de los falsos positivos. De hecho, el estudio de Leung et al²⁸ en el que se utilizó como diagnóstico de HP una PAPm \geq 25 mmHg, la prevalencia de HP en pacientes con ICFEVI-p fue del 53%.

Las prevalencias documentadas de HP en pacientes con ICFEVI-r varían entre un 16 y un 63%, dependiendo de la población investigada y de los criterios diagnósticos utilizados^{7,49-51}. La presencia y severidad de la HP dentro de un mismo individuo puede no sólo variar a lo largo de la evolución de la enfermedad, sino también en periodos cortos de tiempo

en función de su estado de compensación⁵². La prevalencia aumenta con la progresión de la enfermedad; en un estudio⁵³, 53% con IC avanzada presentaban RVP elevadas ($\geq 2,5$ UW), 43% de los pacientes en situación NYHA III-IV tenían RVP $\geq 2,5$ UW, y en un 41,3% de los pacientes estudiados para trasplante cardiaco se alcanzaron estos valores.

En el estudio de Aronson³⁷ en IC aguda, únicamente el 1% de los pacientes estudiados presentaba ausencia de HP, 60% mostraban un patrón hemodinámico de HP poscapilar, mientras que el 39% restante mostró un patrón de HP precapilar. Tras 48 h de tratamiento con diuréticos y vasodilatadores, el porcentaje de pacientes con HP poscapilar había descendido al 25%, mientras que el de HP precapilar había aumentado al 50%. Esto se debió a que un 15% de pacientes clasificados como poscapilares durante la descompensación se reclasificaron después de eliminar la sobrecarga de líquido como precapilares. Además, un 45% de los pacientes precapilares mostraron menores valores de PCP, PAPm y RVP tras el tratamiento, aunque no cambiaron de categoría. Por todo esto, no es recomendable clasificar al paciente dentro de un grupo u otro de HP durante un episodio de IC aguda.

La HP es una complicación muy frecuente de la valvulopatía mitral y puede afectar hasta un 73% de los pacientes según la gravedad de la enfermedad^{39,54}. En la estenosis mitral (EM), cuando ésta es moderada o severa, se asocia a HP en la mayoría de pacientes, aunque la gravedad es variable. En pacientes con insuficiencia mitral (IM) aislada con buena FEVI, HP considerada como PAPs ≥ 50 mmHg medida mediante cateterismo cardiaco derecho (CCD) se encontró en un 17 % de pacientes⁵⁵. En pacientes con IM asintomática se documentó que la aparición de HP (PAPs

≥ 60 mmHg) durante el ejercicio en un 46% de pacientes, mientras que en reposo, la cifra descendía al 15%²³.

La prevalencia de HP en pacientes con enfermedad valvular aórtica es menor que en los pacientes mitrales, pero aun así, es considerable con valores de entre 30-50%⁵⁶⁻⁵⁸. En estenosis aórtica (EA) severa se ha documentado valores de PAPs ≥ 30 mmHg en un 50% de pacientes⁵⁷, y en un 29% si el punto de corte son 50 mmHg⁵⁶. En la IA severa, los registros indican una prevalencia de HP del 10 al 20%⁵⁹.

La HP de otros grupos se consideran una enfermedad rara, aunque probablemente su prevalencia global esté subestimada, ya que hay múltiples procesos que pueden conducir a una HP⁶⁰. El grupo I (HAP) es el más conocido en la actualidad, gracias a diferentes registros en marcha.

En Europa, el más relevante es el registro francés. Según éste, la prevalencia estimada de HAP es de unos 15 casos por millón de habitantes, con predominio de la HAP idiopática (39,2%), seguida de la asociada a conectivopatías (15,3%), cardiopatía congénita (11,3%), de origen portopulmonar (11,4%), relacionada con anorexígenos (9,5%), con el virus de la inmunodeficiencia humana (6,2%) y de carácter familiar (3,9%); el resto (4,3%) es multifactorial. De forma global es más prevalente en el sexo femenino con una relación de 1.9 a 1⁶¹.

5. Diagnóstico

El CCD es el patrón oro para el diagnóstico definitivo de la HP. Aunque la definición de HPCI conlleva la necesidad de un estudio hemodinámico, en

la práctica diaria no es necesaria en todas las circunstancias la realización de un CCD. Las características clínicas del paciente junto con un estudio ecocardiográfico minucioso, puede proporcionar información suficiente para el manejo adecuado del paciente.

TABLA 4: Factores que indican mayor probabilidad de HP de causa izquierda

1. Características clínicas
Edad > 65 años
Presión arterial sistólica elevada
Presión de pulso elevada
Obesidad
Síndrome metabólico
Hipertensión arterial
Diabetes mellitus
Fibrilación auricular
2. Ecocardiografía
Aumento del tamaño de la aurícula izquierda
Hipertrofia del ventrículo izquierdo
Presencia de indicadores ecocardiográficos de presión de llenado del VI elevada
3. Evaluación provisional
Respuesta sintomática a los diuréticos
Aumento exagerado de la presión arterial sistólica durante el ejercicio
Radiografía torácica concordante con insuficiencia cardiaca

En pacientes en los que se sospecha HP, ciertas características favorecen la posibilidad de que se trate de una HP de grupo 2 [tabla 4]. Entre éstas se incluyen la edad > 65 años, HTA, obesidad, enfermedad coronaria, diabetes mellitus y fibrilación auricular^{1,62}. Clínicamente, los pacientes pueden presentar signos y síntomas que generalmente no aparecen en otras formas de HP, como ortopnea o disnea paroxística nocturna (DPN)⁶³.

5.1 Evaluación no invasiva

Las radiografías de tórax pueden mostrar congestión vascular pulmonar, derrame pleural o edema alveolar y el ECG puede ser patente una hipertrofia del VI. En la ecografía torácica puede identificarse el signo del cometa pulmonar como reflejo de la congestión intersticial⁶⁴. El ecocardiograma doppler es la prueba diagnóstica óptima para el despistaje de la HPCI⁶³. Además, las pruebas de esfuerzo cardiopulmonar se están utilizando de forma cada vez más frecuente en la evaluación y manejo de los pacientes con ICFEVI-r y ICFEVI-p⁶.

La ecocardiografía nos dará fácilmente el diagnóstico de ICFEVI-r y de enfermedad valvular. El diagnóstico de ICFEVI-p con disfunción diastólica es más complejo. Se debe sospechar la presencia de esta disfunción ante la presencia combinada de varios signos: dilatación de AI, fibrilación auricular, cambios sugestivos en el flujo transmitral (ondas E y A), cambios sugestivos en el flujo venoso pulmonar, velocidad disminuida del anillo mitral (e') e hipertrofia del VI.

Las presiones de llenado del VI se pueden estimar mediante ecocardiografía, sobretodo mediante el cociente E/e' que ha demostrado

ser un parámetro fiable para estimar la presión de la AI^{65,66}, aunque esta fiabilidad baja en condiciones de precarga elevada, como ocurre con la sobrecarga aguda de suero salino. Las presiones pulmonares pueden estimarse mediante ecocardiografía basándose en la velocidad del chorro de regurgitación tricuspídea. Si se le añade la presión estimada de la aurícula derecha utilizando el diámetro de la vena cava inferior al gradiente transtricuspídeo, en ausencia de estenosis pulmonar, se puede estimar la PsAP. La factibilidad de realizar esta medida en pacientes con IC se da en más de un 90% de pacientes^{67,68}. La correlación entre las mediciones estimadas por ecocardiografía y por un CCD es alta, ($r= 0,82-0,97$)^{69,70} con diferencias entre ambas técnicas menores a 10 mmHg. No obstante, la concordancia es más baja y la ecocardiografía podría no ser fiable en casos de disfunción grave del VD⁷¹. La estimación de la PAPm con Doppler se puede obtener mediante la evaluación de la velocidad del chorro de insuficiencia pulmonar en la diástole temprana, si bien la correlación con el cateterismo es débil debido a la dificultad para visualizar exactamente el perfil regurgitante a nivel de la válvula pulmonar⁶⁹. La PdAP puede ser calculada también por medio de la insuficiencia pulmonar midiendo la velocidad del chorro regurgitante en telediástole⁶⁹.

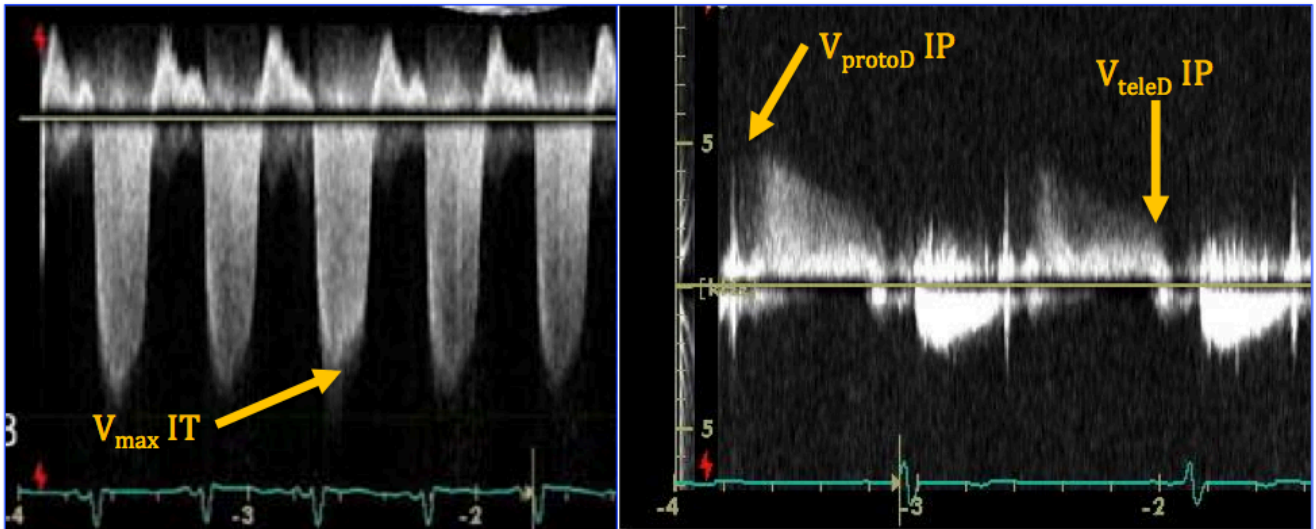
Algunos autores han intentado incluso estimar las RVP mediante ecocardiografía⁷². En un primer trabajo se objetivó una muy buena correlación ($r=0,93$) entre las RVP y el cociente entre la velocidad del chorro de IT y la integral velocidad-tiempo del flujo del tracto de salida del VD. Este trabajo estableció un punto de corte para este cociente de 0,175 para predecir $RVP > 2$ UW con una sensibilidad y especificidad de un 77 y

un 81%. Esta aproximación ha sido utilizada y validada en pacientes candidatos a trasplante hepático⁷³, en pacientes con hipertensión pulmonar arterial⁷⁴, y en cardiopatías congénitas⁷⁵. Un problema derivado de estos trabajos es que éste cociente tiene una alta sensibilidad y valor predictivo negativo para detectar $PVR > 2 \text{ UW}$, pero la correlación con la hemodinámica empeora conforme aumentan las PVR. Por lo tanto, esta estimación no invasiva tiene mayor utilidad como *screening* para descartar presencia de PVR elevadas [tabla 5] (figura 3).

TABLA 5: Estimación de parámetros hemodinámicos por ecocardiografía doppler		
Parámetro	Signo ecocardiográfico	Valor de corte
Presiones de llenado del VI	Cociente E/e'	-
Presión sistólica de la arteria pulmonar (PsAP)	$4x(V_{\max IT})^2 + PAD$ Gradiente transtricuspídeo + Presión estimada de la aurícula derecha	$\geq 30 \text{ mmHg}$
Presión pulmonar media (PAPm)	$4x(V_{\text{protodiastole_IP}})^2 + PAD$ 4 x (velocidad del chorro de insuficiencia pulmonar en la diástole temprana) ² + Presión estimada de la aurícula derecha	$\geq 25 \text{ mmHg}$
Presión diastólica de la arteria pulmonar (PdAP)	$4x(V_{\text{telediastole_IP}})^2 + PAD$ 4 x (velocidad del chorro de insuficiencia pulmonar en la telediástole) ² + Presión estimada de la aurícula derecha	-
Resistencias vasculares pulmonares (RVP)	$(V_{\max IT} \text{ (m/s)} / IVT \text{ TSVD (cm)} \times 10 + 0.16)$ Cociente entre la velocidad del chorro de IT y la integral velocidad-tiempo del flujo del tracto de salida del VD	0,175

Figura 3: Doppler espectral de los flujos transtricuspídeo y pulmonar

a) Doppler espectral flujo transtricuspídeo b) Doppler espectral flujo pulmonar



a) Doppler espectral flujo transtricuspídeo. La velocidad máxima del chorro de regurgitación tricuspídea permite estimar la PsAP; b) Doppler espectral flujo pulmonar. La velocidad del chorro de regurgitación en protodiástole permite estimar la PAPm mientras que la velocidad del chorro en telediástole permite estimar la PsAP.

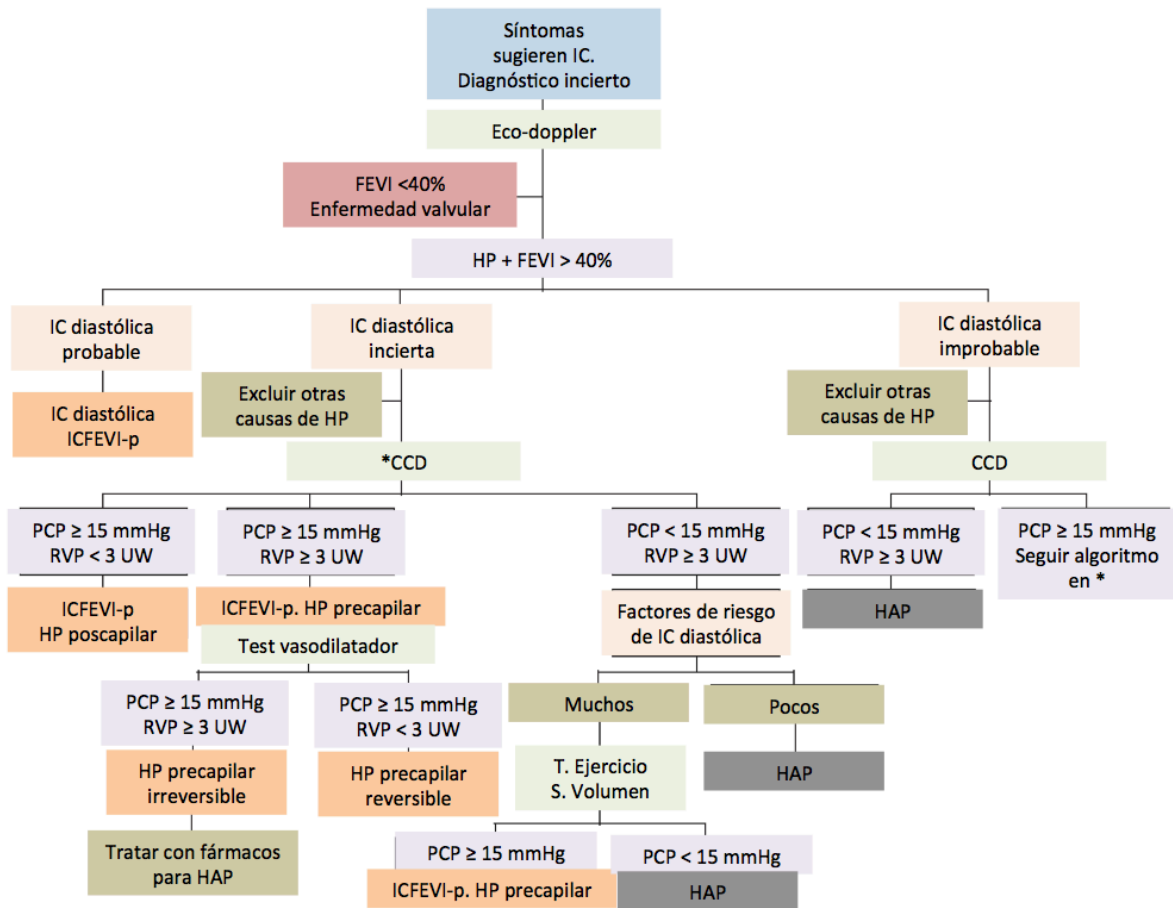
En caso de conseguir el diagnóstico de certeza de IC-FEVI-p, basándonos en las características del paciente, los hallazgos de la exploración y los resultados de las pruebas no invasivas, las guías de práctica clínica (GPC) proponen dividir a los pacientes en 3 grupos (figura 4):

- 1) Aquellos con poca probabilidad de padecer IC-FEVI-p (jóvenes, normotensos, sin coronariopatía, etc.)
- 2) Aquellos con alta probabilidad de padecer IC-FEVI-p (viejos, hipertensos, obesos, hipertrofia VI, dilatación AI...)

3) Aquellos con una probabilidad intermedia de ICFEVI-p pero sin signos de IC y sin elevación de péptidos natriuréticos⁷⁶.

En este último grupo de pacientes, el CCD es la prueba de elección, y si se objetiva una PCP < 15 mmHg se recomienda realizar una sobrecarga de fluido para desenmascarar una disfunción diastólica oculta.

Figura 4: Algoritmo diagnóstico para diferenciar entre HPCI y HAP



IC: insuficiencia cardiaca; FEVI: fracción eyección ventrículo izquierdo; HP: hipertensión pulmonar; ICFEVI-p: insuficiencia cardiaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo preservada; CCD: cateterismo cardiaco derecho; PCP: presión capilar pulmonar; RVP: resistencias vasculares pulmonares; HAP: hipertensión arterial pulmonar.

5.2 Evaluación invasiva

Se recomienda realizar un CCD cuando sea necesario afinar la gravedad y/o la reversibilidad de la HP (pacientes candidatos a trasplante cardiaco o a una asistencia ventricular). Antes de realizar un estudio hemodinámico se recomienda descartar otros factores que también aumentan las presión pulmonar: a) enfermedad respiratoria (enfisema, enfermedad obstructiva crónica, fibrosis pulmonar); b) apnea del sueño, y c) enfermedad tromboembólica crónica.

En el CCD se deben registrar: presión de la arteria pulmonar (sistólica, diastólica y media), presión de la aurícula derecha, PCP, presión del VD, gasto cardiaco y RVP. Es necesario ser riguroso en la determinación de la PCP, ya que un valor < 15 mmHg, establece el diagnóstico de HAP. La influencia de las presiones intratorácicas en las presiones intracardiacas es próxima a cero al final de la espiración; ése es el momento correcto para la medición de la PCP. Además, el catéter debe tener una posición correcta que garantice una buena transmisión de la presión de la AI a través del lecho capilar pulmonar. Se recomienda estudiar la onda a y la onda v, que deben diferenciarse con claridad y obtener una oximetría del extremo distal del catéter para confirmar que la posición es correcta (la saturación de O_2 obtenida ha de ser similar a la saturación de O_2 de la sangre arterial). En ocasiones es necesario penetrar más distalmente el catéter en el vaso pulmonar para conseguir un buen trazado.

En algunos pacientes con un perfil clínico muy indicativo de HPCI y que han recibido diuréticos, pueden observarse valores bajos de PCP. Para verificar el diagnóstico de HAP se recomienda realizar un cateterismo

derecho con sobrecarga de volumen o con ejercicio. Estos procedimientos no están estandarizados, y cada laboratorio de hemodinámica tiene su propio protocolo. El cateterismo con sobrecarga de volumen es más sencillo, y en esencia, consiste en infundir 1000 ml de suero fisiológico en 20 minutos; se realizan mediciones cada 250 ml y se detiene la sobrecarga cuando la PCP es > 18 mmHg y/o aparecen síntomas.

Según las GPC, la HPCI se diferencia de la HP de los otros grupos por la presencia de una PCP ≥ 15 mmHg¹, porque se asume que la PCP es un marcador derivado de la presión de llenado telediastólico del VI. Pero esto no es siempre cierto. En un estudio que incluía más de 400 pacientes con HP, cerca de la mitad de aquellos que fueron diagnosticados de HAP basándose en los valores de PCP, tenía en realidad HPCI cuando se midió la presión telediastólica del VI (PTDVI) con un cateterismo izquierdo. Sin embargo, la medición de forma rutinaria de la PTDVI eleva los riesgos y las molestias para los pacientes, así como el gasto médico y el consumo de recursos. La medida de la PTDVI sólo en aquellos con una sospecha elevada de HPCI pero PCP *borderline*, sería una solución adecuada. Sin embargo, otros autores abogan por optimizar la correlación entre PCP y PTDVI, por ejemplo, utilizando la PCP al final de la espiración en lugar de la PCP media a lo largo del ciclo respiratorio⁷⁷. Mientras que el punto de corte de 15 mmHg para diagnosticar HPCI tiene una sensibilidad y especificidad de 100% y 12,5% respectivamente si utilizamos la PCP media, en el caso de la PCP teleespiratoria estos valores ascienden al 86% y 100% respectivamente. Sin embargo, este estudio presentaba un sesgo importante, y es que no se tomó la medida de la PTDVI teleespiratoria, que posiblemente estuviera también más elevada que la media. En todo

caso, utilizar la PCP puede llevar a confusión en algunos casos, por lo que se precisa de más estudios que aporten nuevos datos que ayuden a mejorar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de aquellos pacientes que caen en áreas grises y son difíciles de clasificar.

La prueba de esfuerzo y la sobrecarga de volumen se han propuesto como métodos que pueden ayudar a identificar mejor a aquellos pacientes que muestran valores de PCP entre 13 y 18 mmHg en reposo⁷⁸.

6. Tratamiento

6.1 Tratamiento de la insuficiencia cardiaca

La HPIC carece de tratamiento específico. Al contrario de lo ocurrido en la HAP, virtualmente no se ha producido ningún avance en el manejo de la HPIC en los últimos años. De hecho, no está recomendado dar los tratamientos aprobados para la HAP en la HPIC ya que no tienen en el presente momento un perfil riesgo/beneficio favorable. Las medicaciones utilizadas para la IC así como la cirugía valvular o el implante de una asistencia ventricular pueden mejorar la HP mediante una caída en las presiones de llenado del VI¹ pero para aquellos pacientes que mantienen PAPm elevadas a pesar de normalizar la PCP no hay evidencia actualmente de cuál es el mejor proceder.

La optimización del tratamiento médico en la IC FEVI-r (oxígeno, diuréticos, nitratos, bloqueadores del sistema renina angiotensina aldosterona y bloqueadores beta), así como el tratamiento de resincronización, reducen

de forma significativa la PCP y, secundariamente la PAPm. La optimización del tratamiento médico precisa en ocasiones de un ciclo inotrópico (dobutamina, milrinona o levosimendán). En pacientes con ICFEVI-p, las GPC no dan otras recomendaciones aparte de controlar la hipertensión arterial y mantener un estado hídrico correcto, así como optimizar las patologías subyacentes^{1,2}.

6.2 Tratamiento vasodilatador pulmonar

Está en entredicho tratar farmacológicamente de forma directa la HP en estos pacientes. Hipotéticamente, sería beneficioso actuar sobre el componente precapilar de la HP inhibiendo el remodelado vascular⁷⁹. No obstante, revertir el componente precapilar puede provocar un aumento de la PCP que desemboque en un edema alveolar⁸⁰. Los datos provenientes de ensayos clínicos son pocos hasta la fecha, y en general, desalentadores.

El NO inhalado actúa selectivamente sobre la circulación arterial pulmonar y se ha utilizado en el tratamiento de la HPCI grave después de un trasplante cardiaco o del implante de un dispositivo de asistencia ventricular. En los primeros induce un descenso notable de las RVP⁸¹ sin afectar a las resistencias sistémicas. En los segundos, incrementa de forma notable el flujo del dispositivo de asistencia⁸². Sin embargo, otro estudio muestra resultados totalmente contrarios⁸³.

Los prostanoides han mostrado un efecto hemodinámico favorable tanto de forma aguda como a largo plazo, objetivando un descenso de la PAPm, PCP y RVP y un aumento del gasto cardiaco, pero también un descenso de

la presión arterial sistémica⁸³⁻⁸⁵. Sin embargo, el estudio FIRST⁸⁶ con epoprostenol intravenoso no mostró ninguna mejoría en cuanto a morbimortalidad y además, hubo de interrumpirse prematuramente porque se asoció a una tendencia hacia una menor supervivencia.

Respecto a los antagonistas del receptor de endotelina-1, aunque los resultados iniciales parecían prometedores, ya que el bosentán se asoció a un descenso de la PCP y las RVP y a un aumento del gasto cardiaco⁸⁸, los resultados posteriores extraídos de ensayos a gran escala han sido decepcionantes, sin objetivar beneficio alguno y con un aumento del riesgo de empeoramiento de la IC⁸⁹.

Más interés ha despertado el uso de los inhibidores de la fosfodiesterasa-5. En pacientes con IC FEVI-p e HP se ha demostrado que el sildenafil es efectivo (disminuye RVP y aumenta el gasto) a la par que bien tolerado, tanto de forma aguda como a largo plazo⁹⁰⁻⁹⁴. La tolerancia al esfuerzo, la calidad de vida, así como parámetros ecocardiográficos de función del VD también mejoraron⁹⁵. Además, existe evidencia de que el sildenafil puede ayudar a modular e incluso revertir el patrón ventilatorio oscilatorio que presentan los pacientes con IC avanzada⁹⁶. Sin embargo, sigue sin existir un estudio internacional, multicéntrico, controlado que sienta la indicación definitiva para este grupo de fármacos. El estudio PITCH-HF con tadalafilo será el primer ensayo de estas características en investigar el efecto de este grupo terapéutico en la mortalidad y hospitalizaciones de pacientes con HPCI. Los últimos trabajos publicados (verano de 2015) arrojan datos prometedores para el tratamiento de la HP en IC FEVI-r³⁸⁷, pero no tanto en la IC FEVI-p³⁸⁸.

El riociguat actúa como estimulador de la guanilato ciclasa y por una parte sensibiliza a esta enzima al efecto del NO y por otra parte la activa directamente de forma independiente al NO⁹⁷. Su efecto vasodilatador podría estar asociado a efectos antifibróticos, antiproliferativos y antiinflamatorios. Este fármaco ha mostrado mejorar los resultados del test de los 6 minutos marcha (6MM) en pacientes con HP del grupo 1⁹⁸ y 4⁹⁹. Sin embargo en un ensayo clínico realizado en 201 pacientes con ICFEVI-r y HP con dosis crecientes de riociguat, no se objetivo ningún cambio en la PAPm tras 16 semanas de tratamiento¹⁰⁰. Actualmente existe un estudio en marcha que prueba los efectos de este fármaco en pacientes con ICFEVI-p y HP. Los resultados de este estudio, respecto a la respuesta a una dosis aguda, no mostraron cambios en las presiones pulmonares³⁸⁹.

6.3 Tratamiento de la enfermedad valvular

En pacientes con HPIC debida a enfermedad valvular, la corrección de la valvulopatía subyacente generalmente lleva a la resolución o casi resolución del problema¹⁰¹⁻¹⁰². La gravedad de la HP previa a la intervención no parece afectar a la evolución a largo plazo de la enfermedad, ya que se ha documentado normalización completa de las presiones pulmonares después de 6-12 meses incluso en pacientes con PAP \geq 80 mmHg¹⁰².

6.4 Trasplante cardiaco

La HP precapilar irreversible aumenta la mortalidad tanto temprana como tardía del trasplante cardiaco, debido a que el VD del injerto cardiaco puede disfuncionar al enfrentarse a unas RVP elevadas⁵. La mortalidad aumenta de forma paralela a las RVP y no existe un valor umbral de éstas que prediga de forma segura el fallo del VD en el postoperatorio. Por ello, actualmente se consideran las RVP elevadas como una contraindicación relativa más que absoluta para el trasplante cardiaco^{24,103}. No obstante, unas RVP > 5 UW indican que el paciente puede no ser buen candidato para el trasplante cardiaco ortotópico, y que deberían considerarse otras opciones como el trasplante cardiopulmonar¹⁰⁴. Por otro lado, si las RVP se consiguen reducir farmacológicamente por debajo de 2,5 UW sin hipotensión sistémica, el pronóstico de este grupo de pacientes será similar al de aquellos sin HP¹⁰⁵⁻¹⁰⁶.

Los dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI) mejoran la hemodinámica pulmonar en aquellos pacientes que no responden a tratamiento vasodilatador pulmonar, lo que sugiere que los DAVI pueden ser una opción terapéutica para los candidatos a trasplante que presentan HP precapilar no reversible¹⁰⁷⁻¹¹². La supervivencia a largo plazo postrasplante en estos pacientes es similar a la de otros receptores que no tuvieron HP¹¹². La mejoría hemodinámica se observa ya de forma precoz tras el implante del DAVI incluso en formas graves de HP y la mejoría se mantiene con tiempos de soporte más prolongados¹¹¹. Un estudio reciente mostró que el marco temporal en el que se objetiva el mayor descenso de la PAPm, PCP y RVP es en los primeros 6 meses tras el implante del DAVI, por lo que este periodo de tiempo se considera el

tiempo razonable de espera para tomar una decisión respecto a la indicación o contraindicación del trasplante²⁶.

7. Pronóstico

Tanto los estudios que han utilizado el CCD como los que han utilizado la ecocardiografía para determinar la presión pulmonar, han mostrado de forma reiterada que el desarrollo de HP empeora el pronóstico en la IC. El primer trabajo en reflejarlo, fue el de Abramson *et al*⁴⁹ que demostró que una velocidad del chorro de regurgitación tricuspídea $> 2,5$ m/s se asociaba a una mortalidad 3,4 veces superior en pacientes con miocardiopatía dilatada. En estudios posteriores gradientes entre cavidades derechas elevados se asociaban invariablemente a mayor mortalidad^{4,8,12,13,29,114}. Respecto a datos hemodinámicos invasivos, pacientes con una PAPm >20 mmHg tenían una tasa de mortalidad o trasplante del 51,3%, en comparación de una tasa del 13,5% que presentaban los pacientes con una PAPm <20 mmHg⁷. En otro estudio, la mortalidad fue dos veces más alta en pacientes con PAPm > 25 mmHg. Si además las RVP eran $> 2,5$ UW la mortalidad era mucho mayor³³. Independientemente del método por el cual se valore, la disfunción del VD empeoraba de forma añadida el pronóstico¹¹⁵. Sin embargo, en la IC aguda, los datos extraídos del estudio ESCAPE¹¹⁶ mostraron que unas RVP > 3 UE (que presentaban el 47% de pacientes) no se asociaban a un peor pronóstico a los 6 meses, mientras que los datos del estudio VMAC³⁷ si evidenciaron que una HP precapilar tenía una mortalidad a los 6 meses del 48%, por un 22% de la HP poscapilar y un 8,6% de los pacientes sin HP. Sin

embargo, en este segundo estudio, el perfil de HP se determinó utilizando los valores hemodinámicos postratamiento, que reflejaban mejor las condiciones basales del paciente. De hecho, en este estudio, los datos hemodinámicos postratamiento clasificaban a un 50% de los pacientes en una categoría diferente a la asignada a partir de los valores pretratamiento. Una de las consideraciones para escoger el DPD como marcador hemodinámico de HP precapilar, fue que se relacionaba con una menor supervivencia, como han demostrado estudios posteriores³¹¹, aunque no todos los datos son uniformes³⁹⁰.

En pacientes con IC incluso pequeñas elevaciones en la PAP registradas de forma ambulatoria mediante dispositivos implantables sin cables se asociaron con mayores tasas de hospitalización independientemente de la FEVI del paciente^{35,36,117}. La probabilidad de una descompensación de la IC aumentó progresivamente con el incremento de las PAP diastólicas estimadas. La PAP diastólica media estimada durante un periodo de 6 meses en pacientes con presentaron un episodio de descompensación de su IC frente a aquellos que no lo presentaron fue de 31 ± 8 mmHg frente a 26 ± 6 mmHg.

8. Expectativas futuras

Las fluctuaciones agudas de la PAP debidas a aumentos de la presión de llenado del VI y de la PCP son una señal de un episodio inminente de reagudización de una IC. La monitorización no invasiva de estas fluctuaciones podría servir como objetivo terapéutico y eventualmente mejorar el pronóstico de los pacientes con IC. Una elevación crónica de la

PAP a pesar de un tratamiento médico optimizado de la IC significa la existencia de un componente permanente de remodelado vascular pulmonar, siendo una potencial diana terapéutica para el tratamiento con vasodilatadores pulmonares. Para ello sería necesario por una parte, identificar a aquellos pacientes que presentan el mejor perfil riesgo/beneficio para recibir tratamiento con estos fármacos y por otra parte definir cuáles serían los marcadores sustitutos apropiados para utilizar como criterios de selección o como variables de seguimiento y para valorar la respuesta al tratamiento (biomarcadores, parámetros ecocardiográficos).

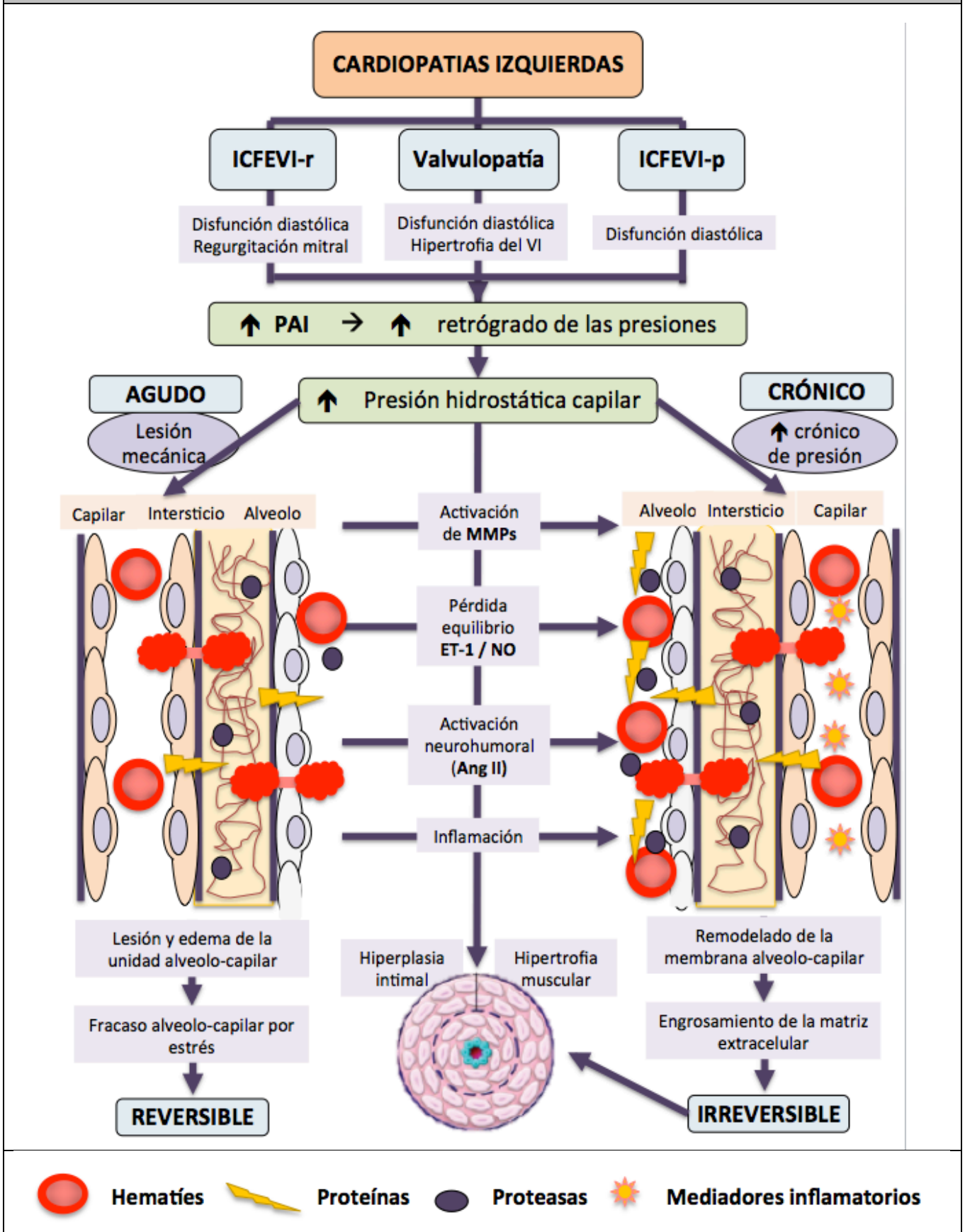
9. Biopatología de la hipertensión pulmonar

La patogenia que subyace en la HP no es del todo comprendida a día de hoy. Los mecanismos causales del aumento en la PAP son múltiples. La cascada de eventos se inicia con el aumento de las presiones de llenado en las cámaras izquierdas y la transmisión pasiva retrógrada del aumento de la presión (HP poscapilar o hipertensión venosa pulmonar). La presión hidrostática elevada puede provocar una lesión mecánica sobre la barrera alveolo-capilar que altera la delicada estructura de la pared capilar y que se conoce como fracaso alveolo-capilar por estrés¹¹⁸ y que se caracteriza por fuga de plasma a través de los capilares y desarrollo de edema pulmonar¹¹⁹⁻¹²⁰. En este contexto agudo, la lesión alveolo-capilar es un fenómeno reversible¹²¹ (figura 5).

Cuando la elevación de las presiones venosas es crónica y persistente, se desencadena un proceso adaptativo que afecta a la microcirculación y a la

pared alveolar y que lleva a la excesiva producción y acumulación de colágeno tipo IV en la matriz extracelular¹²²⁻¹²³. La acumulación de colágeno provoca cambios funcionales y estructurales en el árbol vascular pulmonar, inicialmente en los capilares, pero más tarde en las arterias y arteriolas¹²⁴. El papel del endotelio es importante en este proceso. La disfunción endotelial por lesión de la pared vascular juega un papel predominante en la alteración de la relajación del músculo liso, quien por su parte juega un papel integral mediando las alteraciones funcionales de la pared vascular pulmonar¹²⁵. El control local del tono vascular por el endotelio se debe a una secreción equilibrada de NO¹²⁶ y endotelina 1 (ET-1)¹²⁷. La importancia del NO en el tono vascular pulmonar se demostró utilizando infusiones intravenosas de L-NH-mono-metil-arginina (L-NMMA), un inhibidor de la producción de NO, que resultó en un menor grado de vasoconstricción dosis dependiente en pacientes con IC y RVP elevadas comparados con sujetos sanos¹²⁶. Niveles elevados de ET-1, potente vasoconstrictor, se han encontrado en el endotelio pulmonar y plasma de pacientes con IC y han demostrado ser predictores de mortalidad¹²⁸⁻¹³⁰. Con el tiempo, se desarrollan cambios histológicos en la pared vascular, similares a los observados en los pacientes con HAP¹²⁴ (hipertrofia muscular medial y proliferación de la íntima de la arteriola pulmonar). El incremento reactivo del tono arterial pulmonar y eventualmente el remodelado intrínseco de la pared arterial llevan al componente precapilar de la HP²⁷ y al aumento de las RVP. El primer componente, el vasomotor, es reversible con pruebas farmacológicas agudas, mientras que el segundo, el estructural, no responde a la vasodilatación aguda¹.

Figura 5: Fisiopatología de la hipertensión pulmonar



Las cardiopatías izquierdas, ya sea la insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada (ICFEVI-p) o reducida (ICFEVI-r) o las valvulopatías izquierdas provocan una elevación de la presión de la aurícula izquierda (PAI) que se transmite retrógradamente elevando la presión hidrostática capilar. Esta hiperpresión lesiona la barrera alveolo-capilar en la fase aguda mientras que crónicamente activa vías de remodelado e inflamación. En la fase aguda se produce una disrupción de la membrana alveolo-capilar con fuga de eritrocitos y proteínas de la luz vascular a la luz alveolar. El edema alveolar activa las metaloproteasas de la matriz (MMPs) que degrada los componentes de proteoglicanos de la matriz y la vuelve más fluida. Inicialmente, éste es un fenómeno reversible. Si persiste en el tiempo se produce remodelado y engrosamiento de la membrana alveolo-capilar, proceso mediado por hormonas como la angiotensina II (Ang II) y mediadores inflamatorios. La presión capilar aumentada promueve la hipertrofia y cambios fibróticos en arterias y venas, con hipertrofia de las células musculares lisas e hipertrofia de la íntima. La pérdida de equilibrio entre factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y la endotelina 1 (ET-1) contribuye al proceso.

Los factores genéticos juegan también un papel importante en el desarrollo de HP precapilar ya que el grado de cambios en la estructura vascular pulmonar y en las RVP en respuesta a la hiperpresión venosa pulmonar varía ampliamente entre los pacientes con IC. Esto sugiere que, aparte de los desencadenantes hemodinámicos, las características genéticas individuales predisponen o no al desarrollo de HP¹³¹. Se ha relacionado la excesiva vasoconstricción con la función o la expresión anómala de los canales de potasio en las células del músculo liso y con alteraciones del metabolismo de la serotonina¹³¹.

10. El endotelio sano

10.1 Estructura endotelial

Durante mucho tiempo, el endotelio se había considerado como una simple barrera inerte entre el fluido hemático y los tejidos que impedía la libre difusión de macromoléculas. Sin embargo, investigaciones realizadas en las últimas décadas han demostrado que esta monocapa celular que recubre los vasos sanguíneos y linfáticos abarcando una superficie de aproximadamente 30000 m^2 es en realidad un órgano que forma una interfaz dinámica con el resto de órganos del cuerpo¹³².

El endotelio está formado por células endoteliales que miden entre 10 y 50 μm de diámetro y alargadas en su eje largo, orientando su dimensión longitudinal en la dirección del flujo sanguíneo. Por tanto, muestran 3 posibles superficies: la luminal que es lisa y electronegativa, lo que le confiere propiedades tromborresistentes; la abluminal, que se adhiere al tejido conectivo y forma uniones mioendoteliales con los miocitos subyacentes; y la cohesiva, que une los endotelocitos adyacentes mediante uniones estrechas (*tight junctions*) o comunicantes (*gap junctions*).

En diferentes lechos vasculares, el endotelio desarrolla especializaciones ultraestructurales. Por ejemplo en lugares como el cerebro o el pulmón, las células endoteliales se disponen unidas mediante uniones estrechas formando la barrera hematoencefálica o alveolo-capilar; mientras que en otros lugares como los glomérulos renales o la hipófisis, las células endoteliales se organizan formando una capa discontinua y fenestrada. No obstante las propiedades del endotelio en un determinado órgano no son

inmutables¹³³⁻¹³⁵, sino que difieren de un momento al siguiente al activarse para responder a los estímulos fisiológicos y patológicos.

10.2 Funciones del endotelio

El endotelio desarrolla funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas participando del control del tono vasomotor, del tráfico de células y nutrientes y contribuyendo al equilibrio local entre mediadores pro- y antiinflamatorios así como pro- y anticoagulantes. Además, modula la angiogénesis, interacciona con las células circulantes (adhesión de plaquetas, monocitos y leucocitos)¹³⁶⁻¹³⁷, y participa en el catabolismo de los triglicéridos y de las partículas ricas en lípidos a través de la lipoproteína lipasa (LPL) extrahepática.

Las células endoteliales reciben y responden a señales provenientes de las células y tejidos adyacentes así como de la sangre circulante. Las señales aferentes las proporcionan, por ejemplo, mediadores solubles, el contacto con otras células, cambios en la oxigenación, fuerzas de cizallamiento, temperatura o pH. Las respuestas eferentes modulan el tono vascular, su permeabilidad, el equilibrio inflamatorio y hemostático, así como la proliferación y supervivencia celular [tabla 6].

El endotelio vascular induce la relajación del músculo liso subyacente en respuesta a la estimulación por diversas hormonas, neurotransmisores y compuestos vasoactivos derivados de las plaquetas y del sistema de coagulación. Los estímulos neurohormonales interaccionan con receptores de la superficie endotelial y, a través de incrementos de la concentración de calcio intracelular, promueven la síntesis y liberación de

compuestos vasodilatadores como la prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO) y, muy probablemente, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)¹³⁸⁻¹⁴⁰.

TABLA 6: Sustancias secretadas por el endotelio	
Vasodilatadores	Vasoconstrictores
Óxido nítrico (NO)	Endotelina 1 (ET-1)
Bradiquinina	Tromboxano A ₂ (TXA ₂)
Prostaciclina (PGI ₂)	Angiotensina 2
Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)	Ácido araquidónico
Histamina	Prostaglandina H ₂
Sustancia P	Serotonina
Serotonina	
Factores que modulan el crecimiento del músculo liso vascular	
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGFb)
Factor de crecimiento transformador β (TGF-β)	Heparán sulfato
Factores que regulan el equilibrio hemostático	
Activador del plasminógeno tisular (t-PA)	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)
Trombomodulina	Moléculas heparina-like
Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)	Anexina V
Proteína S	Factor de von Willebrand (fvW)
Factor tisular	
Moléculas de adhesión	
V-CAM	E-selectina
I-CAM	P-selectina

El primer vasodilatador endotelial descubierto fue la prostaciclina (PGI_2), cuya acción relajante sobre la musculatura lisa vascular es mediada por la activación de la adenilato ciclasa y el consiguiente incremento de la concentración de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). La liberación de PGI_2 puede ser estimulada por un gran número de sustancias entre las que destacan adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), acetilcolina, trombina, serotonina y diversos neurotransmisores. La PGI_2 también provoca un aumento en la formación de cAMP en las plaquetas con importantes efectos antiagregantes¹³⁸⁻¹⁴⁰.

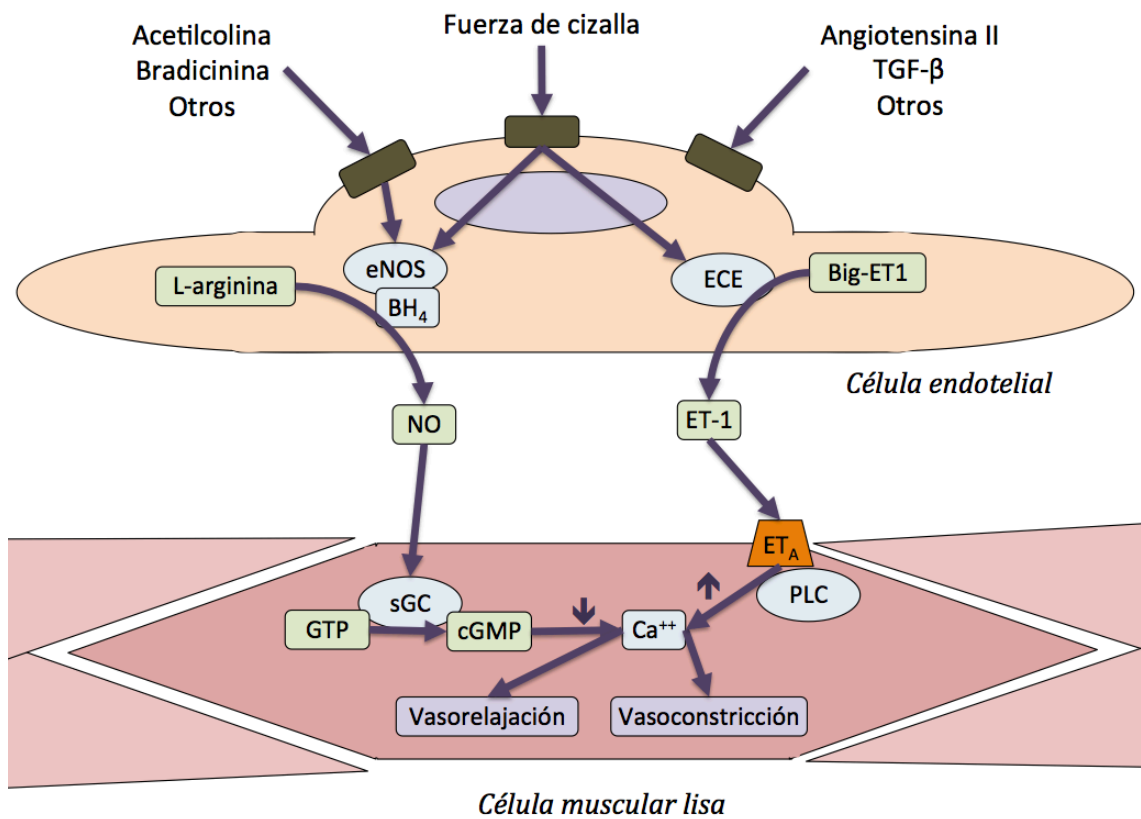
No obstante, el más importante y conocido de los vasodilatadores endoteliales es el NO, previamente conocido como factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Su síntesis y liberación son promovidas por estrés tangencial (fuerzas de cizalla o de arrastre del flujo sanguíneo), lo que permite adaptar la luz de los vasos a su flujo. La serotonina, la bradiquinina, la acetilcolina, la sustancia P y la trombina son potentes estímulos para la producción y liberación de NO por el endotelio¹³⁸⁻¹⁴⁰. Dada su importancia en la patología vascular, los detalles sobre la síntesis, funcionalidad y derivaciones fisiopatológicas del NO serán referidos ampliamente en el apartado 10.3.

La relajación del músculo liso vascular por el NO es mediada por la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y el incremento de la formación de guanina monofosfato cíclico (cGMP). Como el NO es un gas, difunde tanto hacia el interior de la pared vascular como hacia la luz del vaso, actuando sobre las plaquetas quienes al incrementar su contenido en cGMP reducen tanto la adhesividad como la agregación. Así, la PGI_2 y el NO interactúan sinérgicamente en la vasodilatación de los vasos

sanguíneos y en la inhibición de la agregación plaquetaria. Otras funciones establecidas para el NO que difunde hacia la superficie luminal del endotelio son la captación de radicales superóxido, la modulación de la permeabilidad endotelial y la regulación de la función de los leucocitos¹³⁸⁻

140

Figura 6: Función vasomotora del endotelio sano



TGF-β: factor de crecimiento transformador beta; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; BH₄: tetrahydrobiopterina; Big-ET1: proendotelina 1; ECE: enzima convertidora de endotelina; ET-1: endotelina 1; NO: óxido nítrico; sGC: guanilato ciclasa soluble; GTP: guanosin trifosfato; cGMP: guanosin monofosfato cíclico; Ca⁺⁺: calcio; ET_A: receptor A de endotelina; PLC: fosfolipasa C

La identidad química del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) continua generando controversia, aunque probablemente se trate de un metabolito muy lábil del ácido araquidónico formado a través de la vía del citocromo P-450. Su existencia se deduce al no poder bloquear todos los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio con la administración de inhibidores de la síntesis de NO (L-NMMA y L-nitroarginina monometil éster (L-NAME)). El EDHF parece ser, además, uno de los pocos agentes fisiológicos capaces de abrir los canales de potasio¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Las células endoteliales también producen agentes vasoconstrictores como el tromboxano A₂ (TXA₂), la endotelina (ET), la prostaglandina H₂ y el anión superóxido. El endotelio regula, además, los niveles de angiotensina II (Ang II), potente agente vasoconstrictor, pues la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) se expresa en la membrana de las células endoteliales. La ECA participa también en la degradación de la bradiquinina, que ejerce su acción vasodilatadora promoviendo la liberación de NO por el endotelio¹³⁸⁻¹⁴⁰.

La producción de ET se estimula por las fuerzas mecánicas tangenciales, la presencia de trombina, la Ang II, el factor de crecimiento transformador β (TGF- β) y la hipoxia. La única isoforma, de las tres descritas hasta el momento, producida en el endotelio es la endotelina 1 (ET-1) que se libera fundamentalmente hacia el interior de la pared vascular actuando de forma para y autocrina. El acoplamiento de la ET-1 con sus receptores en el músculo liso incrementa el calcio intracelular tanto por apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes como por activación de la fosfolipasa C, provocando contracción del músculo liso vascular. Además,

la ET-1 potencia el efecto vasoconstrictor de otras sustancias como la serotonina, las catecolaminas y la ANG II.

Por el contrario, la interacción de la ET-1 con sus receptores de la célula endotelial tiene efectos vasodilatadores mediados por un incremento de la formación de cGMP. Numerosos factores endoteliales contribuyen también a regular el proceso de coagulación sanguínea. El endotelio produce factor activador del plasminógeno (t-PA), que activa la plasmina y promueve la trombolisis, y sintetiza trombomodulina, una glucoproteína que se sitúa en la cara luminal del endotelio y actúa como receptor endotelial de la trombina. Cuando la trombina se une a la trombomodulina pierde su capacidad hemostática y activa la proteína C que, a su vez, inhibe los factores de coagulación V y VIII. Además, el endotelio produce proteína S, un cofactor para la proteína C, reforzando así su acción anticoagulante.

El EDHF contribuye a mantener la carga electronegativa de la superficie endotelial gracias a la cual se previene el depósito de las plaquetas activadas. La inhibición de la agregación plaquetaria se completa por la vía de la PGI₂ y del NO y nucleotidasas que degradan el ADP.

Pero el endotelio también produce agentes que promueven la coagulación como el factor tisular, el factor de Von Willebrand y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) ¹³⁸⁻¹⁴⁰.

El término disfunción endotelial se aplica a aquellos estados en los que el fenotipo de expresión endotelial supone un perjuicio para el organismo. Entre los posibles ejemplos de esta situación se encuentra la sepsis, la hipertensión pulmonar, la púrpura trombocitopénica idiopática, etc...

10.3 Estrés oxidativo y función endotelial

El estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes en favor de los primeros, está implicado en numerosos procesos fisiopatológicos¹⁴²⁻¹⁴⁴ ya que afecta la regulación del flujo sanguíneo, la inhibición de la agregación plaquetaria y de la adhesión leucocitaria y el control del crecimiento celular¹⁴⁵. Los radicales libres son una consecuencia inevitable del metabolismo celular¹⁴⁶. Son entidades químicas, comúnmente fragmentos de moléculas, con electrones desapareados que les confieren una extraordinaria reactividad.

Entre los radicales libres mejor estudiados se encuentra el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el más potente de los oxidantes conocidos. De vida extremadamente corta y elevada reactividad, el radical hidroxilo reacciona en su lugar de formación con la mayoría de las moléculas biológicas mediando la propagación de reacciones en cadena. El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) no es en sí particularmente reactivo aunque puede actuar como oxidante débil o como agente reductor relativamente potente de complejos de hierro como el citocromo c. Su importancia fundamental radica en ser fuente de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, otra especie oxidante aunque sin estructura de radical. Otros radicales libres son el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), un ejemplo de radical con propiedades fisiológicas como mediador del tono vascular; los metales de transición como el hierro y el cobre; y el peroxinitrito (ONOO^-), especie altamente oxidante generada por reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$. Todos estos compuestos reciben el nombre genérico de especies reactivas de oxígeno (ROS).

El hecho de que la sobreproducción de ROS bajo condiciones patológicas sea una parte integral en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, se debe a que diferentes procesos vasculares son regulados por los ROS bajo condiciones fisiológicas. Así, el normal funcionamiento vascular depende de un fino equilibrio entre sistemas pro y antioxidantes, ya que los ROS modulan diferentes vías de señalización celular y numerosas funciones vasculares.

Particularmente sensibles al estado redox celular son los sistemas de transporte de iones, la fosforilación de proteínas y la expresión génica, procesos que regulan funciones celulares tan importantes como el crecimiento, apoptosis, migración, angiogénesis y adhesión celular¹⁴⁷ [Tabla 7].

Numerosos sistemas enzimáticos contribuyen a la generación de ROS (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, ácido hipocloroso y radical hidroxilo) en la pared vascular (tabla 8). Entre ellos destacan las NAD(P)H oxidasas (NOXs), al parecer, la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ endotelial y vascular, y con gran protagonismo en la enfermedad cardiovascular. Su actividad se encuentra regulada por factores humorales (citoquinas, factores de crecimiento y agentes vasoactivos) y físicos (tensión, fuerza de cizalla), además de por otros radicales libres o productos de peroxidación lipídica. En arterias coronarias humanas de pacientes diabéticos¹⁴⁸ y ateroscleróticos¹⁴⁹ se ha demostrado un aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ junto con niveles incrementados de elementos necesarios en la actividad NOX.

Otras fuentes importantes de $O_2^{\cdot-}$ a nivel vascular serían el sistema xantina oxidoreductasa (X/XO), las óxido nítrico sintasas desacopladas (NOS), la ciclooxigenasa (COX), la mieloperoxidasa (MPO) y la actividad mitocondrial. De hecho, el NO tiene numerosos efectos citotóxicos, la mayoría atribuidos al peroxinitrito, quien interacciona con proteínas y lípidos alterando la señalización celular y la función mitocondrial y causando daño al DNA, pudiendo eventualmente culminar en disfunción celular y muerte¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

TABLA 7: Vías de señalización dependientes de ROS (Modificado de Rojas A et al)¹⁴⁷			
	Transporte iónico	Fosforilación proteica	Expresión génica
Dianas moleculares	Canales K^+ (Ca^{++} dependientes) Ca^{++} intracelular Canales TRPC	P42/p44 MAPK P38 MAPK c-jun quinasa CaMKII Akt PI3K	AP-1 NFkB HIF-1 PPARs
Funciones en la pared vascular	Vasorrelajación Hiperpolarización Sensado del oxígeno	Apoptosis Crecimiento celular Supervivencia celular	Adhesión celular Activación Celular
(ROS: especies reactivas de oxígeno; TRPC: canales catiónicos; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; CaMKII: quinasa Ca^{2+} /calmodulina dependiente tipo II; Akt: proteína quinasa B; PI3K: fosfoinosítido-3-quinasa; AP1: proteína activadora 1 (factor de transcripción); NF-kB: factor nuclear kB (factor de transcripción); HIF-1: factor inducible por la hipoxia-1 (factor de transcripción); PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas)			

TABLA 8: Efectos fisiológicos de los ROS (Modificado de Rojas A et al)¹⁴⁷

	Células endoteliales	Células musculares lisas
Efectos	Vasorrelajación Apoptosis Moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) Angiogénesis Permeabilidad vascular	Crecimiento celular Migración celular Regulación matriz Remodelación vascular
Fuentes vasculares de ROS: especies reactivas de oxígeno; NADP(H): nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida); COX: ciclooxigenasa; X/XO: sistema xantina oxidoreductasa; NOS: óxido nítrico sintasa).		

La relevancia de los sistemas mencionados en la enfermedad cardiovascular podría variar en función de la patología de base desencadenante (diabetes, HTA, tabaquismo, hipercolesterolemia...)¹⁴⁷.

11. Síntesis y metabolismo del óxido nítrico endotelial

11.1 Visión general

El óxido nítrico es un radical libre ($\cdot\text{NO}$), un derivado gaseoso e inestable del nitrógeno con un número impar de electrones que le confiere una extraordinaria reactividad química. Es un compuesto extremadamente lábil, de vida efímera (2-30 segundos)¹⁵² y con una alta afinidad por la hemoglobina que lo inactiva e inhibe sus efectos. Como consecuencia de su reacción con oxígeno y agua se convierte en nitrato y nitrito, los productos finales estables de excreción del NO en el organismo¹⁵³. El NO

es sintetizado, dependiendo de las necesidades fisiológicas, a partir de uno de los nitrógenos del grupo guanidino terminal de la L-arginina.

Figura 7: Fórmula de la arginina y de sus aminoácidos derivados ornitina y citrulina.

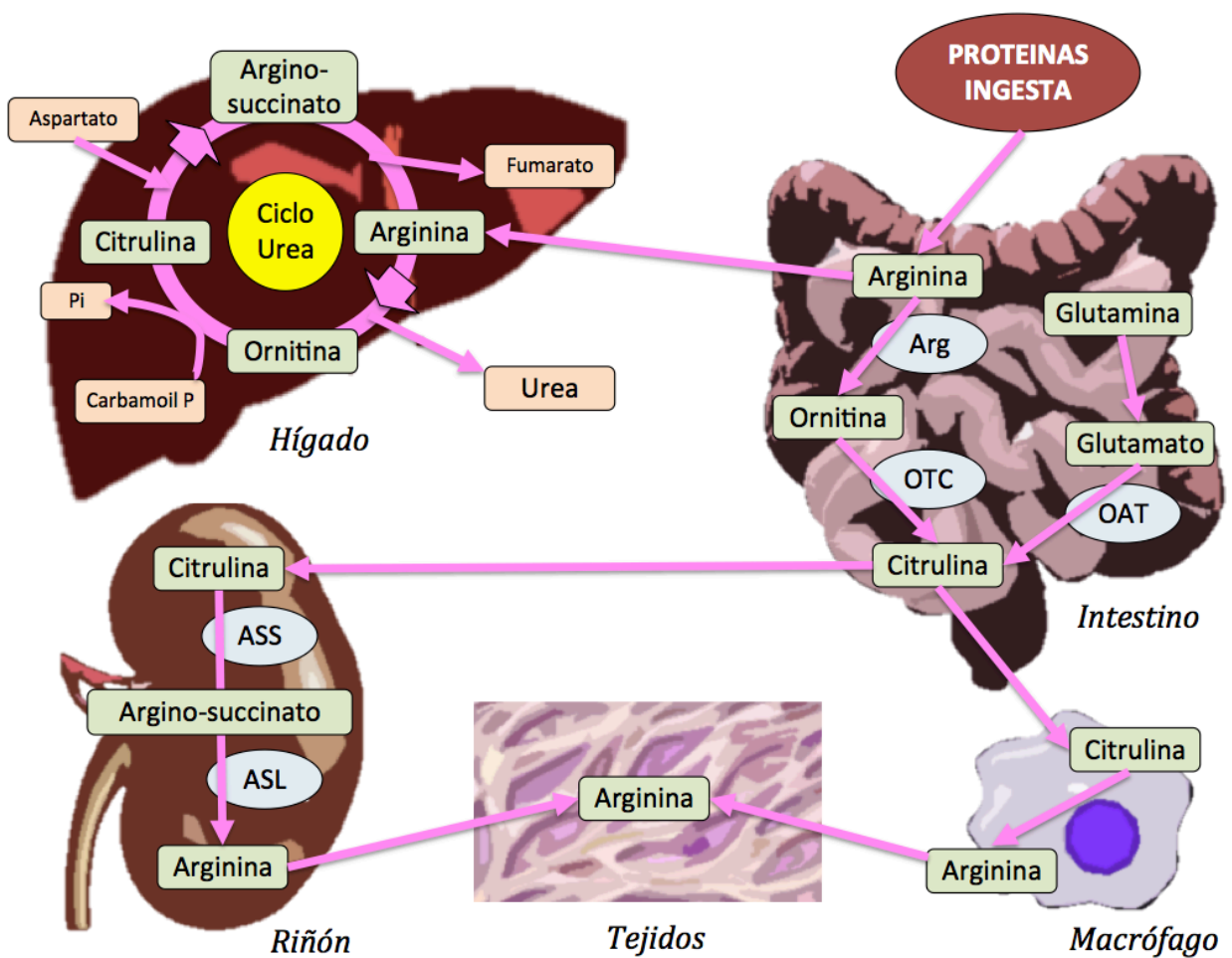
$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \quad // \\ \text{N} - \text{C} - \text{C} \\ \diagup \quad \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{NH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \quad // \\ \text{N} - \text{C} - \text{C} \\ \diagup \quad \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{H}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \quad // \\ \text{N} - \text{C} - \text{C} \\ \diagup \quad \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{array} $
L-arginina	Ornitina	Citrulina

11.2 Síntesis y transporte de arginina

La L-arginina es un aminoácido semiesencial producido en el organismo en cantidad insuficiente para cubrir todas las necesidades; además de en el ciclo de la urea, la arginina es utilizada en la síntesis de creatinina y suministra ornitina para la síntesis de poliaminas. Al haber una solicitud metabólica continuada de L-arginina existe una neosíntesis del aminoácido en los túbulos renales proximales a partir de la citrulina. Las proteínas ingeridas son degradadas hasta arginina que pueden ser directamente absorbidas y utilizadas en el ciclo de la urea en el tejido hepático, o transformadas en el epitelio intestinal en ornitina que

juntamente con la glutamina secretada como glutamato son convertidas en citrulina. La citrulina absorbida se transforma en arginina en el ciclo renal y también puede ser convertida directamente en L-arginina en el citoplasma de las células endoteliales y de los macrófagos.

Figura 8: Metabolismo de la arginina en el organismo humano



Arg: arginasa; OTC: ornitino transcarboxilasa; OAT: ornitino aminotransferasa; ASS: argininosuccinato sintasa; ASL: argininosuccinato liasa; carbamoil P: carbamoil fosfato 1; Pi: fosfato

El transporte de la L-arginina al interior de la célula endotelial está mediado por el sistema γ^+ que contribuye a la captación del 60%-80% del total del aminoácido. Se han identificado 4 proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos (CAT). Las más ampliamente distribuidas son la CAT-1 y CAT-2B que son transportadores de alta afinidad y baja afinidad¹⁵⁴⁻¹⁵⁵.

11.3 Óxido nítrico sintasas

La síntesis de NO se realiza a partir de una compleja reacción oxidativa catalizada por una familia de isoenzimas denominadas genéricamente óxido nítrico sintasas. Inicialmente la L-arginina es transformada en un intermediario, la NG-hidroxi-L-arginina con la presencia de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrógeno (NADPH) y calcio, siendo necesaria más NADPH, tetrahidrobiopterina (BH_4) y oxígeno para la formación de L-citrulina y NO.

Hay al menos tres isoformas diferentes de NOS (tabla 9)¹⁵⁶⁻¹⁵⁷. Todas requieren oxígeno molecular, NADPH y tetrahidrobiopterina (BH_4) como cofactores. Las NOS endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) son constitutivas, calcio/calmodulina dependientes, y generan pequeñas cantidades de NO con funciones fisiológicas diversas. Una tercera isoforma (iNOS) es calcio/calmodulina independiente y está implicada en la producción de grandes cantidades de NO durante periodos prolongados siendo un mediador esencial en la defensa del organismo. La actividad de las iNOS es regulada por control transcripcional actuando como señales inductoras ciertas citoquinas (interferón- γ , TNF- α , IL-1) o sustancias

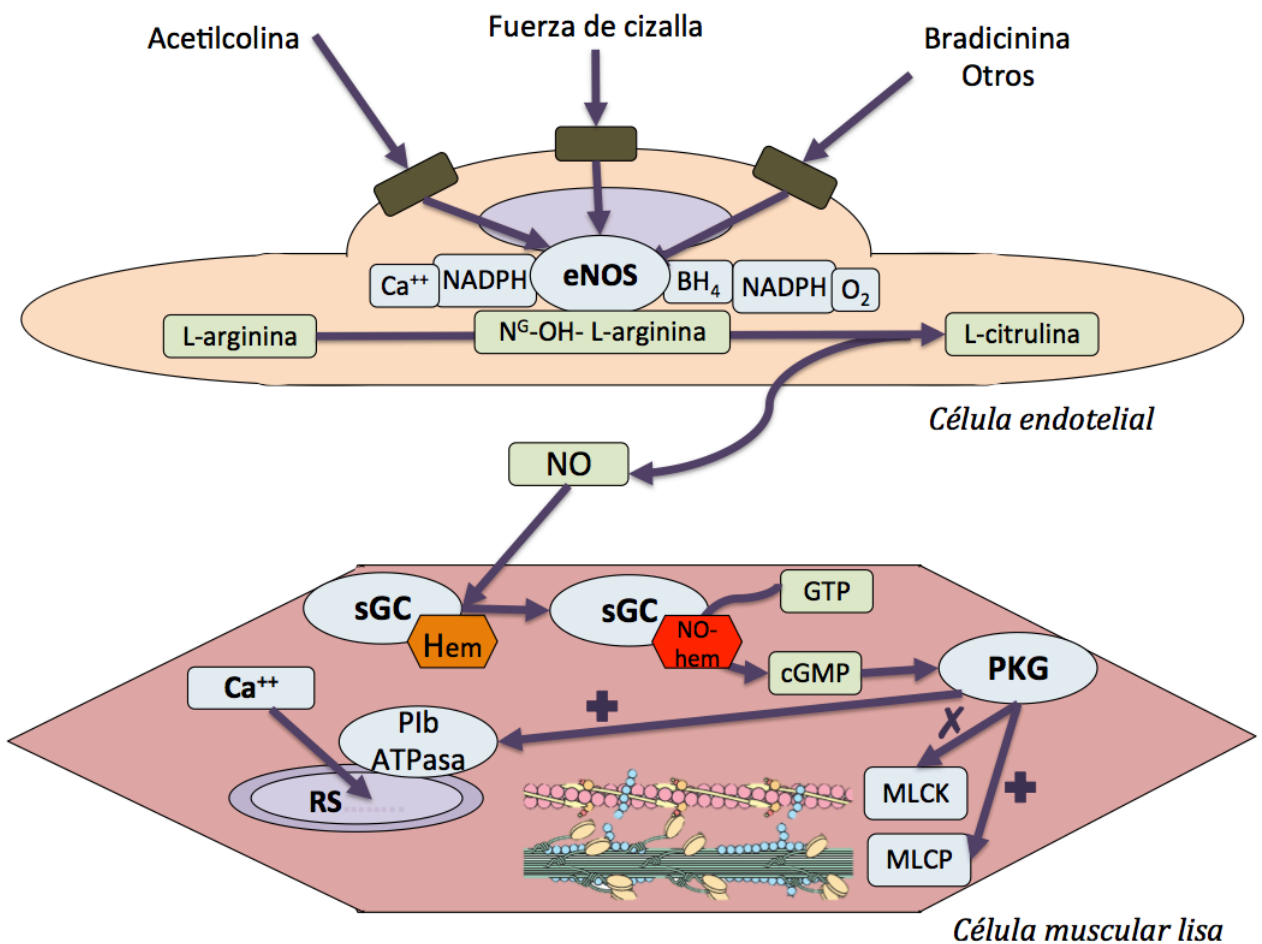
proinflamatorias de origen bacteriano como el lipopolisacárido (LPS). La Km de la eNOS para la arginina es del orden de 2-3 μM , y la concentración de este sustrato en la célula endotelial es del orden de 1-2 mM, por lo que en condiciones normales la eNOS está continuamente saturada por la arginina y se modifica la producción de NO ante cambios en el nivel extracelular del aminoácido (0'1-10 mM).

TABLA 9: Localización y funciones de las NOS (Modificado de Knowles et al)¹⁵⁶

nNOS	eNOS	iNOS
<i>Sistema nervioso</i>	<i>Sistema cardiovascular</i>	<i>Inmunidad no específica</i>
<p>Neurotransmisor/ Neuromodulador del SNC:</p> <ul style="list-style-type: none"> - respuestas al glutamato - plasticidad sináptica - nocicepción <p>Transmisor nervios periféricos no adrenérgicos no colinérgicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tracto gastrointestinal - Erección - Esfínter de vejiga - Flujo sanguíneo <p>Función patológica:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Daño isquémico cerebral 	<p>Relajación del músculo liso vascular:</p> <ul style="list-style-type: none"> - regulación del flujo sanguíneo - regulación de la presión arterial <p>Inhibición de la agregación y reactividad plaquetaria</p>	<p>Defensa frente a:</p> <ul style="list-style-type: none"> - bacterias - hongos - protozoos - tumores? <p>Función patológica:</p> <p>Estados de shock causados por:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Endotoxinas/sepsis - Citoquinas <p>Enfermedad inflamatoria y autoinmune:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inflamación aguda - Colitis ulcerosa - Rechazo trasplantes - Artritis? - Esclerosis múltiple? - Asma?

Las tres isoformas han sido purificadas, secuenciadas, clonadas y expresadas, y todas ellas son inhibidas por análogos competitivos de la L-arginina¹⁵⁸⁻¹⁵⁹. Entre estos compuestos químicamente relacionados con la arginina se encuentran la L-NMMA o el L-NAME que pueden abolir la respuesta vasodilatadora dependiente del NO endotelial al competir con el precursor natural del NO, la L-arginina, a nivel de su síntesis por la eNOS.

Figura 9: Síntesis y vía de señalización del NO

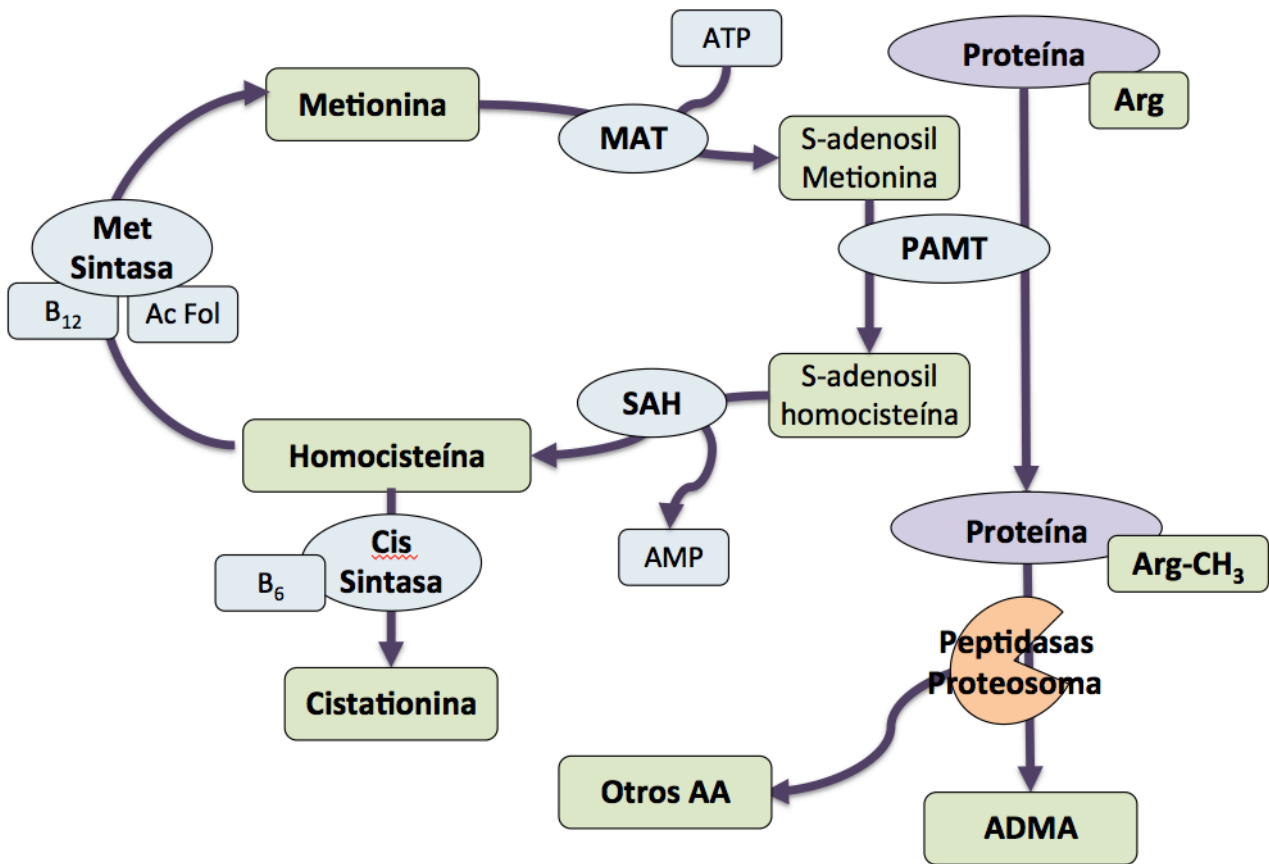


eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; BH₄: tetrahidrobiopterina; Ca²⁺: calcio; NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrógeno; O₂: oxígeno molecular; NO: óxido nítrico; sGC: guanilato ciclasa soluble; GTP: guanosin trifosfato; cGMP: guanosin monofosfato cíclico; PKG: proteína quinasa G; MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; RS: retículo sarcoplásmico; Pi b ATPasa: ATPasa calcio fosforilada

Sin embargo el inhibidor de la NOS más importante por su origen endógeno es la dimetilarginina asimétrica (ADMA), que está recibiendo considerable interés por su posible contribución a la disfunción endotelial¹⁶⁰. La concentración normal de ADMA en plasma es del orden de 1-2 μ M, habiéndose descrito elevaciones en distintas patologías entre las que se incluye la hipertensión pulmonar. A nivel metabólico, los diferentes derivados metilados de la arginina como la ADMA derivan de la degradación de proteínas con residuos de arginina metilados (Figura 10), que posteriormente son degradados enzimáticamente y eliminados vía renal. La enzima encargada de esta degradación, la dimetil-arginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) disminuye sensiblemente su actividad por S-nitrosilación u oxidación por radicales libres del oxígeno de la cisteína 249 de su centro activo¹⁶¹ por lo que es muy sensible al estado redox de la célula endotelial.

El uso de estos inhibidores de la NOS ha sido clave para establecer el papel fisiopatológico del NO, y su acumulación en situaciones como la hipercolesterolemia o la diabetes puede jugar un importante papel en la disfunción endotelial que acompaña a estas patologías^{156,158}. Los inhibidores de las NOS causan un rápido aumento de la presión sistémica y cambios en el flujo sanguíneo regional en humanos y animales de experimentación, sugiriendo que uno de los principales papeles del NO bajo condiciones fisiológicas es regular el flujo sanguíneo.

Figura 10: Síntesis endógena de ADMA



Met Sintasa: metionina sintasa; Ac Fol: ácido fólico; MAT: metiotina adenosina transferasa; ATP: adenosina trifosfato; PAMT: proteína arginina metil transferasa; SAH: S-adenosilhomocisteína hidrolasa; AMP: adenosina monofosfato; Arg: arginina; Arg-CH₃: metilarginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; AA: aminoácido; Cis sintasa: cistationina sintasa.

11.4 Vía de señalización del NO

La guanilato ciclasa soluble (sGC) es una enzima clave en la vía de señalización del NO, ya que esta enzima se activa al unirse el NO al grupo hemo prostético de su centro activo y cataliza la síntesis de GMPc a partir de guanosina trifosfato (GTP). El cGMP es el segundo mensajero de la vía de señalización responsable final de los efectos vasodilatadores,

antiagregantes, entre otros¹⁶²⁻¹⁶³. El GMPc activa a la proteína cinasa G (PKG) que inactiva la cinasa de cadena ligera de la miosina (MCLK) y disminuye el tono de la célula de músculo liso vascular. Además, la PKG interacciona de manera directa con el sustrato fijador de miosina, la subunidad de fosfatasa de cadena ligera de la miosina (MCLP), aumentando la actividad de la fosfatasa y disminuyendo el tono vascular. Por último, diversos mecanismos estimulan las reducciones en la concentración de calcio de la célula de músculo liso vascular mediada por PKG, incluyendo la inactivación de RhoA dependiente de la fosforilación; disminuye la formación de IP₃, la fosforilación de fosfolambán, que incrementa la actividad de la ATPasa de calcio y el secuestro de calcio en el retículo sarcoplásmico; y la estimulación de la actividad de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática dependiente de PKG, tal vez mediante la activación de la Na⁺K⁺ ATPasa o la hiperpolarización de la membrana celular mediante la activación de los conductos de potasio dependientes de calcio.

Cambios en el estado redox del grupo hemo de la sGC inducidos por aumento del estrés oxidativo (paso de ferroso a férrico) debilita la unión del grupo prostético a la enzima y la torna insensible al NO^{162,164}. Existen 2 categorías de compuestos que pueden actuar como agonistas de la sGC, los estimuladores y los activadores. Los primeros sensibilizan a la sGC para responder a niveles bajos de NO biodisponible mediante la estabilización del complejo nitrosilhemo, lo que permite a la enzima permanecer en su forma activa¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. No obstante, su acción depende de la presencia de un grupo hemo reducido (ferroso). Por su parte, los activadores de sGC

actúan de forma más efectiva cuando la enzima está en forma oxidada o en forma de apoproteína (sin hemo)¹⁶⁷⁻¹⁶⁸.

12. Síntesis y metabolismo de la endotelina

12.1 Síntesis y regulación de la endotelina

La endotelina (ET) es un péptido vasoconstrictor formado por 21 aminoácidos. Además de sus propiedades directas sobre el tono vasomotor, la ET actúa a largo plazo sobre la proliferación y expresión fenotípica del músculo liso vascular¹⁶⁹. Existen 3 isoformas clonadas y secuenciadas: ET-1, ET-2, y ET-3. ET-1 es la isoforma predominante, sintetizada en el endotelio vascular, y es el vasoconstrictor más potente. ET-2 no se encuentra en el plasma, sino en el intestino y el riñón donde actúa de forma similar a la ET-1. ET-3 posee escasa acción vasoconstrictora, su origen principal no es del todo conocido, aunque se ha encontrado a altas concentraciones en el sistema nervioso central en desarrollo.

La ET-1 se sintetiza como una preprohormona de gran tamaño. El proceso de la biosíntesis de la ET se desarrolla en el citosol de las células endoteliales. Inicialmente se forma una preproendotelina de 212 aminoácidos que a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa la transforma en una endotelina de 39 aminoácidos (ET-1 grande o big-ET). Este fragmento posteriormente sufre la acción de la enzima convertidora de endotelinas (ECE-1), que es una metaloendoproteasa que

rompe la unión en la posición triptófano 21 – valina 22 (Trp21–Val22) transformándola en el péptido activo¹⁷⁰.

Se han identificado siete isoformas de ECE. La ECE–1 y ECE–2 son, aparentemente, las más importantes. La ECE–1 es una metaloendoproteasa de membrana, que actúa tanto intra como extracelularmente sobre la proendotelina (Big–ET–1). La ECE–2 actúa únicamente de forma intracelular¹⁷¹. La ET–1 no es almacenada dentro de las células, sino que ante un estímulo (hipoxia, isquemia, lesión endotelial), el RNA mensajero induce la síntesis de ET–1 en minutos y es secretada primariamente a través de una vía constitutiva.

Se han identificado cuatro diferentes mecanismos de regulación de las ET¹⁷²: 1) degradación por lisosomas; 2) regulación a través de la ECE; 3) degradación por endopeptidasas neutrales; 4) recaptación de la endotelina circulante en el pulmón y riñón.

La concentración de endotelina en plasma en condiciones normales se ha informado en un rango de 1–2 pg/mL¹⁷³. La vida media plasmática es de 4–7 minutos y se degrada en un 80–90% en el primer paso por los pulmones y riñones¹⁷⁴. La hipoxia y la isquemia son importantes estímulos fisiológicos para la producción de ET–1¹⁷⁵. También es estimulada por una variedad de sustancias que incluyen catecolaminas y proteínas semejantes como trombina, angiotensina, lipoproteínas de alta y baja densidad, TGF- β , citoquinas e iones de calcio. Varias sustancias vasoactivas como el NO, el péptido natriurético, las prostaglandinas PGI₂ y PGE₂ inhiben la producción y secreción de ET–1¹⁷⁶.

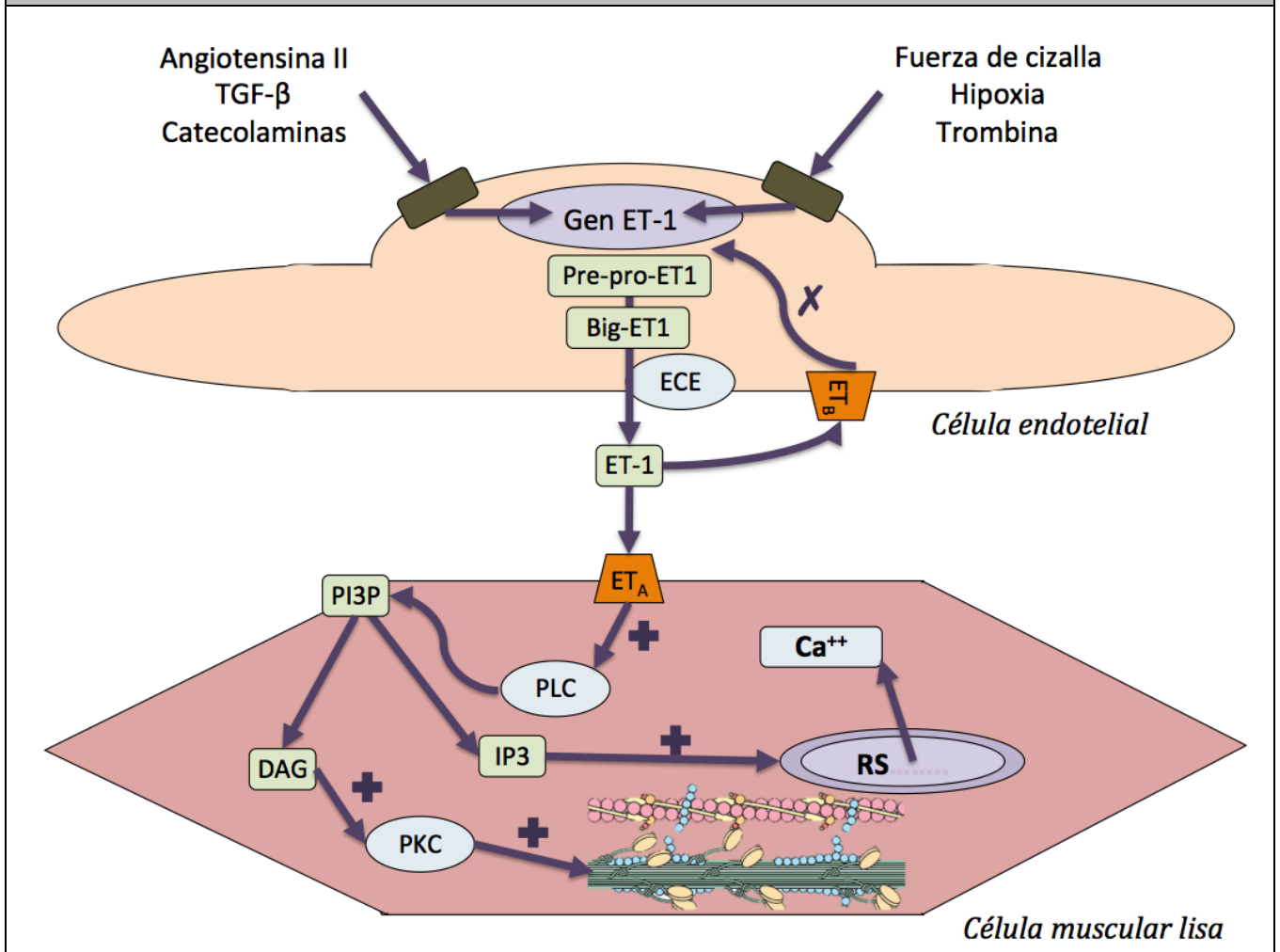
12.2 Vía de señalización de la endotelina

Existen dos receptores principales de ET: ET_A y ET_B. Ambos receptores se expresan en diversas células del sistema cardiovascular incluyendo endotelio, células musculares lisas, miocardiocitos y fibroblastos¹⁷⁰⁻¹⁷¹. Se ha descrito una asociación entre polimorfismos de genes que codifican los receptores de ET y el desarrollo de miocardiopatías¹⁷⁷.

La activación de los receptores ET_A y ET_B produce efectos hemodinámicos diferentes. En los lechos vasculares los receptores ET_A se encuentran en las células musculares lisas donde median tanto la vasoconstricción como la proliferación celular¹⁷⁶. Por su parte, los receptores ET_B se encuentran principalmente en las células endoteliales, y participan en la vasodilatación mediante la estimulación de la producción de NO¹⁷⁸. Los receptores ET_B también se encuentran, aunque en menor cantidad en el músculo liso, donde también inducen vasoconstricción. En los humanos predominan los efectos vasoconstrictores de la ET-1, lo que resulta en una vasoconstricción concentración dependiente de arteriolas sistémicas y pulmonares. La ET-1 también induce la formación de proteínas de la matriz extracelular y fibronectina, y potencia el efecto del TGF-β y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)¹⁷⁷. El efecto en la producción de colágena es mediada por ambos receptores, ET_A y ET_B, y en fibroblastos de piel. En cambio, en fibroblastos cardíacos el mediador son los receptores ET_B. La ET-1 también posee una potente acción proinflamatoria¹⁷⁹⁻¹⁸⁰. Por otro lado, induce agregación plaquetaria y estimula la producción de aldosterona por un mecanismo mediado por receptores ET_B¹⁷⁰. Las concentraciones nanomolares de ET-1 tienen un

efecto inotrópico y cronotrópico positivo, y pueden inducir hipertrofia cardíaca por la estimulación de ambos receptores ET_A y ET_B ¹⁸¹.

Figura 11: Síntesis y vía de señalización de la endotelina



ET-1: endotelina; TGF-β: factor de crecimiento transformador beta; Big-ET1: proendotelina 1; ECE: enzima convertidora de endotelina; Ca⁺⁺: calcio; ET_A: receptor A de endotelina; PLC: fosfolipasa C; PI3P: fosfatidil-inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol trifosfato; PKC: proteína quinasa C; RS: retículo sarcoplásmico.

La estimulación de estos receptores por la ET-1 activa la fosfolipasa C, la cual induce un incremento de inositol trifosfato, diacilglicerol y del calcio intracelular que conduce a la contracción de las células de músculo

liso^{170,182}. El incremento del diacilglicerol y del calcio estimula también a la proteinquinasa C, la cual media la acción mitógena de la ET-1 (figura 11).

Los pulmones representan el blanco primario de los efectos de la ET-1 y es el sitio especial para las vías metabólicas de la ET-1. Se han encontrado niveles de RNAm hasta cinco veces más altos en los pulmones que en ningún otro órgano estudiado¹⁸³. Los receptores ET_A y ET_B tienen una distribución variable en vasos, bronquios y alvéolos. Los receptores ET_A predominan a lo largo de la arteria pulmonar, en comparación de los receptores ET_B que prevalecen en el músculo liso de la vía aérea, en los capilares y en el tejido de la pared alveolar.

13. Disfunción endotelial en la hipertensión pulmonar

13.1 Cambios en el fenotipo y estructura endotelial

La disfunción endotelial se asocia a estados de alto estrés oxidativo. En el modelo arterioesclerótico de HP, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL) actúan como combustible de este estrés oxidativo, provocando la adhesión de los monocitos y su migración al espacio subendotelial donde se convierten en macrófagos. Se ha objetivado que existe una estrecha relación entre la disfunción endotelial y los niveles plasmáticos de moléculas de adhesión¹⁸⁴.

El endotelio normal se considera es una línea celular quiescente, genéticamente estable. Una vez activadas por algún proceso nosológico,

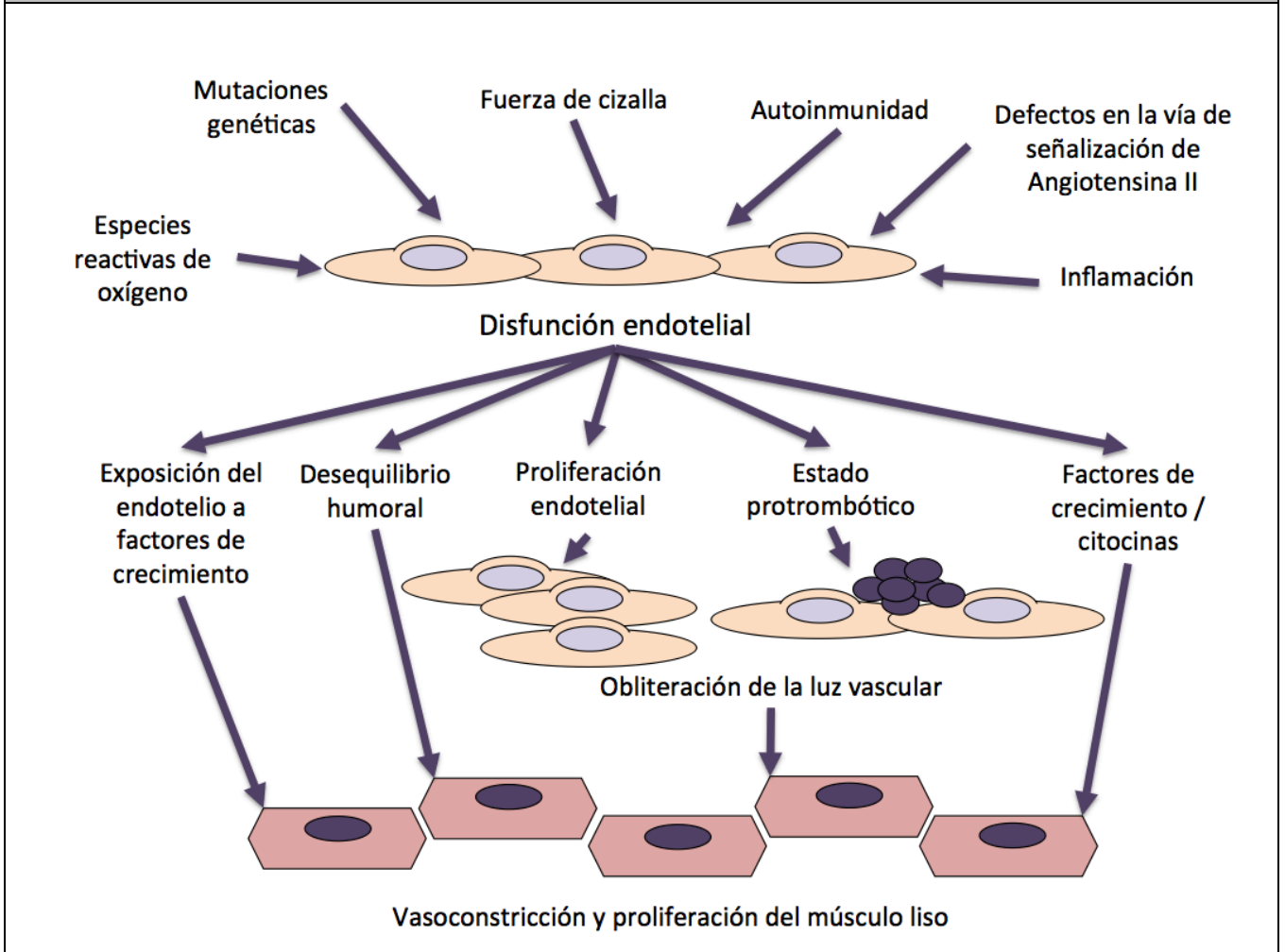
las células endoteliales pueden expresar marcadores y proteínas específicas como E-selectina, la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1), el factor tisular, o receptores para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)¹⁸⁵. En las células endoteliales de las lesiones plexiformes de las arterias de pacientes con HP se ha documentado una expresión aumentada del receptor KDR del VEGF¹⁸⁶. Otro marcador de angiogénesis es el factor inducible por hipoxia (HIF-1), que también se encuentra sobreexpresado en pacientes con HP severa¹⁸⁷. La subunidad β se expresa de forma constitutiva, pero la α solamente se sintetiza en respuesta a la hipoxia, lo que sugiere una menor disponibilidad de oxígeno alrededor de la lesión plexiforme, posiblemente a causa de la obliteración de la luz del vaso por las células endoteliales proliferantes¹⁸⁷.

En la HP se encuentra también un número aumentado de células endoteliales circulantes (CEC). Aunque fisiológicamente participan de la respuesta reparadora frente a una lesión vascular, su papel en la HP todavía no ha sido dilucidado. Estas CEC muestran un fenotipo de activación y expresan moléculas como CD36, E-selectina, P-selectina o ICAM-1¹⁸⁸⁻¹⁸⁹. No se conoce si estas células derivan de las células progenitoras de la médula ósea y su presencia se debe a la movilización de las mismas mediada por factores de crecimiento como el VEGF, o si han sido desprendidas por fuerzas tangenciales de los vasos pulmonares lesionados. El estudio de la ultraestructura celular y de marcadores específicos de lecho vascular podrá ayudar a clarificar este punto.

Los mecanismos que provocan la activación endotelial no han sido del todo elucidados. No obstante, existe un buen número de estímulos que podrían provocar este tipo de respuesta en sujetos genéticamente

predispuestos (fuerzas de cizallamiento por el flujo sanguíneo, hipoxia alveolar...).

Figura 12: Papel de la disfunción endotelial en la HP



La naturaleza del estímulo inicial que precede a los eventos de vasoconstricción y proliferación vascular es desconocida. Una hipótesis posible es que la lesión del endotelio provoque la apoptosis de éstas células quiescentes, desestabilizando la íntima vascular, sobretodo en lugares de ramificación lo que llevaría a una proliferación incontrolada de las células endoteliales. Esto a su vez provocaría una disminución de la luz vascular y un aumento de las PVR, elevando la presión pulmonar. Mientras

que un endotelio íntegro responde al estrés mecánico favoreciendo la síntesis de colágeno en la pared vascular¹⁹⁰, esta respuesta se pierde en las arterias que han sufrido lesión endotelial. En su lugar, la elastasa vascular puede permeabilizar la pared vascular e iniciar la degradación de la matriz extracelular. Además, factores de crecimiento como el FGF pueden fugarse del torrente sanguíneo y llegar a las células musculares lisas de la capa media del vaso¹⁹¹.

13.2 Alteraciones en la síntesis y disponibilidad de factores vasodilatadores.

El equilibrio fisiológico entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores depende de la integridad funcional del endotelio. El papel del NO en la patogénesis de la HP no está bien aclarado. La evidencia disponible proviene en parte de estudios animales. La sobreproducción de NO por eNOS en ratones transgénicos previene el desarrollo de HP inducida por hipoxia¹⁹². Por el contrario, ratones deficientes en eNOS desarrollan HP severa en respuesta a hipoxia leve¹⁹³.

En términos amplios, los mecanismos potenciales que explicarían una alteración del NO en la HP incluyen una expresión reducida de receptores colinérgicos muscarínicos en las células endoteliales, una señalización intracelular alterada, una producción reducida de NO y un aumento de su degradación, y una respuesta atenuada al NO o a su segundo mensajero el cGMP¹⁹⁴.

En la fase inicial del proceso existe una pérdida selectiva de respuesta de la síntesis de NO a estímulos extracelulares mediados por receptor (p.e.

acetilcolina), sin afectación de la capacidad de activación máxima de la enzima ni de la degradación del NO. A medida que la enfermedad progresa, se produce una inhibición inespecífica de la biodisponibilidad de NO que, aunque probablemente de origen multifactorial, implica un bloqueo acelerado de esta molécula por aniones superóxido.

En humanos se ha documentado que existe una producción variable de eNOS en pacientes con HP idiopática, con expresión reducida de la enzima en las arterias pulmonares¹⁹⁵ pero con aumento de la expresión en el seno de las lesiones plexiformes¹⁹⁶, lo que indicaría una distribución preferencial regional de la enzima. Además un aumento local de NO en el endotelio potenciaría la angiogénesis y la señalización de la vía del VEGF, mientras que podría haber una falta de respuesta del músculo liso al NO, bien por mala distribución del NO hacia la capa media vascular o por alteraciones en la vía de señalización del NO (cGMP).

Se ha objetivado que en pacientes con IC existe una reducción de la captación de arginina por las células endoteliales que provoca una deficiencia relativa de arginina intracelular, afectando a la síntesis de NO¹⁹⁷. Además, inhibidores de la eNOS como la ADMA o la L-NMMA pueden inhibir el transporte de L-arginina. Esto explicaría por qué pese a que las concentraciones plasmáticas de L-arginina son normales o elevadas en pacientes con IC, la suplementación oral de este aminoácido aumenta la producción de NO, ya que aumentaría su transporte al interior de la célula endotelial y por tanto su biodisponibilidad para la síntesis de NO¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Es lo que se conoce como la paradoja de la L-arginina. Otra posibilidad que explicaría una reducción de NO endotelial sería una menor disponibilidad de BH₄, cofactor indispensable para su síntesis, como

sugiere un estudio que registró un aumento de la formación del mediador al administrar sepiapterina, precursor de la síntesis de BH₄²⁰¹.

Se han demostrado niveles elevados de sGC libre de hemo y sGC oxidada en pacientes con patologías cardiovasculares²⁰²⁻²⁰³. Como se ha explicado antes, el NO se une al grupo hemo reducido de la sGC para activarla, por lo que estas formas de enzima no son sensibles al NO. En un estudio con ratones transgénicos que expresaban sólo sGC libre de hemo, éstos presentaron una pérdida notable de la respuesta vasodilatadora a NO y una menor supervivencia²⁰⁴.

También se han documentado niveles elevados de ADMA, tanto por aumento de su producción en las células endoteliales como por una menor degradación por la enzima DDAH, que es muy sensible al estado redox de la célula²⁰⁵. Por lo tanto, el estrés oxidativo a nivel endotelial podría estimular la producción de ADMA y/o inhibir su degradación.

El NO no es el único vasodilatador vascular pulmonar que se ve afectado en la HP. Se ha objetivado una menor expresión de la prostaciclina sintasa en las arterias pulmonares y una menor concentración de metabolitos urinarios de la PGI₂ en pacientes con HP²⁰⁶⁻²⁰⁷.

13.3 Alteraciones en la concentración de factores vasoconstrictores.

La ET-1 está aumentada tanto en modelos animales como en pacientes con HP^{130,208-209}. Más aún, existe una fuerte correlación entre la concentración de ET-1 y las RVP en pacientes con HAP idiopática y

síndrome de Eisenmenger. El cociente arterio-venoso de ET-1 está elevado en pacientes con HP lo que sugiere bien una sobreproducción o bien una disminución del aclaramiento de esta sustancia. La expresión de los receptores A y B de la ET-1 está aumentada en modelos animales²⁰⁸⁻²⁰⁹, mientras que en humanos se ha documentado un aumento de la expresión del receptor B en paciente con HP de tipo 4²¹⁰.

También el TXA₂ parece que se encuentra elevado en pacientes con HP, como sugiere un estudio realizado en pacientes con HP que objetivó un aumento de los metabolitos de degradación de esta sustancia y un aumento de la expresión de sus receptores en el VD^{207,211}.

Las células endoteliales no secretan de forma constitutiva VEGF, sin embargo en el contexto de la HP se ha demostrado la expresión de esta sustancia en el endotelio y las plaquetas²¹². En condiciones normales el VEGF es un factor de supervivencia y diferenciación para las células endoteliales pulmonares, por lo que su elevación en la HP se podría interpretar como una respuesta protectora. Si se antagoniza en ratones sanos, provoca la aparición de HP severa²¹³. Sin embargo, una vez ya se ha desarrollado la enfermedad, su expresión fomenta la proliferación endotelial y la formación de lesiones plexiformes.

13.4 Inflamación e hipercoagulabilidad

El papel que puede jugar la inflamación en el desarrollo de HP no está del todo claro. Las células inflamatorias como los macrófagos o los linfocitos están aumentados en las lesiones plexiformes de las arterias pulmonares²¹⁴. Diversas citoquinas como la proteína inflamatoria de

macrófago 1- α , la interleucina 1- β o la interleucina 6 están aumentadas en el suero de pacientes con HP²¹⁵⁻²¹⁶. Además se ha demostrado que existe un aumento de la expresión de la lipooxigenasa 5 (5-LO) y de la proteína activadora de 5-LO (FLAP), ambos mediadores de la síntesis de leucotrienos, en pacientes con HP. Más aún, la inhibición de estas dos enzimas en ratones protegió contra el desarrollo de HP²¹⁷.

La disfunción endotelial también contribuye a un estado protrombótico, una característica común de la mayoría de formas de HP. El déficit relativo de NO y PGI₂, con propiedades antitrombóticas, y el enlentecimiento del flujo sanguíneo en la circulación pulmonar potencia la trombogenicidad¹⁸⁶. La trombosis in situ oblitera la luz vascular, empeorando la HP²¹⁸.

Se han descrito niveles aumentados de P-selectina y disminuidos de trombosmodulina en pacientes con HP primaria y secundaria²¹⁹. El factor de von Willebrand (fvW) también aparece aumentado en la HP²¹⁹ y sus niveles se han correlacionado con una mayor mortalidad²²⁰.

13.5 Estrés oxidativo

A pesar de la relevancia del estrés oxidativo en la patogenia de la HP, no se han establecido claramente los eventos bioquímicos iniciales que desencadenan la hiperproducción de radicales libres en este contexto. Es posible que el propio descenso en la biosíntesis de NO, característico de las etapas iniciales de la disfunción endotelial, permita un aumento de la expresión regulada por citoquinas de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, ELAM) que faciliten la adhesión de neutrófilos al endotelio, la agregación plaquetaria y el desarrollo de inflamación, que puede

aumentar el nivel de estrés oxidativo ya que es una rica fuente de radicales superóxido.

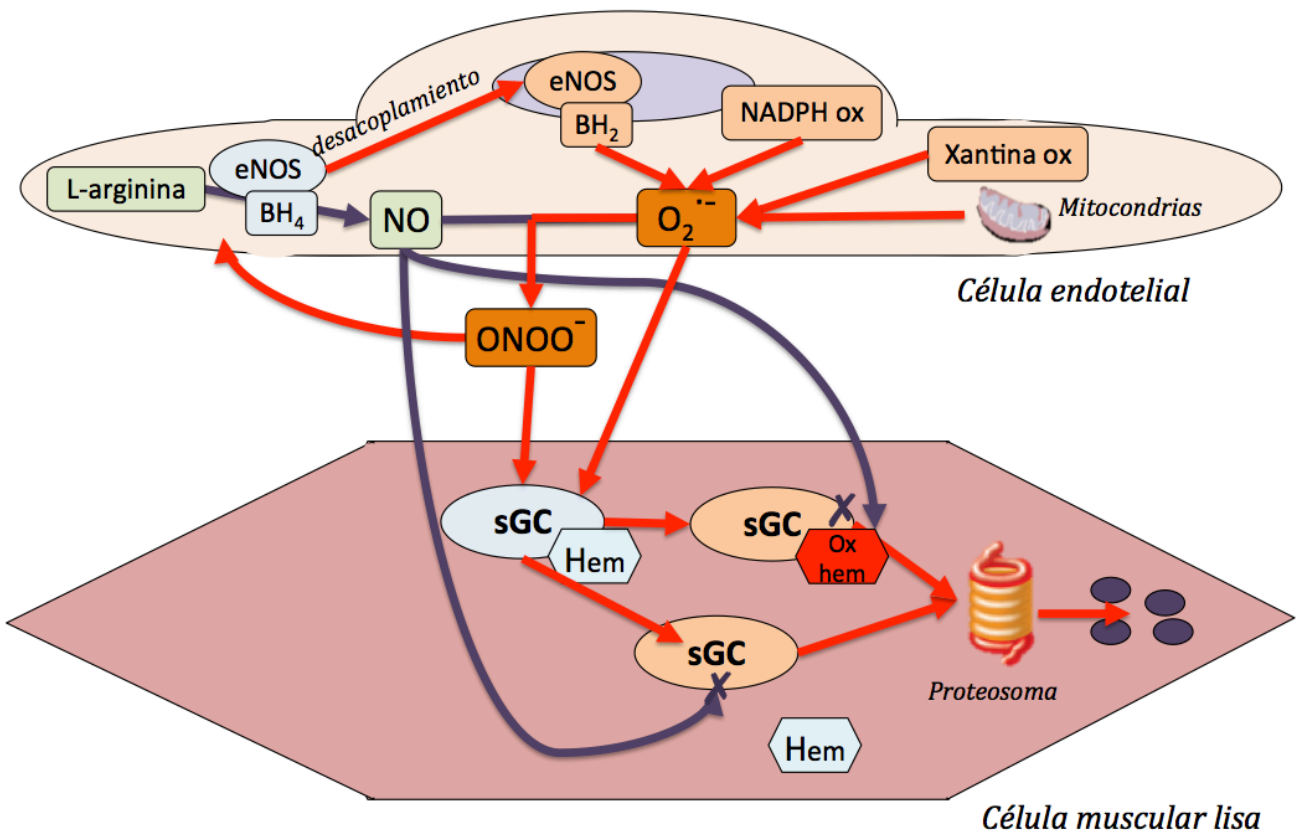
Los macrófagos activados presentes en el área lesionada expresan el isoenzima inducible (iNOS), capaz de producir grandes cantidades de NO, que rápidamente interactúa con el anión superóxido para formar peroxinitrito, un intermediario altamente reactivo. La reacción para formar peroxinitrito se produce a una elevada velocidad, tres o cuatro veces más rápida que la dismutación de superóxido por la superóxido dismutasa (SOD). El peroxinitrito, además de reducir la disponibilidad de NO, a elevadas concentraciones es citotóxico y produce daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA, que suele evaluarse por la presencia de residuos de nitrotirosina.

Numerosas evidencias indican que, bajo ciertas condiciones experimentales, tanto la eNOS como la iNOS pueden ser también una fuente importante de iones superóxido. Para ello se requiere el “desacoplamiento” del enzima. En el estado desacoplado, los electrones que fluyen desde el dominio reductasa hasta el dominio oxigenasa de la NOS son desviados al oxígeno molecular en lugar de a la arginina (el sustrato normal), resultando en la producción de superóxido en lugar de NO. El desacoplamiento de la NOS se ha observado habitualmente bajo condiciones de limitada disponibilidad de arginina o del cofactor tetrahydrobiopterina (BH₄)²²¹⁻²²².

El aumento de peroxinitrito podría mediar la oxidación del cofactor de la NOS, tetrahydrobiopterina (BH₄)²²¹ e inactivarlo como cofactor al producir dihydrobiopterina (BH₂)²²³, o podría oxidar directamente el núcleo zinc-

tiolato de la eNOS, produciendo la liberación de zinc desde la enzima²²⁴. Cualquiera de las dos posibilidades conduciría al desacoplamiento de la NOS²²⁵.

Figura 13: Papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la HP



eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; BH₄: tetrahidrobiopterina; BH₂: dihidrobiopterina; NADPH ox: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrógeno oxidasa; Xantina ox: xantina oxidasa; O₂^{•-}: radical superóxido; NO: óxido nítrico; ONOO⁻: peroxinitrito; sGC: guanilato ciclase soluble; Hem: grupo hemo reducido; ox Hem: grupo hemo oxidado.

Como se ha comentado previamente, el estrés oxidativo también afecta a la sGC, ya que al pasar el hemo de reducido a oxidado se hace menos

sensible al NO. A su vez, la enzima DDAH, encargada de degradar el ADMA, se inhibe en condiciones de oxidación elevadas, por lo que aumentarán las concentraciones de este metabolito que es un inhibidor de la eNOS.

También se conoce que la expresión aumentada de citoquinas inflamatorias, así como la depleción de NO y la hipoxia estimulan la expresión de la xantina oxidoreductasa (XOR)²²⁶⁻²²⁷. La reacción catalizada por esta enzima produce anión superóxido y peróxido de hidrógeno, cuyos niveles aumentados se han correlacionado con una mayor vasoconstricción en arterias de conejo²²⁸. Además, la inhibición de esta enzima con alopurinol atenuó los cambios vasculares en un modelo animal de HP inducida por hipoxia²²⁹.

14. Biomarcadores en hipertensión pulmonar

Como se ha comentado previamente, en el momento actual no disponemos de técnicas no invasivas que sean específicas para el despistaje y diagnóstico de la HP. La ecocardiografía es la mejor aproximación en el presente, con todas sus limitaciones²³⁰. Tampoco podemos predecir de forma fiable la respuesta al tratamiento médico con fármacos específicos para la HP. Para el manejo óptimo de esta enfermedad sería idóneo disponer de biomarcadores que de forma específica indicaran la presencia o no de la enfermedad, su estadio, y la respuesta al tratamiento.

Un biomarcador o marcador biológico es toda aquella sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse

objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. Los biomarcadores pueden medirse en los niveles molecular, bioquímico o celular.

Las GPC recomiendan el uso del péptido natriurético cerebral (BNP) o del fragmento N-terminal del propéptido natriurético cerebral (NT-proBNP) como biomarcadores para estratificar el riesgo de muerte en pacientes con HP distinta del grupo 2¹. En la HPCI el ascenso de estos péptidos es inherente a la enfermedad cardíaca de base, por lo que no serían útiles.

14.1 Biomarcadores de origen miocárdico

La tensión miocárdica, el estiramiento excesivo de las fibras miocárdicas o una frecuencia cardíaca elevada pueden resultar en la liberación al plasma de mediadores moleculares cardíacos que tienen importancia y relevancia en diversas enfermedades cardiovasculares, incluida la HP. Existen diversos trabajos que han investigado el posible papel de la familia de los péptidos natriuréticos, así como otras proteínas miocárdicas como la troponina T (TnT) o la proteína ligadora de ácidos grasos de tipo cardíaco (H-FABP) en el diagnóstico y pronóstico de la HP.

Los péptidos natriuréticos fueron los primeros que marcadores séricos de HP. En pequeñas cohortes de pacientes con HP se encontraron niveles elevados de péptido natriurético atrial (PNA) en comparación con voluntarios sanos²³¹. Además, se demostró que los niveles de PNA cambiaban de forma aguda en respuesta a los vasodilatadores

pulmonares²³². Sin embargo, debido a cuestiones de índole práctico, el interés en esta familia de proteínas se ha focalizado más en el BNP y derivados. El BNP es un péptido de 32 aminoácidos que es secretado por los ventrículos en respuesta a un excesivo estiramiento de los miocardiocitos. El BNP es más estable que el PNA y no requiere de un enfriamiento inmediato tras la extracción de la muestra sanguínea para posibilitar su cuantificación.

En los últimos años, el BNP y el NT-proBNP han emergido como los principales marcadores serológicos de disfunción del VD en la HP. Nagaya y cols²³³ fueron los primeros en demostrar que los niveles plasmáticos de BNP tenían un valor pronóstico en la HP. En su cohorte, niveles basales de BNP > 150 pg/mL o post tratamiento > 180 pg/mL se asociaron a una peor supervivencia. En otro estudio francés²³⁴, el BNP, junto a otros marcadores, fue un predictor de supervivencia. En pacientes con cardiopatías congénitas e HP, tanto el PNA como el BNP predijeron mortalidad y respuesta al tratamiento²³⁵. En la HP del grupo 4, los niveles de BNP descendieron un mes después de someter a los pacientes a tratamiento con endarterectomía pulmonar²³⁶. También en el embolismo pulmonar agudo y en la fibrosis pulmonar el BNP ha demostrado utilidad^{237,238}. Además, el tratamiento con ambrisentán, antagonista del receptor de ET-1, redujo los niveles de BNP en pacientes con HP tipo 1²³⁹. El NT-proBNP es un subproducto derivado de la síntesis de BNP, y también ha demostrado ser de utilidad en la HP del grupo 1. Éste péptido ofrece la ventaja sobre el BNP de tener un aclaramiento metabólico mucho más lento²⁴⁰. Determinaciones seriadas de NT-proBNP demostraron tener valor pronóstico en pacientes con HP arterial²⁴¹. Además, en un estudio con

teprostín inhalado, se objetivaron descensos de este marcador tras iniciar el tratamiento²⁴². En definitiva, aunque los péptidos natriuréticos se han correlacionado con el pronóstico en estudios retrospectivos, no se ha llegado a establecer un valor umbral que sirva de punto de corte para determinar si el paciente va a presentar buen o mal pronóstico, o qué valor se puede considerar una respuesta significativa al tratamiento. Por otra parte, ambos péptidos tienen eliminación renal, por lo que una disfunción renal causaría elevaciones significativas de ambas hormonas. Además, como se ha comentado, ambos son marcadores de IC, tanto del corazón izquierdo como el derecho, por lo que no son específicos del VD.

Las troponinas cardíacas son liberadas por los miocardiocitos en respuesta a la isquemia, por lo que el uso principal de la TnT es el diagnóstico de isquemia e infarto miocárdico. Cuando los pacientes con HP desarrollan insuficiencia del VD se produce un aumento de la presión intramural del VD que reduce la presión sistémica, por lo que se reduce el flujo miocárdico y la perfusión del VD resultando isquemia. La TnT mostró ser un marcador independiente de mortalidad es un análisis multivariado realizado en pacientes con HP arterial²⁴³. El mismo hallazgo se objetivó para la TnT de alta sensibilidad (TnT-as)²⁴⁴, pero lo cierto es que estas proteínas sólo aparecieron elevadas en pacientes con graves con muy mal pronóstico lo que limita el uso clínico de este marcador.

La H-FABP también es un marcador de daño miocárdico. La isoforma cardíaca representa un 5-15% del pool de proteínas citosólicas del miocardiocito, por lo que difunde rápidamente al plasma en caso de lesión miocárdica²⁴⁵. La H-FABP ha demostrado servir como un indicador precoz y altamente sensible y específico de muerte en pacientes con embolismo

pulmonar agudo²⁴⁶⁻²⁴⁷, y además ha probado ser un predictor independiente de supervivencia en pacientes con HP del grupo 4 según un estudio unicéntrico²⁴⁸. Aquellos pacientes que presentaban valores basales de H-FABP elevados presentaron una evolución desfavorable durante el seguimiento. No se ha estudiado a esta proteína en otras formas de HP, aunque podría servir como marcador de disfunción aguda y crónica del VD. De hecho, este marcador sí que ha demostrado una utilidad potencial como predictor de un pronóstico desfavorable en pacientes con IC^{249,250} y se encuentra elevado en pacientes con cardiopatías congénitas con afectación del ventrículo derecho y clase funcional avanzada²⁵¹.

14.2 Biomarcadores de origen endotelial

La disfunción endotelial es un fenómeno distintivo de la HP, por lo que los marcadores de origen endotelial son de especial interés. En la literatura disponible existe evidencia de un aumento de la expresión de ET-1 en los pulmones de pacientes con HP de cualquier grupo^{128,252}. De forma fisiológica los niveles de ET-1 se encuentran elevados en pacientes ancianos, varones y de etnia africana y reducidos en pacientes bajo tratamiento con betabloqueantes, estatinas o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina²⁵³. En un pequeño estudio en HP del grupo 1, los niveles de ET-1 y su precursor big-ET1 se correlacionaron con parámetros hemodinámicos como el gasto cardiaco, índice cardiaco, PAPm, RVP y la distancia recorrida en el test de los 6MM²⁵⁴. Ya en un estudio del año 1992¹²⁸, demostró que en pacientes con HPCI los niveles

de ET-1 se encontraban elevados y correlacionaban con los valores de las presiones pulmonares (sistólica, diastólica y media) y las RVP. Se ha objetivado también que existe una disminución de su aclaramiento pulmonar²⁵⁵ y que esta eliminación era menor conforme aumentaba la severidad de la HP, aunque no se ha relacionado de forma directa con los niveles plasmáticos de ET-1. En otro estudio de pequeño tamaño, se documentó que los pacientes con HPCI reactiva presentaban niveles aumentados de ET-1 y que estos se correlacionaban con la presión arterial de oxígeno (PaO₂), la presión venosa de oxígeno (PvO₂) y el GTP²⁵⁶. Más allá de la ET-1, el cociente ET-1:ET-3 podría tener también valor pronóstico, ya que en un estudio en pacientes del grupo 1 mostró correlación con las RVP y la distancia recorrida en el test de 6MM²⁵⁷. El cociente fue más elevado conforme empeoraba la clase funcional del paciente. A nivel histológico, se ha documentado que en VD de pacientes con HP existe un incremento significativo del cociente entre receptores ET_A y ET_B comparado con corazones sanos. En la capa muscular media de las arteriolas pulmonares, la densidad de receptores ET_A fue notablemente más alta que en pulmones sanos²⁵⁸.

Las angiopoyetinas (Ang) son factores angiogénicos esenciales para el correcto desarrollo y maduración vascular²⁵⁹. Ang-1 y Ang-2 se unen a un receptor tirosina quinasa, Tie-2, que se expresa casi exclusivamente en el endotelio²⁶⁰. En el adulto sano, Ang-1 se expresa de forma constitutiva, mientras que Ang-2 tiene un bajo nivel de fosforilación. Este equilibrio está alterado en la HP. En un estudio unicéntrico se documentaron niveles elevados de Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en pacientes con HP idiopática, y Ang-2 resultó un predictor independiente de mal pronóstico²⁶¹. Los cambios

objetivados en los niveles de Ang-2 tras iniciar el tratamiento específico de la HP se correlacionaron con cambios en la PAPm y en las RVP.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son un marcador establecido de función vascular. Los pacientes con HP del grupo que presentaban niveles bajos de HDL tuvieron una menor supervivencia en la evolución²⁶². Los marcadores de resistencia insulínica parecen servir también como biomarcadores en HP. La hemoglobina glicosilada se encuentra elevada en más de la mitad de pacientes con HP arterial. Lo que no queda aclarado es si es la HP la que provoca la alteración en el metabolismo de la glucosa o viceversa²⁶³.

La adrenomedulina es un péptido que aumenta el flujo pulmonar. Sus niveles mostraron estar elevados en pacientes con HP arterial comparados con sujetos normales, y correlacionaron de forma significativa con la PAPm y las RVP²⁶⁴. También la activina A se encuentra elevada en el suero de pacientes con HP, pero su valor pronóstico no ha sido dilucidado²⁶⁵. La apelina es una hormona secretada por el endotelio y que actúa de forma paracrina induciendo apoptosis de las células musculares lisas e inhibiendo su proliferación²⁶⁶. Además, su administración en ratas con HP inducida por monocrotalina mejoró la función del VD, por lo que podría ser tanto un biomarcador como una terapia de futuro.

La ADMA se encuentre elevada en pacientes de todo tipo de HP. Niveles altos se han asociado con peor supervivencia en pacientes con HP idiopática, HP del grupo 4, HP en cardiopatías congénitas y en HP portopulmonar²⁶⁷⁻²⁷⁰. En el primer grupo fue un predictor independiente de mortalidad y correlacionó con la presión de la aurícula derecha y con el

índice cardíaco²⁶⁸. En el TEP crónico la ADMA también fue predictora de gravedad y mal pronóstico²⁶⁹. Respecto a la HPCI, se ha registrado que tanto la ADMA se encuentra más elevada en pacientes con IC descompensada, y que los niveles se correlacionaban con la PAPs y la PVC. En este mismo estudio se documentó también que la biodisponibilidad de arginina medida como el cociente arginina/(citrulina + ornitina) era menor en pacientes con IC descompensada. Además, aquellos pacientes que presentaron una PAPs > 50 mmHg mostraron niveles de expresión más bajos de la enzima DDAH²⁷¹.

Las micropartículas circulantes (MPC) son fragmentos de células endoteliales dañadas (CD62e+) así como de otras células plasmáticas como leucocitos (CD11b+) o plaquetas (CD31+). Estas MPC se encuentran elevadas en pacientes con HP, y sus niveles se asociaron a un peor pronóstico²⁷²⁻²⁷⁴. Sin embargo, los niveles de MPC no predijeron la reversibilidad de las RVP en niños con HP²⁷⁵. También se ha estudiado el papel de las células endoteliales circulantes (CEC) íntegras en la HP. En un primer estudio se pudo correlacionar su número con la PAP, pero no con las RVP o el gasto cardíaco¹⁸⁹. Más interesante aún fue el resultado arrojado por un estudio realizado en pacientes con cardiopatías congénitas, en el que la irreversibilidad de las RVP se asoció a un aumento de las CEC²⁷⁶. En la IC se ha documentado que existía una correlación entre la gravedad de la IC y el nivel de CEC²⁷⁷. Los estudios realizados midiendo las células progenitoras endoteliales arrojan resultados contradictorios, por lo que no los comentaremos aquí.

14.3 Biomarcadores de la vía de la hemostasia

La trombosis microvascular es un hallazgo común en el árbol vascular alterado de los pacientes con HP y a su vez puede contribuir al remodelado vascular entrando en un círculo vicioso. El estudio de los marcadores de trombosis podría ayudar al diagnóstico no sólo de la HP del grupo 4 sino también de los otros grupos. Biomarcadores como los D-dímeros, el fibrinógeno o el inhibidor del plasminógeno se encuentran elevados en los pacientes con HP por lo que podrían ser útiles en el manejo de su enfermedad. La trombomodulina se encuentra disminuida en pacientes con HP del grupo 4²⁷⁸, mientras que los niveles de factor VIII estaban aumentados²⁷⁹. En pacientes con HP idiopática, los niveles de factor VIII disminuyeron a largo plazo en pacientes bajo tratamiento con PGI₂. El fvW fue predictor independiente de supervivencia en pacientes con HP del grupo 1²⁸⁰ y sus niveles se normalizaron en los pacientes que iniciaron tratamiento con PGI₂²⁸¹. Los niveles de fvW y e-selectina fueron significativamente más altos en pacientes con IC descompensada que en pacientes con IC en fase estable, o que en controles sanos²⁷⁷. Los pacientes con IC estable también presentaron niveles aumentados de fvW y disminuidos de trombospondina comparados con controles sanos²⁸².

14.4 Biomarcadores de inflamación y remodelado

Los procesos inflamatorios en los que participan citoquinas, quimioquinas, y factores de crecimiento juegan un papel primordial en el remodelado vascular de la HP, como ha sido reconocido recientemente.

Un parámetro rutinario de laboratorio como es la proteína C reactiva (PCR) se ha asociado a un pronóstico desfavorable en diferentes enfermedades cardiovasculares, entre las que se incluyen la HP del grupo 1 y 4²⁸³. A los pacientes con HP por TEP crónico a los que se les sometió a cirugía de endarterectomía, los niveles de esta proteína disminuyeron durante los meses posteriores a la intervención²⁸⁴. La PCR, al igual que el ácido siálico, mostró valores elevados en pacientes con IC, que correlacionaron con la clase funcional²⁸⁵.

El ligando soluble de CD40 (sCD40L) se expresa en las plaquetas que lo liberan al activarse. Se ha documentado elevaciones de esta proteína en varias formas de HP como la idiopática, la asociada a anemia falciforme o a cardiopatías congénitas²⁸⁶. En pacientes con HP secundaria a enfermedades del tejido conectivo, el sCD40L disminuyó tras 3 meses de tratamiento con bosentán²⁸⁷.

Se ha objetivado que diversas citoquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) se encuentran aumentadas en pacientes con HP. Además, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 fueron predictores de supervivencia²⁸⁸. Estos hallazgos estaban en concordancia con otro estudio en el que se detectaron niveles muy elevados de IL-6 (junto a VEGF y PDGF) comparados con voluntarios sanos, y además se correlacionó con mayor mortalidad²⁸⁹. La supervivencia a los 5 años en pacientes con niveles de IL-6 > 9 pg/mL fue del 30% comparada con el 63% que mostraron aquellos con niveles inferiores. En un estudio muy reciente los niveles de IL-6 han demostrado correlación con la PAP en pacientes con HPCI²⁹⁰.

La proteína osteopontina (OPN) es otra citoquina que fomenta del reclutamiento de macrófagos y linfocitos T al lugar de la inflamación. La OPN participa de remodelación arterial pulmonar inducida por hipoxia²⁹¹. Los niveles de OPN también se encuentran elevados en pacientes con HP, además de ser un factor predictor independiente de mortalidad²⁹². Se estableció un valor de corte de 34,5 ng/mL que permitió diferenciar a supervivientes de los que no lo fueron con una sensibilidad y especificidad de 88% y 63% respectivamente. OPN correlacionó con PVC, NT-proBNP y clase funcional, por lo que posiblemente su fuente sea el VD.

El factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF-15), miembro de la familia del TGF- β , es un factor pronóstico prometedor en la HP²⁹³⁻⁹⁴. Se ha visto que se expresa en las lesiones plexiformes de las arterias y modula la proliferación y apoptosis de las células endoteliales²⁹³. Estudios realizados muestran que sus niveles tienen valor pronóstico en las HP del grupo 1 y 4. En el grupo 1, se pudieron correlacionar sus niveles con la PVC, la PCP, el ácido úrico y el NT-proBNP.

Proteínas relacionadas con la degradación y remodelado de la matriz extracelular vascular como el inhibidor tisular del metaloproteinasas 4 (TIMP-4) la tenascina C o la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) mostraron niveles aumentados en pacientes con HP comparados con controles sanos aparejados por sexo y edad²⁹⁵. Este hallazgo sugiere que estos factores están regulados al alza en las arterias remodeladas, y son detectables en sangre periférica.

14.5 Biomarcadores de estrés oxidativo.

El ácido úrico, producto del metabolismo de las purinas refleja aumento del estrés oxidativo en diversas condiciones que cursan con isquemia tisular. Es un marcador de supervivencia, progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento en pacientes con HP del grupo 1²⁹⁶⁻⁹⁸. Esto puede deberse a exceso de producción en el corazón, a una disminución de su aclaramiento renal o bien al uso de diuréticos si existe clínica de IC derecha. Las alteraciones hemodinámicas parecen ser la principal causa de la elevación del ácido úrico, mientras que la reducción de la filtración glomerular parece no ser importante. Basándose en datos experimentales, es posible que los parámetros hemodinámicos y el ácido úrico estén conectados por la inflamación. Se desconoce si tratar la hiperuricemia tiene algún impacto positivo en la IC o su pronóstico. Su principal inconveniente es la falta de especificidad.

El isoprostano F2 urinario es un marcador de peroxidación lipídica, y se asocia de forma independiente a la mortalidad en pacientes con HP²⁹⁹. Su variante el isoprostano 15-F2t mostró encontrarse en concentraciones mucho más elevadas en pacientes con HP respecto a controles sanos (91 pg/ml vs 30 pg/ml) y aquellos que presentaban valores por encima de 97 pg/ml tuvieron una supervivencia menor³⁰⁰. Además los valores de este compuesto se correlacionaron con la clase funcional, la distancia recorrida en 6MM, la PVC y el NT-proBNP. Previamente ya se había documentado la presencia de esta molécula en concentraciones elevadas en pacientes con IC, y que además, las concentraciones aumentaban de forma paralela a la gravedad de la enfermedad³⁰¹⁻³⁰².

TABLA 10: Biomarcadores en hipertensión pulmonar	
De origen miocárdico	De origen endotelial
Péptido natriurético atrial (PNA) ²³¹⁻²³²	Endotelina 1 (ET-1) ^{128,252-8}
Péptido natriurético cerebral (BNP) ²³³⁻⁹	Angiopoyetina II (Ang II) ²⁵⁹⁻⁶¹
Fragmento N terminal del propéptido natriurético cerebral (NT-proBNP) ²⁴⁰⁻²	Lipoproteínas de alta densidad (HDL) ²⁶²
Troponina T (TnT) ²⁴³⁻⁴⁴	Adrenomedulina ²⁶⁴
Proteína ligadora de ácidos grasos cardíaca (H-FABP) ²⁴⁵⁻⁵¹	Dimetilarginina asimétrica (ADMA) ²⁶⁷⁻⁷¹
	Activina A ²⁶⁵
	Apelina ²⁶⁶
	Micropartículas circulantes (MPC) ²⁷²⁻⁷⁴
	Células endoteliales circulantes (CEC) ²⁷⁵⁻⁷⁷
Vía de la hemostasia	Inflamación y remodelado
Trombomodulina ²⁷⁸	Proteína C reactiva (PCR) ²⁸³⁻⁸⁵
Factor VIII ²⁷⁹	Ligando soluble de CD40 (sCD40L) ²⁸⁶⁻⁷
Factor de von Willebrand (fvW) ²⁸⁰⁻⁸²	Interleuquina 6 (IL-6) ²⁸⁸⁻⁹⁰
	Osteopontina (OPN) ²⁹¹⁻²
	Factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF-15) ²⁹³⁻⁴
	Metaloproteínas ²⁹⁵
Estrés oxidativo	
Ácido úrico ²⁹⁶⁻⁹⁸	Isoprostano F2 ²⁹⁹⁻³⁰²

II. HIPÓTESIS

Como hemos visto, la HP es un estado patológico del árbol vascular pulmonar que supone una alteración de la estructura y función del mismo a nivel tisular, celular y molecular. Esta alteración se vería reflejada por una expresión anómala en sangre circulante de moléculas relacionadas con la función endotelial, daño miocárdico, remodelado vascular y de las cascadas de la coagulación y de la inflamación.

La hipótesis que planteamos al diseñar esta línea de trabajo es que puede existir una asociación entre los niveles de expresión en sangre circulante de una o más moléculas y el grado de severidad clínico y hemodinámico de la HPCI. Es decir, se pretende encontrar una o más moléculas que puedan servir como biomarcadores en la HPCI. Como la gran mayoría de moléculas implicadas potencialmente útiles son proteínas, nos referiremos a ellas por el nombre del grupo mayoritario, es decir, proteínas.

De esta forma, la detección de unos niveles circulantes alterados de una serie de proteínas estudiadas permitiría identificar al subgrupo de pacientes con HP más severa y con una mayor probabilidad de que ya exista repercusión sobre el árbol vascular pulmonar, así como por otra parte, descartar la existencia de HP clínicamente significativa. Además, la monitorización de los niveles plasmáticos del perfil de proteínas seleccionado podría servir para valorar la respuesta al tratamiento o la necesidad de asociar nuevas terapias, así como aportar información pronóstica.

III. OBJETIVOS

1. Objetivos principales.

Estudio comparativo y de asociación de los niveles circulantes de una serie de proteínas plasmáticas entre pacientes con distintos grados de hipertensión pulmonar debida a enfermedad cardiaca izquierda.

- Valorar la presencia de diferencias entre los niveles de biomarcadores agrupados según su perfil hemodinámico:
 - Cuatro grupos: pacientes sin HP (grupo control), pacientes con HP poscapilar, pacientes con HP mixta reversible y pacientes con HP mixta e irreversible.
 - Tres grupos: pacientes sin HP (grupo control), pacientes con HP poscapilar, pacientes con HP mixta.
 - Dos grupos: pacientes sin HP (grupo control), pacientes con HP.
- Valorar las diferencias entre grupos según la presencia o no de componente precapilar en función de las dos definiciones hemodinámicas aceptadas actualmente; por GTP o por DPD.

La finalidad de este estudio será la selección de una serie de proteínas concreto que permita la clasificación de los pacientes en los distintos tipos diagnósticos de HP.

2. Objetivos secundarios.

- Estudiar de forma comparativa los niveles de las proteínas analizadas y la presencia de disfunción ventricular derecha valorada por ecocardiografía.

- Estudiar de forma comparativa los niveles de las proteínas analizadas y su relación con todos los objetivos enunciados en los dos grupos de pacientes más numerosos de la muestra: pacientes con miocardiopatía dilatada y pacientes con miocardiopatía isquémica.
- Analizar el valor pronóstico de las distintas proteínas estudiadas, su relación con la probabilidad de desarrollar el evento muerte/trasplante cardiaco a los 12 meses de seguimiento.
- Analizar la correlación entre el gasto/índice cardíaco, presiones (sistólica, diastólica, media, capilar pulmonar, gradiente transpulmonar y resistencias arteriales pulmonares) y los valores de las proteínas estudiadas.
- Realización de curvas COR y estimación de puntos de corte para cada uno de los objetivos enunciados.
- Identificación de variables predictoras de hipertensión pulmonar, componente precapilar y disfunción ventricular derecha.

IV. METODOLOGÍA

1. Diseño del estudio

Se planteó un estudio observacional prospectivo con inclusión consecutiva de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca u otra cardiopatía izquierda a los que se tuvo que realizar un cateterismo cardíaco derecho por indicación clínica.

Los pacientes serán seleccionados desde la Unidad de Insuficiencia Cardiaca y Trasplante del Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

2. Criterios de inclusión y de exclusión

2.1 Criterios de inclusión

- 1) Pacientes con insuficiencia cardiaca u otra cardiopatía izquierda a los que se tuvo que realizar un cateterismo cardíaco derecho por indicación clínica.
- 2) Edad > 18 años
- 3) Firma del consentimiento informado.

2.2 Criterios de exclusión

- 1) Pacientes en los que existía alguna duda de que el origen de la HP no fuera exclusivamente cardíaco (tromboembolismo pulmonar, afectación pulmonar primaria, conectivopatías, etc.).
- 2) Pacientes que se negaron a someterse a un cateterismo cardíaco derecho.
- 3) Pacientes en los que no fue posible realizar un cateterismo cardíaco derecho.

- 4) Pacientes que se negaron a firmar el consentimiento informado.

2.3 Selección de candidatos

Cuando se detectó un candidato a participar en el estudio, se le explicó el protocolo del estudio, y se le invitó a participar en el mismo. Una vez obtenido su consentimiento por escrito, se recogió su historial clínico, rellenando la historia informática. Se realizó un cateterismo cardíaco derecho, una extracción de sangre de la arteria pulmonar (antes del enclavamiento capilar) y una extracción de sangre periférica a todos los pacientes tras su inclusión. Las muestras de sangre obtenidas se remitieron para su procesamiento y almacenamiento en el laboratorio 5.13 de la Torre A del Hospital La Fe (Grupo de Investigación en Trombosis y Hemostasia).

Coincidiendo con el ingreso para la realización del cateterismo cardíaco derecho, y de acuerdo con el protocolo de estudio de HPCI de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante (Servicio de Cardiología) se realizó también una analítica general, un electrocardiograma y una ecocardiografía.

3. Tamaño muestral

Como se ha comentado previamente la prevalencia real de la HPCI es incierta, si bien los datos disponibles sugieren que afecta a una amplia proporción de pacientes con IC. Según los criterios diagnósticos empleados y el tipo de patología cardíaca subyacente, en

los estudios disponibles la prevalencia oscila entre 40 y 80%^{12-13,28,49-51}.

El tamaño muestral se ha calculado teniendo en cuenta varios factores: tipo de muestreo, parámetros a estimar, error admisible, varianza poblacional y nivel de confianza³⁰³. Se ha aceptado un nivel de confianza del 0,95. Para ello, nos hemos basado en datos de la literatura relacionados con las variables de nuestro estudio. Para obtener el tamaño de la muestra empleando el muestreo aleatorio simple, se utiliza la fórmula siguiente, ya conocida:

$$N = (Z_{\alpha/2} \times S^2) / e^2$$

$Z_{\alpha/2}$ = corresponde al nivel de confianza elegido

S^2 = varianza poblacional

e = error máximo

El promedio de pacientes con cardiopatías izquierdas a los que se realiza un cateterismo cardiaco derecho para medición de las presiones pulmonares es aproximadamente de unos 70 casos anuales. Por lo que el periodo destinado a la recogida de muestras se puede prever una población de unos 105 pacientes

Tras este análisis, se ha cifrado en 75 el número mínimo de casos necesario para obtener significación estadística. Por tanto, en este estudio se incluirán 75 pacientes consecutivos diagnosticados de HP de causa cardíaca izquierda a los que, previamente, se les haya realizado un cateterismo cardíaco derecho por indicación clínica.

4. Variables analizadas y material utilizado

4.1. Variables clínicas

En el momento de la inclusión fueron recogidos de forma prospectiva los datos generales sobre el paciente; es decir, sexo, edad, peso, talla, índice de masa corporal (IMC) y presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y antecedente de tabaquismo). Se definió de forma práctica la existencia de FRCV en los casos en los que el paciente precisaba de tratamiento farmacológico para su control.

También se recogieron datos relativos a la cardiopatía de base del paciente, como diagnóstico, tiempo de evolución de la enfermedad, clase funcional de la NYHA, tratamiento en el momento de realización del CCD y ser portador de dispositivos implantables (marcapasos o desfibriladores).

En el seguimiento de los pacientes se recogió la fecha de aparición del evento muerte o de la necesidad de un trasplante cardiaco.

4.2. Variables analíticas

Durante el ingreso a propósito de la realización del CCD se extrajo una muestra sanguínea (sangre periférica) para la realización de una analítica ordinaria. Esta muestra se analiza en los laboratorios tanto ordinario como urgente del servicio de Análisis Clínicos de nuestro hospital.

Los parámetros bioquímicos y de hemograma incluidos son urea, creatinina, filtración glomerular, ácido úrico, sodio, potasio, troponina T, NT-proBNP, bilirrubina total, alanina aminotransferasa (ALT), colesterol LDL, hemoglobina glicosilada, hemoglobina total y conteo de plaquetas.

4.3. Variables electrocardiográficas

Se realizó a cada uno de los pacientes un ECG de superficie de 12 derivaciones. Los registros se realizaron en un electrocardiógrafo *Pagewriter TC70 cardiograph® Phillips®*. Las variables incluidas fueron el ritmo cardiaco, la existencia de alteraciones de la conducción intraventricular (bloqueos completos de rama derecha o izquierda) y la anchura del complejo QRS en milisegundos.

Figura 14: Electrocardiógrafo *Pagewriter TC70 cardiograph® Phillips®*



4.4. Variables ecocardiográficas

A cada paciente se le realizó un estudio ecocardiográfico completo estandarizado incluyendo planos paraesternal, apical, subcostal y supraesternal.

Figura 15: Ecocardiógrafo *iE33 xMATRIX®* Phillips®



Las variables obtenidas de esta exploración incluidas en el estudio fueron diámetros ventriculares (sistólico y diastólico del VI), tamaño auricular desde plano paraesternal, función ventricular izquierda (fracción de eyección estimada por método de Simpson biplano y función diastólica según patrón de llenado mitral o cociente E/e'), diámetro basal del VD en apical 4 cámaras, función ventricular derecha estimada visualmente y medida mediante TAPSE y S', existencia de valvulopatía aórtica, mitral o tricuspídea (se registró si

es de grado moderado o grave), presión pulmonar sistólica estimada por el chorro de IT y diámetro de la vena cava inferior. Los estudios se realizaron con un equipo *iE33 xMATRIX® Phillips* ®.

4.5. Variables hemodinámicas

El cateterismo cardiaco derecho se realizó en el laboratorio de hemodinámica del Hospital La Fe. Según el protocolo habitual seguido por los cardiólogos hemodinamistas el acceso venoso escogido para el procedimiento fue la vena femoral. El catéter utilizado para el registro de las presiones y de las distintas cámaras y vasos fue indistintamente bien un catéter coronario multipropósito de 6F de marca Abbot ® o bien un catéter diagnóstico de Berman con balón inflable de 6F de la marca Arrow ®

Durante el procedimiento se realizó la medición de las variables clínicas habituales: presión sistólica, diastólica y media de la arteria pulmonar, presión capilar pulmonar, presión sistólica y diastólica del ventrículo derecho, presión en aurícula derecha. Además durante el procedimiento se extraerá una muestra de sangre de la arteria pulmonar para calcular una oximetría (saturación de oxígeno) a este nivel. Si se dispone de un acceso arterial se extraerá una muestra de sangre para calcular la oximetría arterial. En caso de no disponer de este acceso, se estimará la saturación arterial mediante un pulsioxímetro digital. A partir del peso del paciente se calcula el consumo de oxígeno estimado (V_{O_2}) y con la talla y el peso la superficie corporal (SC)

Con los datos hemodinámicos obtenidos en esta prueba se puede calcular el gasto cardiaco (GC) y a partir de él las resistencias vasculares pulmonares (RVP), además de otros valores hemodinámicos derivados aplicando las siguientes fórmulas:

$$\mathbf{GTP = (PAPm - PCP)}$$

$$\mathbf{DPD = (PdAP - PCP)}$$

$$\mathbf{GC (Fick) (l/min) = V_{O_2} / \Delta A-V O_2}$$

$$V_{O_2}(ml) = \text{Peso (Kg)} \times 3$$

(Diferencia arteriovenosa de oxígeno): $\Delta A-V O_2 = (\text{Sat-arterial-}O_2 - \text{Sat-venosa-}O_2) \times 1,36 \times [\text{Hemoglobina g/dl}] \times 10$

$$\mathbf{IC (\acute{indice cardiaco) (L/min/m^2) = GC / SC}$$

$$SC \text{ (Dubois) (m}^2\text{)} = [0,7184 \times \text{talla (cm)}^{0,725} \times \text{peso (kg)}^{0,425}] / 100$$

$$\mathbf{RVP (UW) = (PAPm - PAD) / GC}$$

Una vez calculados todos los valores, aquellos pacientes que presentaron una HP con GTP > 12 mmHg fueron sometidos a un test vasodilatador agudo con óxido nítrico inhalado. Se realiza administrando mediante una mascarilla especial NO inhalado al paciente a una concentración de 40 ppm durante 10 minutos. Al acabar este tiempo, se vuelven a realizar todas las medidas y cálculos hemodinámicos. Se considerará respondedor cuando descienda el GTP a ≤ 12 mmHg y las RVP a < 3 UW tras el test.

La clasificación de los pacientes se estableció en base a la presencia de HP (PAPm \geq 25 mmHg), existencia de componente precapilar por reactividad vascular (GTP $>$ 12 mmHg, RVP: \geq 3 UW) y reversibilidad o no de la misma tras test vasodilatador agudo con NO.

Los cuatros posibles grupos son ausencia de HP o grupo control (PAPm $<$ 25 mmHg); HP poscapilar (PAPm $<$ 25 mmHg, GTP \leq 12 mmHg); HP mixta (poscapilar y precapilar) reversible (PAPm $<$ 25 mmHg, GTP \geq 12 mmHg, respuesta a test NO) y HP mixta (poscapilar y precapilar) irreversible (PAPm $<$ 25 mmHg, GTP \geq 12 mmHg, sin respuesta a test de NO).

No obstante, en base a la evidencia aportada a publicaciones recientes, en la reunión de Niza de diciembre 2013^{15,19} (estando el presente proyecto ya en ejecución) se propuso utilizar el gradiente diastólico de presiones o DPD como forma de determinar la existencia o no de componente precapilar (ya que no es influenciado por la situación de volemia y presiones de llenado como el GTP). Así mismo se cuestionaba la utilidad clínica del test vasodilatador agudo con NO fuera del estudio pre-trasplante cardiaco.

Por este motivo, además de los 4 grupos originales planteados en el estudio, los pacientes fueron clasificados 2 veces en 3 grupos para realizar los análisis posteriores: ausencia de HP, HP poscapilar y HP mixta (considerando componente precapilar si GTP \geq 12 mmHg) y ausencia de HP, HP poscapilar y HP mixta (considerando componente precapilar si DPD \geq 7 mmHg).

4.6. Obtención y procesamiento de las muestras:

De cada paciente se obtuvieron 20 mL de sangre del tronco de la arteria pulmonar (antes del enclavamiento capilar). En una segunda fase del proyecto de investigación que se solapó en su parte final con el presente estudio, se extrajeron además 20 mL de sangre periférica, también durante el procedimiento del CCD.

Cada muestra de sangre se recogió en dos tipos de tubos Vacutainer®: tubos secos para suero (sin anticoagulante) y tubos para plasma (con anticoagulante citrato).

Inmediatamente tras la extracción, aunque se ha admitido un retraso de hasta 2 horas, se inició el procesado de las muestras para su posterior almacenaje. Los tubos de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min para separar suero y plasma de los elementos formes de la sangre. Se recogió el sobrenadante con ayuda de pipetas Pasteur y perilla y se almacenó en un criotubo Eppendorf a -80°C hasta el momento de su análisis en el laboratorio 5.13 de la Torre A del Hospital La Fe (Grupo de Investigación en Trombosis y Hemostasia).

4.7. Análisis preliminar semicuantitativo de un panel de proteínas mediante tecnología *microarray*:

Como parte inicial del estudio, se solicitó a una empresa externa (laboratorios Tebu-bio, París, Francia) la realización de un panel de proteínas en el que, mediante un método semicuantitativo de

microarrays basado en inmunofluorescencia, se analizaron 1.000 proteínas en muestras de suero de pacientes. El panel utilizado es comercial y se denomina Human L-series 1.000 Ref. 126AAH-BLG-1000 (ver apartado 5).

Para poder utilizar este panel, se seleccionaron las muestras de 8 pacientes de cada grupo (sin HP, HP poscapilar, HP mixta reversible y HP mixta irreversible), se descongelaron, y se mezclaron volúmenes iguales de cada una de ellas para obtener una muestra agrupada representativa de 225 μ L para cada una de las categorías de HP. Estas muestras agrupadas fueron las que se utilizaron en el panel de proteínas.

Debido a que la información que proporciona el panel es semicuantitativa, se incorporaron a un análisis cuantitativo (ELISA) posterior aquellas proteínas que han mostrado unos niveles alterados en los distintos grupos patológicos de HP y, por tanto, que pueden permitir discriminar entre presencia y ausencia de HP y entre los distintos tipos.

4.8. Variables biológicas.

El análisis cuantitativo de las proteínas previamente seleccionadas como candidatas a ser biomarcadores de HP por el método de *microarray* proteico, se realizó en los laboratorios dependientes de la Unidad de Hemostasia y Trombosis de la Torre A de Investigación del Hospital La Fe de Valencia. Las proteínas seleccionadas a partir del panel de proteínas fueron aquellas que mostraron una expresión

progresivamente alterada entre los grupos de pacientes con HP (ver resultados).

A las proteínas seleccionadas mediante el *microarray*, se unieron aquellas que ya habían sido previamente descritas en la literatura como potencialmente útiles en otros tipos de HP. Son las siguientes:

- 1) Función endotelial vascular: dimetilarginina asimétrica (ADMA), endotelina-1 (ET-1), factor de von Willebrand (fvW), homocisteína.
- 2) Angiogénesis: factor de crecimiento endotelial (VEGF), angiopoyetina 2 (Ang-2).
- 3) Cardiacas: péptido natriurético NT-proBNP, troponina T (TnT), proteína ligadora de ácidos grasos cardíaca (H-FABP).

Aunque ni la homocisteína ni la dimetilarginina asimétrica son proteínas, sino aminoácidos, para facilitar la escritura de la presente memoria nos referimos a ellas como “proteínas” al englobarlas junto con el resto de biomarcadores.

Para cuantificar estas proteínas, se empleó el método de enzimoimmunoensayo (ELISA) mediante la utilización de kits comerciales de anticuerpos frente a las diferentes proteínas (ver apartado 6).

5. Panel *microarray*

5.1. Introducción

Un *array* es un conjunto de proteínas diferentes que se disponen ordenadas en una superficie sólida como placas de vidrio

(portaobjetos de microscopio), cuentas o placas de microtitulación. Debido a que son las proteínas se disponen sobre la superficie a una micras de separación se conocen también como *microarrays*. Las placas tipo portaobjetos del microscopio, hechas de vidrio o silicona, son las más utilizadas ya que son compatibles con los escáneres láser que las leen de forma automática³⁰⁴.

La función de esta superficie es proporcionar un soporte sobre el cual las proteínas puedan ser inmovilizadas mientras mantienen su conformación nativa y por tanto su capacidad de unión a otras moléculas. Esto se consigue cubriendo esta superficie sólida con un recubrimiento que provea un medio hidrofílico donde la reacción de unión pueda tener lugar. Este recubrimiento puede ser de aluminio u oro, polímeros hidrofílicos o geles de poliacrilamida, que se depositan sobre la superficie mediante tecnologías de microcapa como el depósito físico a vapor. Es importante asegurar en todas las fases de la fabricación y utilización del *array* la presencia de un medio acuoso para evitar la desnaturalización proteica. Por ello, los tampones de muestra contienen un porcentaje elevado de glicerol que disminuye el punto de congelación³⁰⁵.

En la fabricación del *array* es necesario conseguir disponer las proteínas en el soporte recubierto siguiendo un patrón predefinido. Existen varios métodos, el más común, se realiza mediante tecnología robotizada (impresión robótica por contacto). Otros métodos son el chorro de tinta o el punteado piezoeléctrico, que son métodos sin contacto directo entre el impresor y la superficie³⁰⁶.

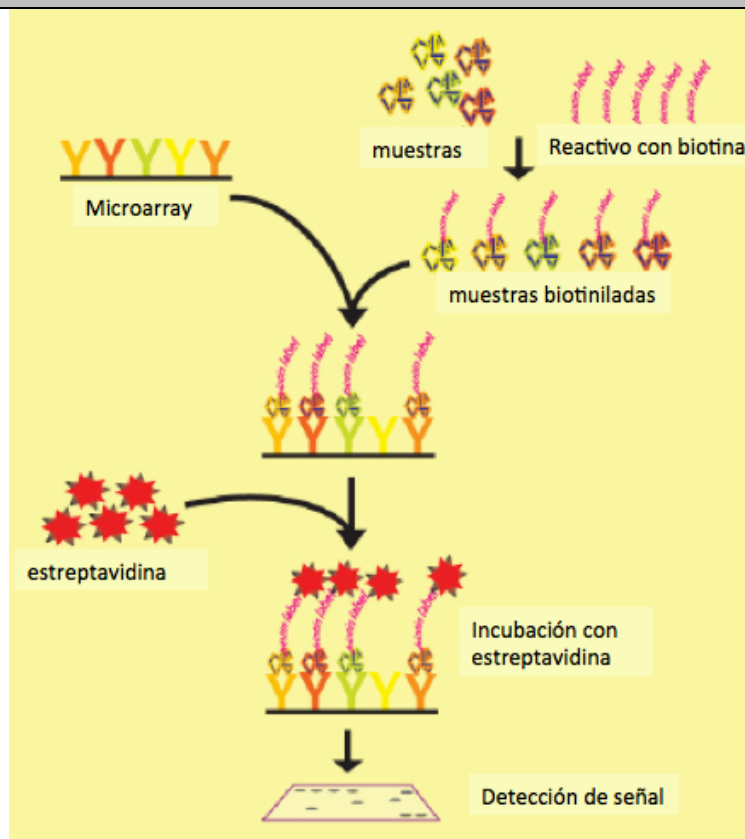
Las moléculas incluidas en un *array* pueden ser anticuerpos, antígenos, aptámeros (ligandos de ácidos nucleicos), aficuerpos (pequeñas moléculas que mimetizan anticuerpos monoclonales) o proteínas enteras. Los *microarrays* analíticos también se llaman arrays de captura, puesto que en esta técnica un panel (o biblioteca) de anticuerpos, aptámeros o aficuerpos se dispone en la superficie y cada uno de ellos se unirá a una proteína específica. Este tipo de *microarrays* son muy útiles para comparar el perfil de expresión proteica en distintos tejidos enfermos (sueros o lisados celulares).

El *microarray* utilizado en nuestro estudio, es el panel Human L-series 1.000 (126AAH-BLG-1000) comercializado por RayBiotech,(RayBiotech Inc, Norcross, Georgia, Estados Unidos) que permite medir de forma semicuantitativa la expresión de 1000 proteínas humanas, incluyendo citoquinas, quimioquinas, adipocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos, proteasas, receptores solubles, moléculas de adhesión solubles y otras proteínas en cultivos celulares, sueros o plasma.

El primer paso para utilizar este *array* es biotinilar (añadir una molécula de biotina) la amina primaria de las proteínas presentes en las muestras de suero. Posteriormente, se coloca una pequeña cantidad de muestra en cada una de las placas de vidrio que han sido previamente impregnados con anticuerpos específicos. Se deja incubar para permitir la interacción con la proteína específica. A continuación, se añade el colorante fluorescente conjugado (equivalente a la cianina Cy3) con una molécula de estreptavidina que se unirá a la biotina de las proteínas. Finalmente, la placa de vidrio es lavada y secada, por lo que sólo permanecerán las proteínas

que queden unidas a los anticuerpos específicos que contenía cada placa. Para cuantificar la cantidad de proteína, se mide la intensidad de fluorescencia mediante un escáner láser³⁰⁸.

Figura 16: Cómo se utiliza el microarray 126AAH-BLG-1000



5.2. Material necesario

El producto comercial proporciona el material necesario para el etiquetado, incubación y reacción de inmunofluorescencia de las muestras.

- Viales de diálisis
- Rejilla flotante para diálisis

- Reactivo de etiquetado
- Tampón de etiquetado
- Solución de bloqueo.
- Panel que contiene 2 placas de vidrio con anticuerpos Human L-series 1.000
- Tampón de bloqueo.
- Tampón de lavado I y II (1X y 20X)
- Estreptavidina-Cy3
- Tiras adhesivas
- Lámina de aluminio
- Contenedor de lavado

Adicionalmente se requiere:

- KCl, NaCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y ddH₂O
- Contenedor de vidrio y tubos de 1 ml.
- Agitador.
- Pipetas, puntas de pipeta y otros consumibles de laboratorio
- Escáner de láser para detección de la fluorescencia.

5.3. Protocolo

Es necesario dializar las muestras antes de proceder a su etiquetado con biotina.

1. Para preparar el tampón de diálisis (1xPBS -tampón fosfato salino - , pH=8,0) se diluye 0,6 g de KCl, 24 g de NaCl, 0,6 g de KH_2PO_4 y 3,45 g de Na_2HPO_4 en 2500 ml de ddH₂O. Para ajustar

el pH a 8,0 se añade NaOH 1M y se añade ddH₂O hasta un volumen de 3000 ml.

2. Se toma un vial de diálisis diferente para cada una de las muestras y se añaden 20 µl de suero + 80 µl 1X PBS (diluido 1:5).
3. Se colocan cuidadosamente los viales de diálisis en la rejilla flotante y ésta a su vez en un recipiente grande que contiene al menos 500 ml de tampón de diálisis. Se coloca el recipiente sobre un agitador magnético y se deja dializar, agitando a velocidad suave, durante 3 horas a 4°C. A continuación se renueva el tampón que contiene el recipiente y se deja dializar otras 3 horas.
4. A continuación se transfiere la muestra dializada a un tubo Eppendorf limpio. Se centrifugan 5 minutos a 10000 rpm y se vuelve a transferir el sobrenadante a otro tubo limpio.

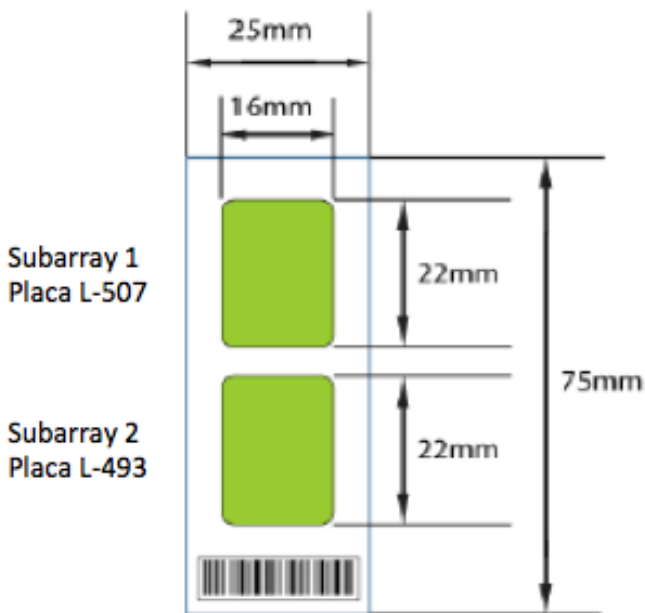
Para proceder con el etiquetado con biotina es necesario evitar contaminar las muestras con aminos (ej. Tris, glicina) o azidas, pues éstas pueden impedir la biotinilación.

5. Inmediatamente previo a su utilización, se prepara el reactivo de etiquetado. Se agita ligeramente el tubo que lo contiene y añade 100 µl 1X PBS. Para disolver bien el reactivo liofilizado, agitar con la pipeta y pasar el tubo brevemente por el vórtex.
6. Para etiquetar las muestras dializadas se añade en un nuevo tubo 35 µl suero dializado, 22 µl de reactivo y 155 µl de tampón de etiquetado.

7. Se incubaba la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Mezclar cada 5 minutos manualmente golpeando ligeramente los tubos.
8. Se añaden 3 μl de solución de bloqueo a cada tubo e inmediatamente se colocan las muestras en viales de diálisis para proceder con una nueva sesión de dializado de 3 horas (pasos 3-4).

Figura 17: Preparación de las muestras para su utilización

a) Panel con microarrays



a) Preparado de las muestras



A continuación se requiere preparar la placa de vidrio (panel) que contiene los anticuerpos.

9. Sacar el paquete que contienen el panel del congelador y dejar equilibrar 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente

- se extrae del envoltorio y se deja en una cámara de flujo laminar u otro ambiente limpio de contaminantes durante unas 2 horas a temperatura ambiente para que seque bien.
10. Una vez bien seco, se añaden 400 μl de tampón de bloqueo a cada placa y se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente, asegurándose que no quedan burbujas en la superficie del *array*.
 11. Inmediatamente ante de proceder con la incubación de muestras, se centrifugan las muestras biotiniladas durante 5 minutos a 10000 rpm para eliminar cualquier resto particulado. Diluir las muestras con tampón de bloqueo para que quede una dilución 1:20.
 12. Decantar el tampón de bloqueo previamente añadido de las placas y en su lugar añadir 400 μl de la muestra diluida en cada una de los placas, asegurándose que no quedan burbujas en la superficie del *array*. Hay que ser cuidadosos para evitar la contaminación de la placa vecina con cada muestra. Dejar incubar con agitación suave 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
 13. Decantar las muestras de cada placa y lavar 3 veces con 800 μl del tampón de lavado I 1X a temperatura ambiente, agitando suavemente 5 minutos por lavado.
 14. Colocar el panel de placas en un recipiente limpio que contenga suficiente cantidad de tampón de lavado I 1X para cubrirlo entero. Lavar 2 veces, a temperatura ambiente, agitando suavemente, 10 minutos por lavado.
 15. Decantar el tampón de lavado de cada placa, y colocar el panel en un recipiente limpio que contenga suficiente cantidad

de tampón de lavado II 1X para cubrirlo entero. Lavar 2 veces, a temperatura ambiente, agitando suavemente, 5 minutos por lavado.

En este punto añadimos la estreptavidina con el colorante fluorescente para que se una a la biotina de las proteínas que hayan quedado en las placas.

16. Para preparar Estreptavidina-Cy3 1X, se centrifuga brevemente el tubo que la contiene y se añaden 1000 µl de tampón de bloqueo. Para diluirla a concentración 1X, se añaden 200 µl de esta solución a 800 µl de tampón de bloqueo.
17. Decantar el tampón de lavado II de cada placa, y se extrae el panel del recipiente. Se añaden 400 µl de estreptavidina-Cy3 1X a cada placa y se cubre cada uno de ellas con tiras adhesivas. Para evitar la exposición a la luz, se cubre el panel con una lámina de aluminio o bien se incuba en un cuarto oscuro. Es importante evitar la exposición a la luz en los pasos restantes.
18. Dejar incubar 2 horas la estreptavidina-Cy3 1X a temperatura ambiente con agitación suave (puede dejarse también incubación durante la noche a 4°C).
19. Decantar la solución y desmontar la placa del marco que lo contiene, empujando suavemente desde las juntas.
20. Colocar la placa en el interior del contenedor de centrifugado de 30 ml. Añadir suficiente tampón de lavado I 1X para cubrir la placa (30 ml). Dejar lavar durante 10 minutos con agitación suave. Decantar el tampón y lavar 2 veces, a

temperatura ambiente, agitando suavemente, 10 minutos por lavado.

21. Repetir el paso anterior, pero en este caso utilizando el tampón de lavado II 1X. En esta ocasión se realizan 2 lavados de 5 minutos cada uno.
22. Finalmente se lava la placa con 30 ml de ddH₂O durante 5 minutos. Sacar la placa del contenedor y decantar el agua.
23. Para eliminar las gotas de tampón que pueden haber quedado en las placas, secar utilizando un chorro de N₂ comprimido o con aspiración suave con una pipeta.

El secado ha de ser óptimo antes de proceder a la lectura de la placa.

24. La lectura puede realizarse inmediatamente o puede almacenarse la placa para realizarlo posteriormente. El colorante es estable a temperatura ambiente, pero debe almacenarse en un lugar oscuro.
25. Introducir las placas en la ranura del escáner láser de microarrays y obtener las lecturas de intensidad de fluorescencia.

5.4. Lectura de señales

Los colorantes fluorescentes (fluoróforos) utilizados normalmente en la tecnología microarray incluyen cianinas, como la que emplea el presente protocolo, la Cy3. Éste colorante posee una emisión fluorescente a 570 nm (que corresponde a la parte amarillo-naranja del espectro luminoso). El escáner detecta la fluorescencia emitida

después de excitar las moléculas de fluoróforo con un haz láser de longitud de onda definida.

El escáner utilizado para la lectura de los microarrays es el InnoScan 710 de Arrayit® (ArrayIt Corporation, Sunnyvale, California, Estados Unidos) que es un escáner de última generación con alta sensibilidad y menor ruido de fondo. El diodo láser excita al fluoróforo Cy3 a 532 nm. El aparato puede leer una placa de 25 x 76 mm en 4 minutos con una resolución de 10 μm (aunque la resolución es ajustable entre 3 μm y 40 μm , con tiempos de escaneado diferentes).

Figura 18: Escáner láser de microarrays InnoScan 710



5.5. Proteínas incluidas en el microarray

Como se ha comentado previamente el panel *microarray* Human L-series 1.000 (126AAH-BLG-1000) permite medir la expresión de 1000 proteínas humanas, que se encuentran dispuestas en dos placas de vidrio diferentes. Cada una de ellas es por sí misma un microarray que reciben los nombres L-507 y L-493.

Las proteínas medibles en cada uno de los dos subarrays están incluidas en la tabla 11.

5.6. Interpretación de las señales leídas

Los controles positivos POS1, POS2 y POS3 son cantidades estandarizadas de IgGs biotiniladas que se han impreso directamente sobre la placa del microarray. Esto permite la normalización de los datos basándose en una señal de fluorescencia, que será una emisión conocida en respuesta a un control conocido. El control negativo NEG, contiene un tampón rico en proteínas. Su intensidad de señal representará la unión específica a proteínas de la biotina y la estreptavidina. Su señal será muy próxima al ruido de fondo. Si el escáner utiliza una configuración óptima, se identificarán claramente 3 intensidades de señal diferentes POS1>POS2>POS3.

TABLA 11: Proteínas incluidas en el microarray L-507

Number	Name	Number	Name	Number	Name	Number	Name	Number	Name
1	Positivo 1a	81	CCR7	121	Eotaxin-2 / MPIF-2	181	GFR alpha-2	241	IL-1 R8 / IL-1 Rrp2
2	Positivo 2a	82	CCR8	122	Eotaxin-3 / CCL28	182	GFR alpha-3	242	IL-1 R8
3	Positivo 3a	83	CCR9	123	Epregeñin	183	GFR alpha-4	243	IL-1 R9
4	neg	84	CD14	124	ErbB2	184	GITR / TNFRF18	244	IL-1 ra
5	8Ckine	85	CD27 / TNFRSF7	125	ErbB3	185	GITR Ligand / TNFSF18	245	IL-1 sRI
6	Activin A	86	CD30 / TNFRSF8	126	ErbB4	186	Glucagon	246	IL-1 sRII
7	Activin B	87	CD30 Ligand / TNFSF8	127	Erythropoietin	187	Glut1	247	IL-2
8	Activin C	88	CD40 / TNFRSF5	128	E-Selectin	188	Glut2	248	IL-2 R alpha
9	Activin RIA / ALK-2	89	CD40 Ligand / TNFSF5 / CD154	129	FADD	189	Glut3	249	IL-2 R beta / CD122
10	Activin RIB / ALK-4	70	CD 163	130	FAM3B	190	Glut5	250	IL-2 R gamma
11	Activin RII A/B	71	Cerberus 1	131	Fas / TNFRSF8	191	Glypican 3	251	IL-3
12	Activin RIIA	72	Chem R23	132	Fas Ligand	192	Glypican 5	252	IL-3 R alpha
13	Adiponectin / Acrp30	73	Chordin-Like 1	133	FGF Basic	193	GM-CSF	253	IL-4
14	AgRP	74	Chordin-Like 2	134	FGF-BP	194	GM-CSF R alpha	254	IL-4 R
15	ALCAM	75	CLC	135	FGF R3	195	Granzyme A	255	IL-5
16	Angiogenin	76	CNTF	136	FGF R4	196	GREMLIN	256	IL-5 R alpha
17	Angiopoietin-1	77	CNTF R alpha	137	FGF R5	197	FGF R5	257	IL-6
18	Angiopoietin-2	78	Coagulation Factor III / Tissue Factor	138	FGF 4	198	GRO-a	258	IL-6 R
19	Angiopoietin-4	79	CRIM 1	139	FGF-5	199	Growth Hormone (GH)	259	IL-7
20	Angiopoietin-like 1	80	Cripto-1	140	FGF-6	200	Growth Hormone R (GHR)	260	IL-7 R alpha
21	Angiopoietin-like 2	81	CRTH-2	141	FGF-7 / KGF	201	HB-EGF	261	IL-8
22	Angiopoietin-like Factor	82	Cryptic	142	FGF-8	202	HCC-4 / CCL16	262	IL-9
23	Angiostatin	83	Csk	143	FGF-9	203	HCR / CRAM-A/B	263	IL-10
24	APJ	84	CTACK / CCL27	144	FGF-10 / KGF-2	204	Hepassocin	264	IL-10 R alpha
25	APRIL	85	CTGF / CCN2	145	FGF-11	205	Heregulin / NDF / GGF	265	IL-10 R beta
26	AR (Amphiregulin)	86	CTLA-4 / CD152	146	FGF-12	206	HGF	266	IL-11
27	Artemin	87	CV-2 / Crossveinless-2	147	FGF-13 1B	207	HGFR	267	IL-12 p40
28	Axl	88	CXCL14 / BRAK	148	FGF-16	208	HRG-alpha	268	IL-12 p70
29	B7-1 / CD80	89	CXCL16	149	FGF-17	209	HRG-beta 1	269	IL-12 R beta 1
30	BAFF R / TNFRSF13C	90	CXCR1 / IL-8 RA	150	FGF-18	210	HVEM / TNFRSF14	270	IL-12 R beta 2
31	BCMA / TNFRSF17	91	CXCR2 / IL-8 RB	151	FGF-19	211	I-309	271	IL-13
32	BD-1	92	CXCR3	152	FGF-20	212	ICAM-1	272	IL-13 R alpha 1
33	BDNF	93	CXCR4 (fusin)	153	FGF-21	213	ICAM-2	273	IL-13 R alpha 2
34	beta-Catenin	94	CXCR5 / BLR-1	154	FGF-23	214	ICAM-3 (CD50)	274	IL-15
35	beta-Defensin 2	95	CXCR6	155	FLRG	215	ICAM-5	275	IL-15 R alpha
36	beta-NGF	96	D6	156	Flt-3 Ligand	216	IFN-alpha / beta R1	276	IL-16
37	BIK	97	DAN	157	Follistatin	217	IFN-alpha / beta R2	277	IL-17
38	BLC / BCA-1 / CXCL13	98	DANCE	158	Follistatin-like 1	218	IFN-beta	278	IL-17B
39	BMP-2	99	DcR3 / TNFRSF8B	159	Fractalkine	219	IFN-gamma	279	IL-17B R
40	BMP-3	100	Decorin	160	Frizzled-1	220	IFN-gamma R1	280	IL-17C
41	BMP-3b / GDF-10	101	Dkk-1	161	Frizzled-3	221	IGFBP-1	281	IL-17D
42	BMP-4	102	Dkk-3	162	Frizzled-4	222	IGFBP-2	282	IL-17E
43	BMP-5	103	Dkk-4	163	Frizzled-5	223	IGFBP-3	283	IL-17F
44	BMP-6	104	DR3 / TNFRSF25	164	Frizzled-6	224	IGFBP-4	284	IL-17R
45	BMP-7	105	DR8 / TNFRSF21	165	Frizzled-7	225	IGFBP-6	285	IL-17RC
46	BMP-8	106	Dkk	166	Galectin-3	226	IGFBP-pp1 / IGFBP-7	286	Positivo 1b
47	BMP-15	107	EDA-A2	167	GASP-1 / WFIKKNRP	227	IGF-I	287	Positivo 2b
48	BMPR-IA / ALK-3	108	EDAR	168	GASP-2 / WFIKKN	228	IGF-I SR	288	Positivo 3b
49	BMPR-IB / ALK-6	109	EDG-1	169	GCP-2 / CXCL8	229	IGF-II	289	neg
50	BMPR-II	110	EGF	170	GCSF	230	IGF-II R	290	IL-17RD
51	BTC	111	EGF R / ErbB1	171	G-CSF R / CD 114	231	IL-1 alpha	291	IL-18 BPa
52	Cardiotrophin-1 / CT-1	112	EG-VEGF / PK1	172	GDF1	232	IL-1 beta	292	IL-18 R alpha / IL-1 R5
53	CCL14 / HCC-1 / HCC-3	113	EMAP-II	173	GDF3	233	IL-1 F5 / FIL1delta	293	IL-18 R beta / AcPL
54	CCL28 / VIC	114	ENA-7B	174	GDF5	234	IL-1 F8 / FIL1 epsilon	294	IL-19
55	CCR1	115	Endocan	175	GDF8	235	IL-1 F7 / FIL1 zeta	295	IL-20
56	CCR2	116	Endoglin / CD105	176	GDF9	236	IL-1 F8 / FIL1 eta	296	IL-20 R alpha
57	CCR3	117	Endostatin	177	GDF11	237	IL-1 F9 / IL-1 H1	297	IL-20 R beta
58	CCR4	118	Endothelin	178	GDF-15	238	IL-1 F10 / IL-1HY2	298	IL-21
59	CCR5	119	EN-RAGE	179	GDNF	239	IL-1 R3 / IL-1 R AcP	299	IL-21 R
60	CCR6	120	Eotaxin / CCL11	180	GFR alpha-1	240	IL-1 R4 / ST2	300	IL-22

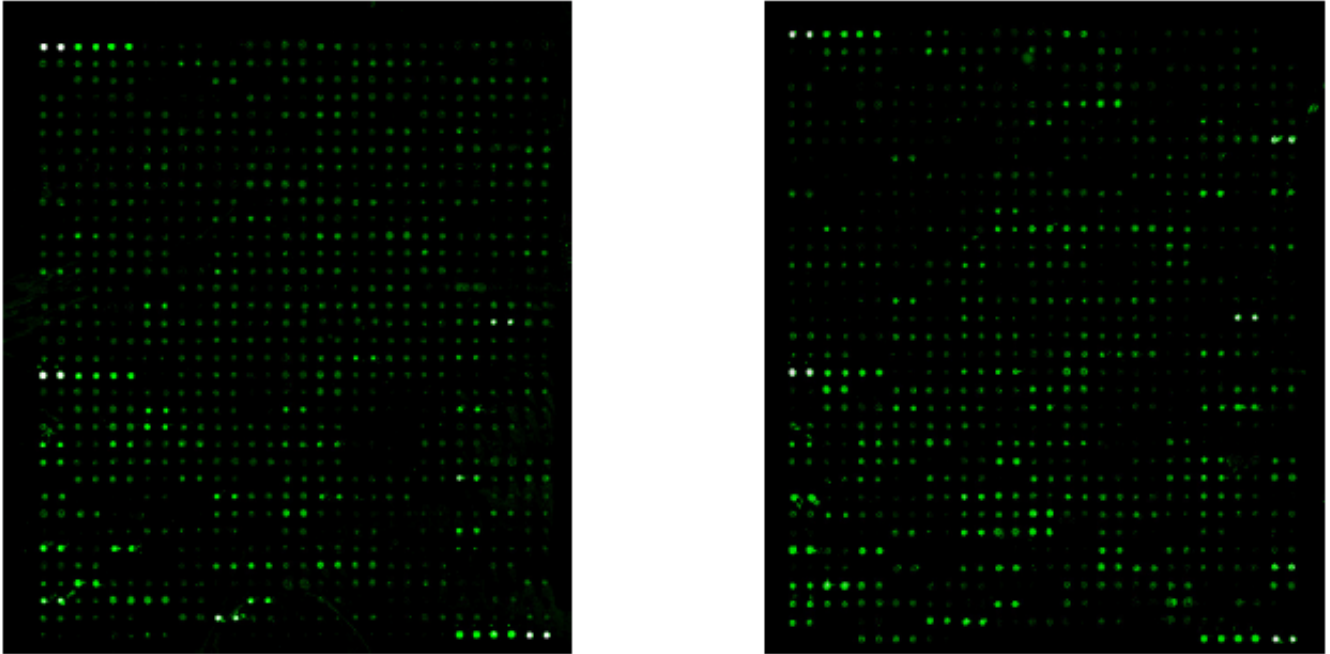
Number	Name	Number	Name	Number	Name	Number	Name
301	IL-22 BP	361	MMP-2	421	RANK / TNFRSF11A	481	TMEFF1 / Tomoregulin-1
302	IL-22 R	362	MMP-3	422	RANTES	482	TMEFF2
303	IL-23	363	MMP-7	423	RELM beta	483	TNF-alpha
304	IL-23 R	364	MMP-8	424	RELT / TNFRSF19L	484	TNF-beta
305	IL-24	365	MMP-9	425	ROBO4	485	TNF RI / TNFRSF1A
306	IL-26	366	MMP-10	426	S100 A8/A9	486	TNF RII / TNFRSF1B
307	IL-27	367	MMP-11 / Stromelysin-3	427	S100A10	487	TRADD
308	IL-28A	368	MMP-12	428	SAA	488	TRAIL / TNFSF10
309	IL-29	369	MMP-13	429	SCF	489	TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A
310	IL-31	370	MMP-14	430	SCF R / CD117	490	TRAIL R2 / DR5 / TNFRSF10B
311	IL-31 RA	371	MMP-15	431	SDF-1 / CXCL12	491	TRAIL R3 / TNFRSF10C
312	Inhibin A	372	MMP-16 / MT3-MMP	432	sFRP-1	492	TRAIL R4 / TNFRSF10D
313	Inhibin B	373	MMP-19	433	sFRP-3	493	TRANCE
314	Insulin	374	MMP-20	434	sFRP-4	494	TREM-1
315	Insulin R	375	MMP-24 / MT5-MMP	435	sgp130	495	TROY / TNFRSF19
316	Insulysin / IDE	376	MMP-25 / MT6-MMP	436	SIGIRR	496	TSG-6
317	IP-10	377	MSP alpha Chain	437	Siglec-5/CD170	497	TSLP R
318	I-TAC / CXCL11	378	Musk	438	Siglec-9	498	TWEAK / TNFSF12
319	Kininostatin / kininogen	379	NAP-2	439	SLPI	499	TWEAK R / TNFRSF12
320	Kremen-1	380	NCAM-1 / CD56	440	Smad 1	500	Ubiquitin+1
321	Kremen-2	381	Neuritin	441	Smad 4	501	uPA
322	Latent TGF-beta bp1	382	NeuroD1	442	Smad 5	502	uPAR
323	LBP	383	Neuropilin-2	443	Smad 7	503	Vasorin
324	Lck	384	Nurturin	444	Smad 8	504	VCAM-1 (CD106)
325	LECT2	385	NGF R	445	SMDF / NRG1 Isoform	505	VE-Cadherin
326	Lefty - A	386	Nidogen-1	446	Soggy-1	506	VEGF
327	Leptin (OB)	387	NOV / CCN3	447	Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)	507	VEGF R2 (KDR)
328	Leptin R	388	NrCAM	448	SPARC	508	VEGF R3
329	LFA-1 alpha	389	NRG1 Isoform GGF2	449	Spinasin	509	VEGF-B
330	LIF	390	NRG2	450	TACI / TNFRSF13B	510	VEGF-C
331	LIF R alpha	391	NRG3	451	Tarc	511	VEGF-D
332	LIGHT / TNFSF14	392	NT-3	452	TCCR / WSX-1	512	VEGI / TNFSF15
333	Lipocalin-1	393	NT-4	453	TECK / CCL25	513	WIF-1
334	Lipocalin-2	394	Orexin A	454	TFPI	514	WISP-1 / CCN4
335	LRP-1	395	Orexin B	455	TGF-alpha	515	XEDAR
336	LRP-6	396	OSM	456	TGF-beta 1	516	Neg
337	L-Selectin (CD62L)	397	Osteoactivin / GPNMB	457	TGF-beta 2	517	Neg
338	Lymphotactin / XCL1	398	Osteonin	458	TGF-beta 3	518	Neg
339	Lymphotoxin beta / TNFSF3	399	Osteoprotegerin / TNFRSF11B	459	TGF-beta 5	519	Neg
340	Lymphotoxin beta R / TNFRSF3	400	OX40 Ligand / TNFSF4	460	TGF-beta RI / ALK-5	520	Neg
341	MAC-1	401	PARC / CCL18	461	TGF-beta RII	521	Neg
342	MCP-1	402	PD-ECGF	462	TGF-beta RIIb	522	Neg
343	MCP-2	403	PDGF R alpha	463	TGF-beta RIII	523	P-3c
344	MCP-3	404	PDGF R beta	464	Thrombopoietin (TPO)	524	P-2c
345	MCP-4 / CCL13	405	PDGF-AA	465	Thrombospondin (TSP)	525	P-1c
346	M-CSF	406	PDGF-AB	466	Thrombospondin-1		
347	M-CSF R	407	PDGF-BB	467	Thrombospondin-2		
348	MDC	408	PDGF-C	468	Thrombospondin-4		
349	MFG-E8	409	PDGF-D	469	Thymopoietin		
350	MFRP	410	PECAM-1 / CD31	470	Tie-1		
351	MICA	411	Pentraxin3 / TSG-14	471	Tie-2		
352	MIF	412	Persephin	472	TIMP-1		
353	MIG	413	PF4 / CXCL4	473	TIMP-2		
354	MIP-1a	414	PIGF	474	TIMP-3		
355	MIP-1b	415	PLUNC	475	TIMP-4		
356	MIP-1d	416	Pre1	476	TL1A / TNFSF15		
357	MIP 2	417	Progranulin	477	TLR1		
358	MIP-3 alpha	418	Prolactin	478	TLR2		
359	MIP-3 beta	419	P-selectin	479	TLR3		
360	MMP-1	420	RAGE	480	TLR4		

TABLA 12: Proteínas incluidas en el microarray L-493

Number	Name	Number	Name	Number	Name	Number	Name	Number	Name
1	Positive-1a	61	ApoE3	121	Ceruloplasmin	181	EpCAM	241	GPR-39
2	Positive-2a	62	ApoD	122	CFHR2	182	EphA1	242	GPX1
3	Positive-3a	63	ApoM	123	Chemerin	183	EphA2	243	GPX3
4	Blank	64	ApoH	124	CHI3L1	184	EphA3	244	Pancreastatin
5	11b-HSD1	65	APP	125	Chromogranin A	185	EphA4	245	GRP
6	2B4	66	ASPH	126	Chymase	186	EphA5	246	GRP75
7	4-1BB	67	Attractin	127	cIAP-2	187	EphA6	247	GRP78
8	ABL1	68	B3GNT1	128	Ck beta 8-1	188	EphA7	248	GSR
9	ACE	69	BAF57	129	CK-MB	189	EphA8	249	GST
10	ACE-2	70	BAFF	130	Claudin-3	190	EphB1	250	HADHA
11	ACK1	71	BAI-1	131	Claudin-4	191	EphB2	251	HAI-1
12	ACPP	72	BCAM	132	CLEC3B	192	EphB3	252	HAI-2
13	ACTH	73	Beta 2M	133	Clusterin	193	EphB4	253	hCG alpha
14	ADAM-9	74	Beta Defensin 4	134	CNDP1	194	EphB6	254	hCGb
15	Neurokinin-A	75	Beta IG-H3	135	Factor XIII A	195	ERRa	255	Hck
16	ADAMTS-1	76	Bglycan	136	Factor XIII B	196	Erythropoietin R	256	HE4
17	ADAMTS-L2	77	BLAME	137	COCO	197	ESAM	257	Hemopexin
18	ADAMTS-4	78	BMP-9	138	C2	198	EV15L	258	Hepcidin
19	ADAMTS-5	79	BMX	139	C3a	199	EXTL2	259	HSP32
20	ADAMTS-10	80	BNIP2	140	C5/CSa	200	FABP1	260	HoxA10
21	ADAMTS-13	81	Btk	141	C7	201	FABP2	261	Haptoglobin
22	ADAMTS-15	82	ApoC1	142	C8B	202	FABP4	262	HSP10
23	ADAMTS-17	83	CA 9	143	C9	203	FAK	263	HSP20
24	ADAMTS-18	84	CA 15-3	144	Complement factor H	204	FAP	264	HSP27
25	ADAMTS-19	85	CA 19-9	145	Contactin-1	205	Fc RIB/C	265	HSP40
26	Adipsin	86	CA 125	146	Contactin-2	206	Fen 1	266	HSP60
27	Afamin	87	Cadherin-13	147	Corticosteroid-binding globulin	207	FER	267	HSP70
28	AFP	88	Calbindin	148	COX-2	208	Ferritin	268	HSP90
29	ALBUMIN	89	Calbindin D	149	C-peptide	209	Fetuin A	269	HSPA8
30	IL-36RN	90	Calcitonin	150	Creatinine	210	Fetuin B	270	HTRA2
31	Aldolase A	91	Calreticulin	151	CRP	211	FGFR1	271	IBSP
32	Aldolase B	92	Calsyntenin-1	152	CRTAM	212	FGFR1 alpha	272	IGF2BP1
33	Aldolase C	93	CPN2	153	CSH1	213	FGFR2	273	IGFBP-5
34	ALK	94	CART	154	gamma-Thrombin	214	Fibrinogen	274	IL-23p19
35	Alpha Lactalbumin	95	Caspase-3	155	CutA	215	Fibrinopeptide A	275	IL-33
36	Alpha 1 AG	96	Caspase-8	156	cTnT	216	Fibronectin	276	IL-34
37	A1BG	97	Cathepsin B	157	Cyclin D1	217	Ficolin-3	277	INSRR
38	A1M	98	Cathepsin D	158	Cystatin A	218	FIH	278	Integrin alpha V
39	A2M	99	Cathepsin L	159	Cystatin B	219	FOLR1	279	CD61
40	TPM1	100	Cathepsin S	160	Cystatin C	220	FOXN3	280	Itk
41	ALPP	101	CBP	161	Cytochrome C	221	FoxO1	281	ITM2B
42	pro-MMP13	102	CCK	162	Cytokeratin 8	222	FoxP3	282	Kallikrein 2
43	AMICA	103	CD23	163	Cytokeratin 18	223	FRK	283	ApoC3
44	AMPKa1	104	CD24	164	Cytokeratin 19	224	FSH	284	Kallikrein 5
45	Amylin	105	CD36	165	DBI	225	Furin	285	Kallikrein 6
46	ANGPTL3	106	CD38	166	DCBLD2	226	Fyn	286	Positive-1b
47	ANGPTL4	107	CD44	167	D-Dimer	227	GADD45A	287	Positive-2b
48	Annexin A7	108	CD45	168	DEFA1/3	228	Galectin-1	288	Positive-3b
49	APC	109	CD46	169	Defensin	229	Galectin-3BP	289	neg
50	APCS	110	CD47	170	Desmin	230	Galectin-7	290	Kallikrein 7
51	Apelin	111	CD55	171	DLL1	231	Gas1	291	Kallikrein 8
52	Apex1	112	CD59	172	DLL4	232	Gastrin	292	Kallikrein 10
53	APN	113	CD71	173	DMP-1	233	GATA-3	293	Kallikrein 11
54	ApoA1	114	CD74	174	DPPIV	234	GATA-4	294	Kallikrein 14
55	ApoA2	115	CD90	175	BNP	235	Gelsolin	295	KCC3
56	ApoA4	116	CD97	176	E-Cadherin	236	Ghrelin	296	KCTD10
57	ApoB	117	CD 79 alpha	177	Endorphin Beta	237	GLP-1	297	KIF3B
58	ApoC2	118	CD200	178	Endothelin Receptor A	238	GPI	298	KLF4
59	ApoB100	119	CEA	179	Enolase 2	239	GPBB	299	LAG-3
60	ApoE	120	CEACAM-1	180	ENPP2	240	GMNN	300	pro-Glucagon

Number	Name	Number	Name	Number	Name	Number	Name
301	Layilin	361	Pappalysin-1	421	S100A4	481	TRPC6
302	LDL R	362	Pancreatic Polypeptide	422	S100A6	482	TRPM7
303	Legumain	363	Presenilin 1	423	S100A8	483	Trypsin 1
304	LH	364	PARK7	424	S-100b	484	TSH
305	LIMPII	365	Visfatin	425	SART1	485	TSLP
306	LIN41	366	P-Cadherin	426	SART3	486	TXK
307	Uvin	367	PCAF	427	SCG3	487	Uromodulin
308	LOX-1	368	PD-1	428	Selenoprotein P	488	TFF1
309	LPS	369	PTH	429	SEMA3A	489	VDUP-1
310	LRG1	370	Troponin C	430	Serotonin	490	VEGF R1
311	LTF	371	PDX-1	431	Serpin A1	491	VEGF
312	LTK	372	PEDF	432	Serpin A12	492	VIP Receptor 2
313	Lumican	373	PEPSINOGEN I	433	Serpin A3	493	Vitamin D Receptor
314	Lyn	374	PEPSINOGEN II	434	Serpin A4	494	Vitamin D-BP
315	LYRIC	375	Vasopressin	435	Serpin A5	495	Vitamin K-dependent protein S
316	LYVE-1	376	PGRP-5	436	Serpin A8	496	Vitronectin
317	LZTS1	377	PI 16	437	Serpin A9	497	VWF
318	Mammaglobin A	378	PI 3Kinase p85 beta	438	Serpin B5	498	Wilms Tumor 1
319	Marapsin	379	PIM2	439	Serpin D1	499	XIAP
320	MATK	380	PKM2	440	Serpin I1	500	ZAG
321	MBL	381	Plasminogen	441	SERPING1	501	ZAP70
322	MBL-2	382	Podocalyxin	442	SERTAD2	502	Neg
323	Mer	383	POMC	443	SHBG	503	Neg
324	Mesothelin	384	PON1	444	SMAC	504	Neg
325	MICB	385	PON2	445	SNCG	505	Neg
326	Midkine	386	PPARg2	446	SSTR5	506	Neg
327	MINA	387	PPP2R5C	447	Somatotropin	507	Neg
328	FABP3	388	NR3C3	448	SOST	508	Positive-3c
329	MSHa	389	INSL3	449	SOX17	509	Positive-2c
330	MTUS1	390	Pro-BDNF	450	SOX2	510	Positive-1c
331	Myoglobin	391	Procalcitonin	451	SPARCL1		
332	NAIP	392	Pro-Cathepsin B	452	SPINK1		
333	Nanog	393	Thrombin	453	SRMS		
334	NELL2	394	Prohibitin	454	SSEA-1		
335	NEP	395	ProSAAS	455	SSEA-4		
336	Galanin	396	Prostasin	456	SSTR2		
337	Nesfatin	397	PSP	457	Survivin		
338	Nestin	398	Pro-MMP-7	458	SYK		
339	NET1	399	Pro-MMP-9	459	Syndecan-1		
340	Netrin G2	400	Protein p65	460	Syndecan-3		
341	Netrin-4	401	PSA-Free	461	TACE		
342	Neuropeptide Y	402	PSA-total	462	TAF4		
343	NF1	403	PTHLP	463	Tyk2		
344	NM23-H1/H2	404	PTN	464	Tec		
345	Presenilin 2	405	PTPRD	465	TFF3		
346	Notch-1	406	PYK2	466	Thrombomodulin		
347	NPTX1	407	PYY	467	Thymidine Kinase-1		
348	NPTXR	408	Ras	468	Thyroglobulin		
349	Progesterone	409	RBP4	469	TIM-1		
350	Ntn1	410	RECK	470	TNK1		
351	OCT3/4	411	RELM alpha	471	TOPORS		
352	Omentin	412	Resistin	472	TPA		
353	Osteocalcin	413	RET	473	TRA-1-60		
354	Osteopontin	414	RIP1	474	TRA-1-81		
355	OX40	415	ROCK1	475	Transferrin		
356	p21	416	ROCK2	476	Trappin-2		
357	p27	417	ROR1	477	TRKB		
358	p53	418	ROR2	478	TROPONIN I		
359	PAI-1	419	ROS	479	TYRO10		
360	PAK7	420	RYK	480	TRPC1		

Figura 19: Resultados típicos obtenibles con el L-507



Una vez que se han obtenido los datos de intensidad de señal fluorescente, se debe sustraer el ruido de fondo y normalizar los controles positivos antes de proceder a su análisis. El escáner de fluorescencia utilizado permite medir de forma automática el ruido de fondo alrededor de cada punto de interés. Para obtener los mejores resultados, se recomienda comparar las intensidades de señal representando la media de la intensidad del ruido menos el ruido de fondo local. Para normalizar la intensidad de señal, un subarray se define de forma arbitraria como referencia, y a partir de él se normaliza el resto. Para calcular los valores normalizados se utiliza la siguiente fórmula.

$$X(Ny) = X(y) * P1/P(y)$$

Dónde:

P_1 = intensidad de señal media de los puntos POS en el array de referencia

$P(y)$ = intensidad de señal media de los puntos POS en el array de "y"

$X(y)$ = intensidad de señal media para el punto "X" en array "y"

$X(Ny)$ = intensidad de señal normalizada para punto "X" en array "y"

Estas mediciones y cálculos se han realizado utilizando el software ofrecido por el mismo fabricante que el panel de microarrays, RayBio. Analysis Tool (RayBiotech Inc, Georgia, Estados Unidos).

Después de sustraer el ruido de fondo y normalizar, se puede proceder a comparar las intensidades de señal entre proteínas del mismo array y entre arrays diferentes para determinar las diferencias en los niveles de expresión entre los distintos grupos. Un incremento ≥ 1.5 veces o un decremento ≤ 0.65 veces para una proteína determinada se puede considerar medible y las diferencias de expresión significativas.

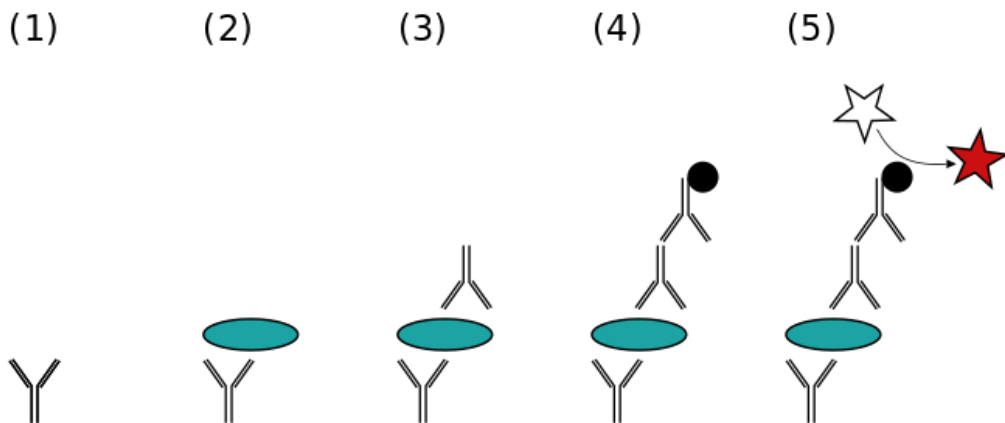
6. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

6.1 Introducción

El enzimoimmunoensayo o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) es un test bioquímico que permite identificar una sustancia de interés mediante la especificidad antígeno-anticuerpo y una reacción

enzimática que produce un cambio de coloración medible por espectrofotometría.

Figura 20: ELISA tipo sandwich



1) Se prepara la superficie del recipiente uniendo una cantidad conocida de anticuerpo que se queda adsorbido en la pared; 2) se añade la muestra y todo antígeno presente se une de forma específica al anticuerpo; 3) se une un segundo anticuerpo de detección que se une de forma específica al antígeno; 4) el anticuerpo secundario unido a la enzima se añade, uniéndose de forma específica al anticuerpo de detección; 5) se añade el sustrato enzimática que es convertido por la enzima en su forma detectable

El principio de ELISA para detectar en una muestra una cantidad desconocida de una proteína (antígeno) requiere su inmovilización en un soporte sólido (como por ejemplo una placa de microtitulación de poliestireno) de forma no específica (adsorción a la superficie) o específica (mediante la captura por otro anticuerpo específico del mismo antígeno en un ELISA tipo sándwich que es el que vamos a realizar. Una vez el antígeno está inmovilizado, se añade el anticuerpo detector que forma un complejo con el antígeno. Este segundo anticuerpo va ligado de forma covalente a una enzima (o

podría ser detectado por un tercer anticuerpo ligado a la enzima o contiene una molécula a la que se puede unir la enzima). Entre cada paso, la placa o pocillos es lavada con una solución detergente suave que permite eliminar todas aquellas proteínas o anticuerpos que no han sido unidos específicamente y queden adsorbidas a la superficie del tubo/pocillo. Después del último lavado, a la placa se le une el sustrato enzimático que produce una señal visible y cuantificable proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra³⁰⁹⁻³¹⁰.

El ELISA permite realizar otra forma de ensayos de unión a ligando diferente al antígeno-anticuerpo, (por ejemplo moléculas que sean sustrato específico de determinadas enzimas) aunque por historia y tradición se les sigue denominado de forma genérica inmunoensayos.

La lectura cuantitativa de la muestra de interés se realiza basándose en la detección de la intensidad de la señal de luz mediante espectrofotometría, lo que requiere la transmisión de haz de luz de una determinada longitud de onda a través de la pared del tubo/cubeta de ensayo o del fondo del pocillo. El sustrato enzimático presente en el recipiente y que halla en cantidad proporcional a la molécula de interés, absorbe una cantidad de la luz emitida por lo que la que llega al detector es proporcional a la concentración del sustrato.

Para cada una de las proteínas que deseamos medir en el suero de los pacientes con HP se ha adquirido un kit comercial ELISA cuyo material y protocolo de ensayo se explican a continuación.

6.2 Material necesario

El producto comercial proporciona los anticuerpos de captura y detección para unión específica al antígeno de interés, los estándares para poder hacer la curva patrón y los componentes de la reacción enzimática (enzima y sustrato).

- Anticuerpo de captura.
- Anticuerpo de detección biotinilado.
- Peroxidasa de rábano conjugada con avidina
- ABTS: 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).
- Estándares.

Adicionalmente se requiere:

- Placa de pocillos de ELISA
- KCl, NaCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y ddH_2O
- Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Tween-20, Albúmina bovina sérica
- Adhesivo plástico (film)
- Agitador.
- Tubo de ensayo
- Vórtex
- Pipetas, puntas de pipeta y otros consumibles de laboratorio
- Espectrofotómetro de placas de pocillos.

6.3 Protocolo

Es necesario preparar una serie de soluciones antes de comenzar con el ensayo.

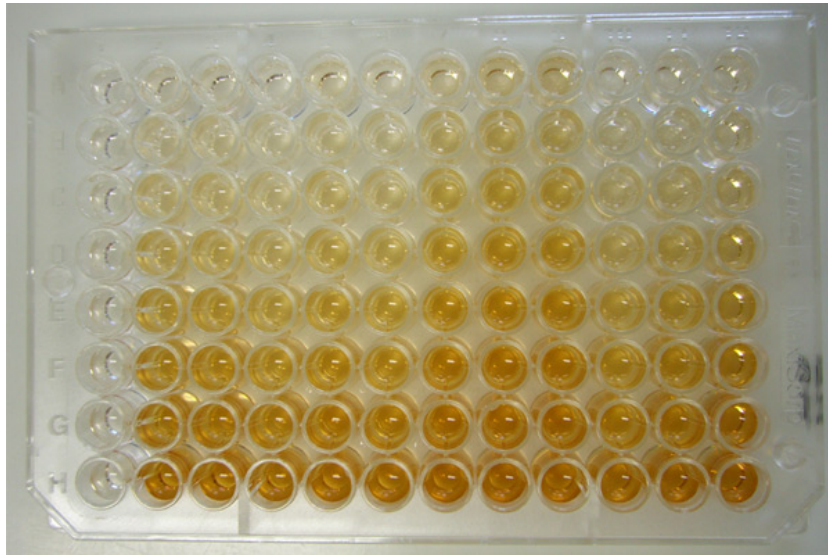
1. Para preparar el tampón de tapizado se diluye 8,4 g de NaHCO_3 y 3,56 g de Na_2CO_3 en 1000 ml de ddH_2O ajustando el pH a 9,5 con NaOH 1M.
2. Para preparar el tampón fosfato salino se diluyen 2,0 g de KCl , 80,0 g de NaCl , 2,4 g de KH_2PO_4 y 14,4 g de Na_2HPO_4 en 10000 ml de ddH_2O . Para ajustar el pH a 7,2 se añade HCl 1M.
3. Para preparar la solución Tween/PBS se añaden 0,5 ml de Tween-20 en 1L de PBS.
4. Para preparar la solución de bloqueo, se diluye albúmina bovina sérica (BSA) en PBS para una concentración del 1%.
5. Para preparar la solución de sustrato se diluyen 150 mg 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) en 500 ml de ácido cítrico 0,1M en ddH_2O , ajustando el pH a 4,35 con NaOH 1M. Almacenar a -2°C evitando la exposición a la luz.
6. Para preparar la solución de bloqueo de ABTS se combinan 50 ml de dimetilformamida con 50 ml de ddH_2O y se añaden 20 mg de dodecil sulfato sódico.

El primer paso del ensayo consiste en el tapizado de los pocillos de la placa de ELISA con el anticuerpo de captura.

7. Se diluye el anticuerpo de captura en tampón de tapizado para una concentración final de 0.5-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se transfieren 100 μl a cada pocillo de la placa de ELISA. Se sella la placa con *film* adhesivo plástico para prevenir la evaporación y se deja incubar durante la noche a 4° .

8. Se vuelve a llevar la placa a temperatura ambiente y se decanta el contenido de los pocillos. Se lava 3 veces con Tween/PBS agitando suavemente (5 minutos cada lavado).
9. Se bloquean los sitios de unión no específicos mediante la adición del 200 μ l de tampón de bloqueo a cada pocillo. Se sella la placa y se deja incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
10. Se decanta el contenido de los pocillos y se lava 3 veces con Tween/PBS agitando suavemente (5 minutos cada lavado). Eliminar las gotas que puedan haber quedado en los pocillos golpeando la placa sobre papel de secado.

Figura 21: Placa de pocillos de ELISA



A continuación ,se añade la muestra de interés y el anticuerpo de detección. Las muestras previamente han sido diluidas en tampón de

bloqueo en una placa de pocillos diferente para llevarla a una concentración preestablecida de 1:5.

11. Se añaden 100 μ l de muestra a cada pocillo. Añadir también 100 μ l de estándares a los pocillos correspondientes y un pocillo si muestra que será el blanco. Los estándares para construir la curva patrón se realizan por duplicado en cada placa. Se sella la placa y se deja incubar a temperatura ambiente durante 2-4 horas o durante toda la noche a 4°C.
12. Se decanta el contenido de los pocillos y se lava 3 veces con Tween/PBS agitando suavemente (5 minutos cada lavado). Eliminar las gotas que puedan haber quedado en los pocillos golpeando la placa sobre papel de secado.
13. Se diluye el anticuerpo de detección (biotinilado) en tampón de bloqueo para una concentración final de 0.25-2 μ g/ml y se transfieren 100 μ l a cada pocillo de la placa de ELISA. Se sella la placa y se deja incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
14. Se decanta el contenido de los pocillos y se lava 3 veces con Tween/PBS agitando suavemente (5 minutos cada lavado). Eliminar las gotas que puedan haber quedado en los pocillos golpeando la placa sobre papel de secado.

A continuación, se añade la enzima que catalizará la reacción colorimétrica a los pocillos y una vez incorporada a los complejos antígeno-anticuerpo de los pocillos se añadirá su substrato.

15. Se diluye la enzima conjugada (peroxidasa de rábano) con avidina diluida en tampón de bloqueo a su concentración

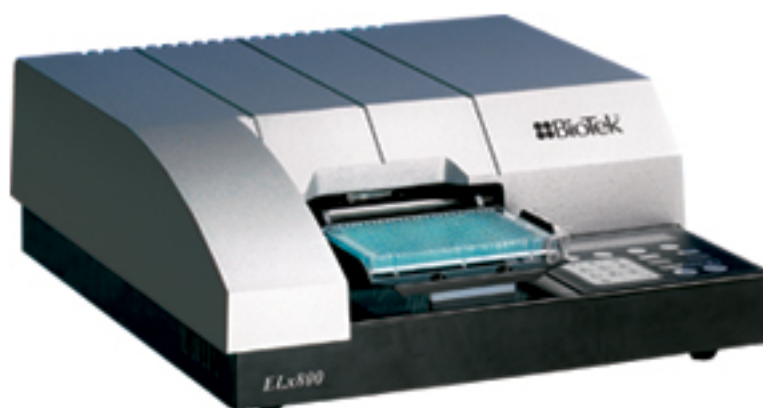
predeterminada óptima (en torno a 1/1000 y se transfieren 100 µl a cada pocillo de la placa de ELISA. Se sella la placa y se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La avidina se unirá a la biotina del anticuerpo de detección.

16. Se decanta el contenido de los pocillos y se lava 5 veces con Tween/PBS agitando suavemente (5 minutos cada lavado). Eliminar las gotas que puedan haber quedado en los pocillos golpeando la placa sobre papel de secado.
17. Descongelar la solución de sustrato de ABTS en los 20 minutos previos a su utilización (no antes). Verter 11 mL a un tubo de ensayo y añadir 11 µl de H₂O₂ al 30%. Mezclar en vórtex e inmediatamente dispensar 100 µl a cada pocillo de la placa de ELISA. Se sella la placa y se deja incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos para que aparezca el revelado de color verde. Para parar la reacción colorimétrica se añade a cada pocillo 50 µl de solución de bloqueo ABTS.
18. Leer la densidad óptica a 405 nm mediante un espectrofotómetro de placas.

Algunos kits comerciales utilizan TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) como sustrato de la peroxidasa cuyo producto coloreado se puede leer su densidad óptica a 450 nm. Esta reacción se para añadiendo un volumen idéntico de 2 M H₂SO₄.

Otros kits utilizan como enzima la enzima fosfatasa alcalina. Para esa enzima su sustrato es pNPP (p-Nitrofenil-fosfato) que adopta una coloración amarillenta y puede ser medido a 405 nm después de 15-30 minutos de incubación a temperatura ambiente. La reacción puede pararse añadiendo un volumen igual al añadido de sustrato de NaOH 0,75M. Cabe recordar que tejidos como el alveolar tienen mucha actividad endógena de fosfatasa alcalina, por lo que sería necesario bloquear las muestras con levamisol antes de realizar el ELISA.

Figura 22: Espectrofotómetro ELx800



Por último, algunos de los kits utilizan un anticuerpo secundario que va unido covalentemente al enzima que será el que se una al anticuerpo de detección.

La lectura de densidades ópticas se realiza con un espectrofotómetro ELx800 de Biotek (BioTek, Winoosky, Vermont, Estados Unidos). Para interpretar los datos es necesario preparar una curva patrón a partir de los datos obtenidos en las diluciones seriadas de estándares (proteína a concentraciones previamente conocidas). La curva se construye con las concentraciones en el eje de la X (escala logarítmica) y la absorbancia en el eje de la Y (linear). La concentración de cada muestra se interpola desde esta curva patrón.

7 Análisis estadístico:

Los valores de todos los datos obtenidos en el estudio propuesto, se almacenaron y se analizaron empleando el software Paquete Estadístico para Ciencias Sociales SPSS 21.0® (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

El análisis estadístico consistió, de forma inicial, en un estudio descriptivo general de los resultados obtenidos en todas las variables incluidas. Los resultados se expresaron en media \pm desviación estándar en las variables continuas (o mediana y rango si la distribución no es normal) y porcentajes en las variables cualitativas.

Debido al elevado número de variables incluidas, el estudio estadístico se realizó siguiendo las cuestiones sugeridas en los objetivos del proyecto.

Objetivo primario: *“Valorar la presencia de diferencias entre los niveles de biomarcadores agrupados según su perfil hemodinámico”*

Con este objetivo se dividieron los pacientes en los distintos grupos según los valores de PAPm y PCP obtenidos en el CCD, así como su respuesta al test vasodilatador. Una vez categorizados, se estudió la relación existente entre las proteínas analizadas y los distintos grupos. Para comparar medias entre los grupos (pacientes sin HP, poscapilar o precapilar) se utilizaron la t-Student/ANOVA según el número de grupos en cada una de las diferentes comparaciones. Las variables continuas que no se distribuyeron normalmente fueron comparadas mediante el test U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Objetivo primario: *“Valorar las diferencias entre grupos según la presencia o no de componente precapilar en función de las dos definiciones hemodinámicas aceptadas actualmente; por GTP o por DPD.”*

Con este objetivo se dividieron los pacientes con HP en dos grupos (poscapilar y mixta) según los valores de GTP o DPD obtenidos en el CCD. Una vez categorizados, se estudió la relación existente entre las proteínas analizadas y los distintos grupos. Para comparar medias entre los grupos se utilizó la t-Student. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Objetivo secundario: *Estudio comparativo entre los niveles de las proteínas estudiadas y la presencia de disfunción ventricular derecha valorada por ecocardiografía.*

Para este tipo de análisis entra la función del ventrículo derecho y los valores de las proteínas estudiadas, hemos utilizado un parámetro

cualitativo (disfunción significativa sí o no). Se realizó una comparación de medias aplicando t-Student..

Objetivo secundario: *Estudiar de forma comparativa los niveles de las proteínas analizadas y su relación con todos los objetivos enunciados en los dos grupos de pacientes más numerosos de la muestra: pacientes con miocardiopatía dilatada y pacientes con miocardiopatía isquémica.*

Para este objetivo se seleccionaron de la muestra completa dos subgrupos, el de pacientes con MCD, y el de pacientes con MCI, y se realizaron para cada uno de ellos toda la serie de análisis efectuados a la muestra completa (niveles de biomarcadores según perfil hemodinámico, presencia de componente precapilar, presencia de disfunción ventricular derecha, correlaciones con parámetros hemodinámicos, valor pronóstico y realización de curvas COR). Se utilizaron los mismos tests estadísticos para cada una de las comparaciones que en la muestra completa, sin embargo, al ser la N más pequeña se utilizó con más frecuencia tests no paramétricos.

Objetivo secundario: *“Análisis de correlación entre el gasto/índice cardíaco, presiones (sistólica, diastólica, media, capilar pulmonar, gradiente transpulmonar y resistencias arteriales pulmonares) y los valores de las proteínas estudiadas”*

Para este tipo de análisis entre variables hemodinámicas cuantitativas y concentraciones de proteínas cuantitativas se utilizó la regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson. En caso de que las variables continuas no se distribuyeran normalmente se

utilizó la Rho de Spearman. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Objetivo secundario: *Análisis del valor pronóstico de las distintas proteínas estudiadas, su relación con la probabilidad de desarrollar el evento muerte/trasplante cardiaco en la evolución.*

Como se trata de una variable cuantitativa dicotómica (muerte/trasplante si o no) y se comparó con los valores cuantitativos de las diferentes proteínas realizamos el test de t-student. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Objetivo secundario: *Realización de curvas ROC y estimación de puntos de corte para cada uno de los objetivos enunciados.*

Para aquellas proteínas para las que se alcanzó una significación estadística se realizaron curvas ROC para valorar el punto de corte de concentración de proteína que mayor sensibilidad y especificidad obtenía para predecir la presencia de HP, componente precapilar y disfunción del VD.

Objetivo secundario: *Identificación de variables predictoras de hipertensión pulmonar, componente precapilar y disfunción ventricular derecha.*

Realización de un análisis multivariante mediante regresión lineal binaria, considerando aquellas variables antropométricas, ecocardiográficas y analíticas con resultados más relevantes relevantes en los análisis previos realizados.

8 Limitaciones del estudio

El principal factor que condiciona la duración del estudio fue la obtención de las muestras, ya que aunque la HP de causa izquierda es una comorbilidad relativamente frecuente en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada, actualmente no existe una terapia específica para esta condición. Esto implica que no se realicen de forma rutinaria estudios hemodinámicos para la correcta evaluación de la HP.

A pesar de esta limitación, consideramos que el proyecto era totalmente viable, pues nuestro hospital es centro de referencia para pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada y la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco del hospital La Fe realiza unos 50 estudios pre trasplante cardíaco al año (todo ellos suelen tener HPCI y se hace a todos ellos un CCD). Además, el cateterismo derecho es un procedimiento cada vez más frecuente antes de una cirugía valvular (y nuestro hospital también es centro de referencia de esta patología).

Quizá la mayor limitación de nuestro estudio fue que la población estudiada no represente homogéneamente a todo el espectro de la HPCI, sino que haya una mayor proporción de casos más graves debido a una cardiopatía de base más evolucionada al ser nuestro hospital centro terciario de referencia, y ser los pacientes remitidos en fases avanzadas de la enfermedad. Así, por ejemplo, hay un número elevado de pacientes con cardiopatía isquémica o miocardiopatía dilatada con insuficiencia cardíaca avanzada, que han sido valorados para trasplante, así como de pacientes con

valvulopatías severas que van a ser intervenidos. Por otra parte, tenemos una muy baja representación de formas leves y de ICFEVI-p, ya que pese a ser muy prevalentes, no se remiten a nuestro centro, por un lado por carecer de un tratamiento efectivo y por otro por no realizar CCD de rutina a estos pacientes.

9 Aspectos éticos

En la realización del estudio se respetaron los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y a la biomedicina, en la Declaración Universal de la UNESCO sobre genoma humano y derechos humanos, así como cumplir los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica y bioética.

El estudio incluyó un modelo de consentimiento informado que el paciente tuvo que leer y firmar antes de ser incluido. El presente trabajo no incluyó en ningún caso cambios en el tratamiento ni en las recomendaciones generales dadas habitualmente a los pacientes trasplantados cardiacos. La inclusión en el mismo no supuso ningún tipo de ventaja ni desventaja en comparación con los enfermos no incluidos.

V. RESULTADOS

1. Características generales de la muestra

1.1. Inclusión de pacientes

El periodo de inclusión de pacientes en el estudio comenzó el primer día de marzo de 2012 y concluyó el último día de junio de 2014. En estos 27 meses se ofreció la participación en el estudio a un total de 113 pacientes a los que se había realizado un CCD en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

De estos 113 pacientes, se excluyeron del estudio 34 por los siguientes motivos:

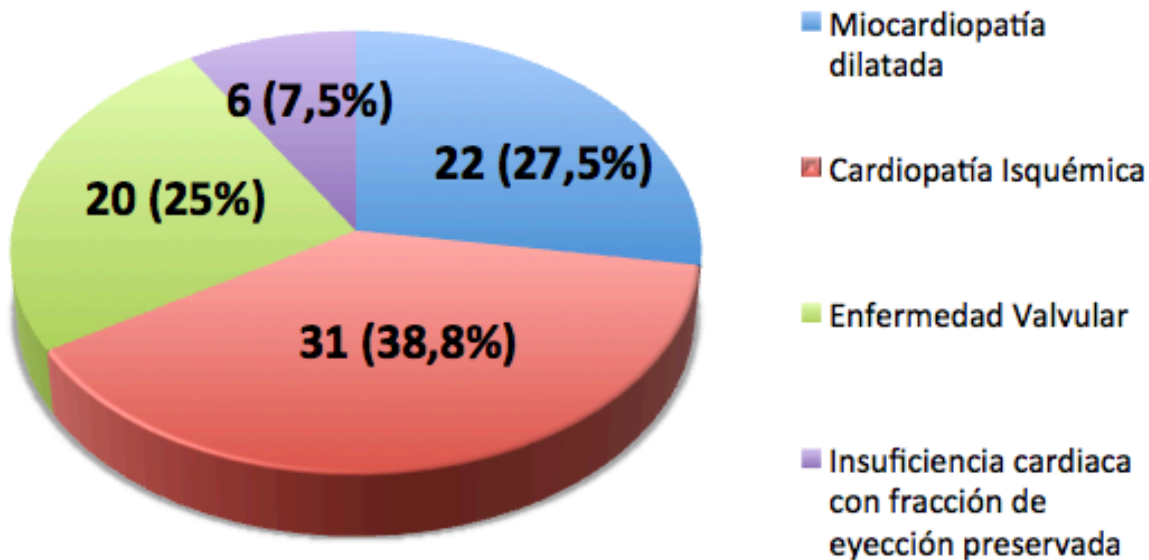
- a) Rechazo a participar en el estudio: 12 pacientes.
- b) Complicación durante el procedimiento que impidió completarlo: 3 pacientes.
- c) Medidas hemodinámicas incompletas o no válidas: 8 pacientes.
- d) Coexistencia de otras causas de hipertensión pulmonar diferentes al grupo 2: 11 pacientes.

Así pues, un total de 79 pacientes fueron finalmente incluidos en el estudio. Se realizó seguimiento clínico de los pacientes a los 12 meses del CCD para comprobar el estado vital y si había recibido un trasplante cardiaco. Puesto que no fue necesario realizar ninguna prueba adicional, no hubo pérdidas en el seguimiento y de todos los pacientes se pudo contrastar su situación clínica al año, bien a través de la historia clínica, bien a través de contacto telefónico si no había datos recientes en la misma.

1.2. Características de los pacientes

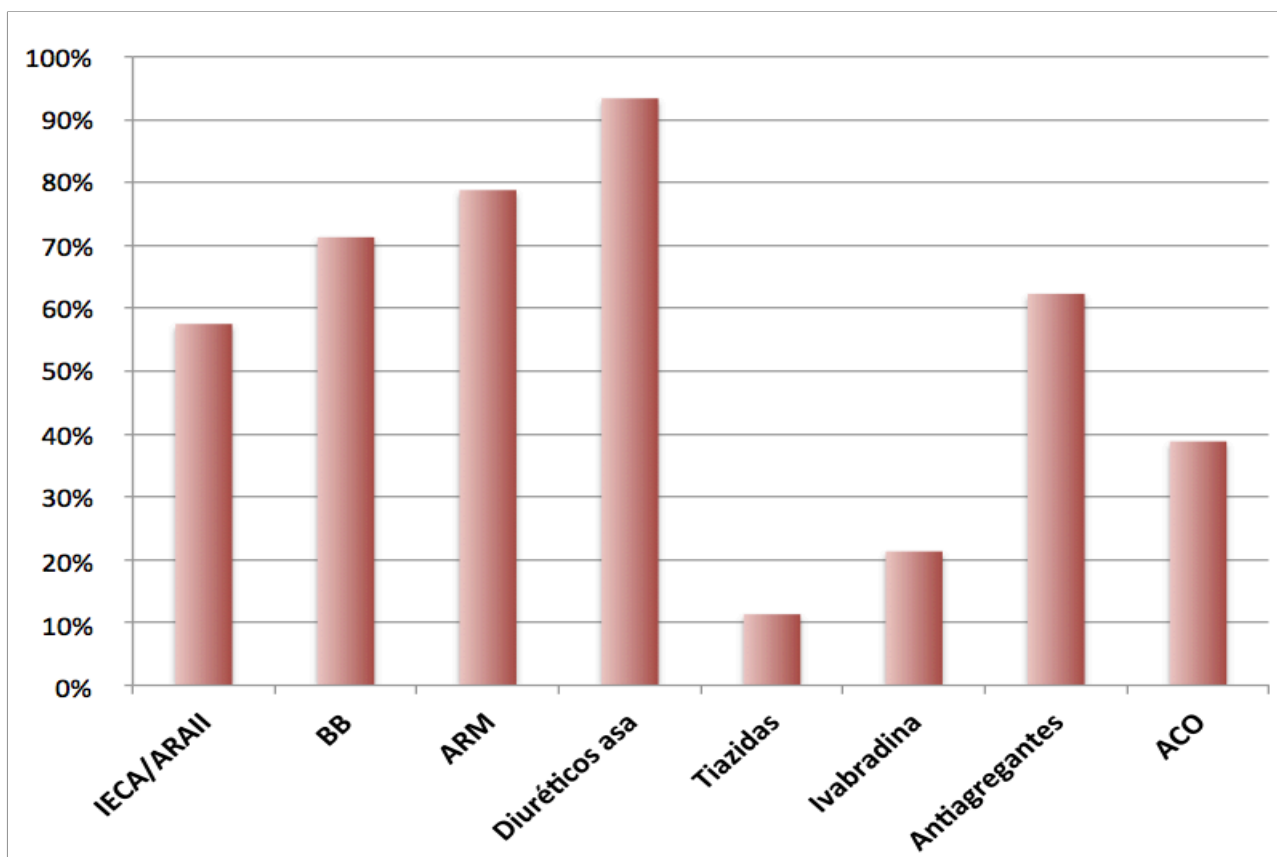
La muestra estuvo formada por 50 hombres (63,3%) y 29 mujeres (36,7%). La edad media en el momento de la realización del CCD fue de 60 ± 10 años, con un índice de masa corporal de $25,4 \pm 4,1$ kg/m². En cuanto a la etiología de la cardiopatía subyacente a la HP, la más frecuente fue la cardiopatía isquémica (38,8%), seguida de la miocardiopatía dilatada idiopática (27,5%). El resto de etiologías se encuentran representadas en la figura 23.

Figura 23: Representación gráfica de las etiologías de los pacientes incluidos en el estudio



En lo referente al estado funcional en el momento de la realización del CCD, 21 pacientes (26,3%) se encontraban en clase funcional IIIA de la NYHA, 33 (41,3%) se encontraba en clase IIIB, mientras que 11 (13,8%) presentaban un deterioro funcional aún mayor (IV). Únicamente 14 pacientes (17,6%) que se sometieron a un CCD se encontraban en clase funcional II.

Figura 24: Distribución de los distintos tratamientos por grupos terapéuticos de los pacientes incluidos en el estudio



IECA/ARAI: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensinógeno/ antagonistas del receptor de la angiotensina; BB: betabloqueantes; ARM: antagonistas del receptor mineralcorticoide; ACO: anticoagulantes orales

Con respecto al tratamiento médico que tenían prescrito los pacientes en el momento de la realización del CCD, el porcentaje de pacientes que recibía cada uno de los siguientes grupos terapéuticos (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensinógeno/ antagonistas del receptor de la angiotensina, betabloqueantes, antagonistas del receptor mineralcorticoide, diuréticos de asa, tiazidas, ivabradina, antiagregantes o anticoagulantes orales) queda detallado en la figura 24.

En cuanto a los principales FRCV, un 34,1% de los pacientes era hipertenso, un 21,3% era diabético, un 46,8% presentaba algún tipo de dislipemia y un 30,3% presentaba o había presentado hábito tabáquico.

Un 45% de los pacientes era portador de dispositivos implantables (DAI o DAI-TRC), mientras que sólo un 2,5% de los pacientes era portador de marcapasos convencional definitivo.

En relación al ritmo cardiaco, un 59,8% de los pacientes se encontraba en ritmo sinusal, un 7,6% de los pacientes se encontraba en ritmo estimulado, mientras que el 31,6% restante se encontraba bajo una taquiarritmia auricular (fibrilación o flutter auricular). Un 58,4% de los pacientes presentaba un QRS estrecho (<120 ms), mientras que el 41,6% presentaba algún tipo de bloqueo de la conducción intraventricular: 20% bloqueo de rama derecha; 17,7% bloqueo de rama izquierda.

Los parámetros ecocardiográficos más reseñables de la muestra quedan recogidos en la tabla 13

TABLA 13: Parámetros ecocardiográficos más relevantes de los pacientes incluidos en el estudio

Diámetro telediastólico del VI (mm)	59,5 ± 13,8
Diámetro telesistólico del VI (mm)	48,4 ± 18,4
FEVI (%)	36,7 ± 19,1
Disfunción VI (FEVI < 40%) (%)	55,1
Disfunción diastólica (grado II y superior) (%)	63,8
Diámetro basal del VD (mm)	48,4 ± 8,1
Disfunción significativa VD (%)	44,3
PsAP estimada por chorro de IT (mmHg)	55,9 ± 18,8
IM significativa (moderada o severa) (%)	40
EM significativa (moderada o severa) (%)	8,8
EAO significativa (moderada o severa) (%)	3,8
IAo significativa (moderada o severa) (%)	5,0
IT significativa (moderada o severa) (%)	58,8
VI: ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho; PsAP: presión sistólica de arteria pulmonar; IM: insuficiencia mitral; EM: estenosis mitral; EAO: estenosis aórtica; IAo: insuficiencia aórtica; IT: insuficiencia tricuspídea.	

Referente a los parámetros sanguíneos estudiados en la analítica de sangre periférica que fue extraída durante el mismo ingreso en el que se realizó el CCD, la tabla 14 recoge aquellos datos más relevantes.

TABLA 14: Parámetros analíticos más relevantes de los pacientes incluidos en el estudio

Creatinina (mg/dl)	1,05 ± 0,48
Sodio (mEq/L)	135 ± 14
AST (UI/L)	32,9 ± 34,5
Bilirrubina (mg/dl)	1,43 ± 0,76
Ácido úrico (mg/dl)	63,8
Colesterol LDL (mg/dl)	81,9 ± 34,15
Hemoglobina glicosilada (%)	6,28 ± 0,72
NT-pro BNP (pg/ml)	6103 ± 7862
Troponina T ultrasensible (ng/L)	73,5 ± 141,6
Hemoglobina (g/dl)	12,8 ± 2,1
Plaquetas (x10 ³ /ml)	207,3 ± 72,6
AST: aspartato transferasa; LDL: low density lipoprotein; NT-proBNP: fragmento N terminal del propéptido natriurético cerebral	

A los 79 pacientes incluidos se les realizó un CCD. En función de los resultados obtenidos, fueron clasificados en los diferentes grupos hemodinámicos:

- 17 pacientes mostraron ausencia de HP al tener una PAPm menor de 25 mmHg,
- 30 pacientes presentaron una HP poscapilar, al ser el GTP menor a 12 mmHg,
- Otros 32 pacientes presentaron componente precapilar, con un GTP \geq 12 mmHg. Se les denominó HP mixta.
- A estos 32 pacientes se les realizó un test vasodilatador pulmonar, 19 de ellos mostraron una respuesta positiva a la inhalación de

NO, con una reducción de las RVP por debajo de 3 UW y se clasificaron como HP mixta reversible, mientras que otros 13 no presentaron respuesta al NO y las RVP permanecieron por encima de 3 UW y se clasificaron como HP mixta irreversible.

A los 12 meses de la realización del CCD, un 51,2% de los pacientes había sido trasplantado o había fallecido, por lo que la supervivencia de la muestra a ese tiempo fue de tan sólo un 48,8%.

2. Comparación de las características basales entre los distintos grupos según su perfil hemodinámico.

2.1. Comparación entre los 4 grupos

Como hemos comentado anteriormente, en función de los datos hemodinámicos objetivados durante el CCD, los pacientes se dividieron en 4 grupos: sin HP (NHP), HP poscapilar (HPP), HP mixta reversible (HPMR) y HP mixta irreversible (HPMI).

La tabla 15 recoge la comparación de las características demográficas, electrocardiográficas, ecocardiográficas, analíticas y hemodinámicas entre los 4 grupos.

TABLA 15: Comparación de las características basales entre los 4 grupos hemodinámicos del estudio (ANOVA)

	NHP	HPP	HPMR	HPMI	p
N	17	30	19	13	
Edad (años)	58 ± 10	62 ± 6	63 ± 10	55 ± 14	0,63
Hombres (%)	47,1	76,7	68,4	46,2	0,11
IMC (kg/m ²)	24,5 ± 4,2	24,1 ± 3,2	27,01 ± 3,6	27,2 ± 5,5	0,22
Clase NYHA IIIB/IV (%)	29,4	56,6	61,1	76,9	0,02*
C. Isquémica (%)	35,3	36,7	57,9	23,1	0,23
MCD (%)	23,5	33,3	21,1	30,8	0,78
Muerte o TC (%)	23,5	53,3	72,2	66,7	0,02*
Ritmo sinusal (%)	64,7	40	63,2	76,9	0,97
QRSd (ms)	108 ± 30	130 ± 39	110,1 ± 27,4	128,0 ± 31,6	0,76
DTDVI (mm)	49,7 ± 9,1	60,5 ± 14,6	63,1 ± 11,3	62,1 ± 15,9	0,37
DTSVI (mm)	35,7 ± 8,8	48,9 ± 18,5	50,0 ± 16,5	50,2 ± 19,2	0,12
FEVI (%)	46,5 ± 15,5	34,2 ± 18,9	32,8 ± 19,1	36,5 ± 21,4	0,13
Disfunción VI (FEVI < 40%) (%)	31,3	63,3	63,2	56,8	0,12
Llenado VI patológico (%)	31,2	80,1	92,3	84,6	<0,001*
Diámetro basal del VD (mm)	39,4 ± 8,8	48,4 ± 8,6	48,3 ± 7,7	47,4 ± 7,5	0,96
Disfunción significativa VD (%)	23,5	36,6	57,9	69,3	0,04*
PsAP estimada chorro de IT (mmHg)	40,3 ± 8,7	52,5 ± 14,4	64,6 ± 22,6	67,6 ± 15,8	<0,001*
IM significativa (%)	23,5	40	63,2	30,8	0,08
EM significativa (%)	0	13,3	5,3	15,4	0,34
EAO significativa (%)	0	0	10,5	7,7	0,19
IAo significativa (%)	0	3,3	0	15,4	0,26
IT significativa (%)	41,2	66,7	68,4	53,8	0,24
Creatinina (mg/dl)	0,92 ± 0,3	1,16 ± 0,7	0,98 ± 0,31	0,97 ± 0,30	0,47
Sodio (mEq/L)	138,8 ± 3	138,1 ± 2,2	135 ± 4,1	134,1 ± 10,2	0,08

	NHP	HPP	HPMR	HPMI	p
AST (UI/L)	27,6 ± 17,8	34,2 ± 25,9	39,5 ± 56,9	27,2 ± 25,7	0,69
Bilirrubina (mg/dl)	1,01 ± 0,6	1,32 ± 0,45	2,1 ± 1,04	1,22 ± 0,49	<0,001*
Ácido úrico (mg/dl)	7,5 ± 2,9	7,1 ± 3,1	8,3 ± 1,8	7,8 ± 3,7	0,66
Colesterol LDL (mg/dl)	101 ± 48	83 ± 30	65 ± 22	75 ± 24	0,03*
Hemoglobina glicosilada (%)	6,3 ± 0,8	6,3 ± 0,6	6,4 ± 0,7	6,1 ± 0,76	0,54
NT-pro BNP (pg/ml)	2409±2863	5821±7368	5619±4676	10384±1266	0,15
Troponina T us (ng/L)	38,2 ± 41,1	86,8 ± 175	38,1 ± 19,1	125,5± 202,7	0,47
Hemoglobina (g/dl)	13,8 ± 1,9	12,7 ± 1,5	12,8 ± 2,2	11,9 ± 2,6	0,09
Plaquetas (x10 ³ /ml)	213 ± 61	209 ± 75	207 ± 70	193 ± 88	0,90
Presión AD (mmHg)	9,3 ± 4,4	15,4 ± 6,6	15,8 ± 5,8	18,4 ± 5,5	0,01*
PsAP (mmHg)	33,5 ± 7,3	51,8 ± 14,8	67,9 ± 18,3	80,4 ± 19,6	<0,001*
PdAP (mmHg)	12,1 ± 3,1	24,4 ± 4,3	32,4 ± 5,8	35,0 ± 7,7	<0,001*
PAPm (mmHg)	21,3 ± 2,3	35,3 ± 5,6	46,3 ± 6,4	52,4 ± 10,6	<0,001*
PCP (mmHg)	15,6 ± 1,1	24,9 ± 4,4	27,1 ± 5,6	26,7 ± 6,5	<0,001*
GTP (mmHg)	5,7 ± 2,1	10,3 ± 2,1	19,3 ± 5,2	25,7 ± 6,5	<0,001*
DPD (mmHg)	-3 ± 2,6	-0,17 ± 2,6	5,3 ± 2,5	8,4 ± 4,35	<0,001*
GC (L/min)	4,2 ± 0,9	3,8 ± 0,85	3,5 ± 0,95	3,4 ± 0,7	0,52
IC (L/min/m ²)	2,2 ± 0,55	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,4	0,19
RVP (UW)	1,75 ± 0,73	3,44 ± 1,31	5,87 ± 1,83	7,93 ± 3,05	<0,001*

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible; IMC: índice de masa corporal; MCD: miocardiopatía dilatada; TC: trasplante cardiaco; DTVI: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; DTVI: diámetro telesistólico ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho; IM: insuficiencia mitral; EM: estenosis mitral; EAo: estenosis aórtica; IAo: insuficiencia aórtica; IT: insuficiencia tricuspídea; AST: aspartato transferasa; LDL: low density lipoprotein; NT-proBNP: fragmento N terminal del propéptido natriurético cerebral ; us: ultrasensible; AD: aurícula derecha; PsAP: presión sistólica arteria pulmonar; PdAP: presión sistólica arteria pulmonar; PAPm: presión media arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; GTP: gradiente transpulmonar; DPD: diferencia diastólica de presiones; GC: gasto cardiaco; IC: índice cardiaco; RVP: resistencias vasculares pulmonares. * significativo con p< 0,05

Las principales diferencias entre los cuatro grupos radicaron en los parámetros hemodinámicos, lo cual era esperable, puesto que los

pacientes se han agrupado en base a su perfil hemodinámico. Se vieron diferencias significativas en la PAD ($p = 0,01$), la PsAP ($p < 0,001$), la PdAP ($p < 0,001$), la PAPm, ($p < 0,001$), la PCP ($p < 0,001$), el DPD ($p < 0,001$), el GTP ($p < 0,001$) y las RVP ($p < 0,001$). No hubo diferencias intergrupales en el GC ($p = 0,52$) o el IC ($p = 0,19$).

Respecto a las variables clínicas, hubo diferencias significativas entre los 4 grupos en la clase funcional, valorado como el porcentaje de pacientes con clase funcional IIIB o IV, (NHP 29,4%, HPP 56,6%, HPMR 61,1%, HPMI 76,9%; $p = 0,02$); y en el porcentaje de pacientes que habían presentado el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses del CCD (NHP 23,5%, HPP 53,3%, HPMR 72,2%, HPMI 66,7%; $p = 0,02$).

En cuanto a las variables ecocardiográficas, alcanzaron la significación estadística los siguientes parámetros: el llenado patológico del VI, considerado como disfunción diastólica grado II o superior (NHP 31,2%, HPP 80,1%, HPMR 92,3%, HPMI 84,6%; $p < 0,01$); la disfunción sistólica significativa del VD (NHP 23,5%, HPP 36,6%, HPMR 57,9%, HPMI 69,3%; $p = 0,04$); y la PSAP estimada a partir del chorro de regurgitación de la IT (NHP $40,3 \pm 8,7$ mmHg, HPP $52,5 \pm 14,4$ mmHg, HPMR $64,6 \pm 22,6$ mmHg, HPMI $67,6 \pm 15,8$ mmHg; $p < 0,001$).

Por lo que respecta a los parámetros analíticos, sólo 2 variables obtuvieron diferencias significativas, la bilirrubina (NHP $1,01 \pm 0,6$ mg/dl, HPP $1,32 \pm 0,45$ mg/dl, HPMR $2,1 \pm 1,04$ mg/dl, HPMI $1,22 \pm 0,49$ mg/dl; $p < 0,001$) y el colesterol LDL (NHP 101 ± 48 mg/dl, HPP 83 ± 30 mg/dl, HPMR 65 ± 22 mg/dl, HPMI 75 ± 24 mg/dl; $p = 0,03$).

2.2. Comparación entre 3 grupos diferenciando entre componente poscapilar y precapilar a partir del GTP

En este caso, los pacientes se dividieron en 3 grupos; sin HP (NHP), HP poscapilar (HPP) y HP mixta (HPM), en función de la presencia o no de HP y de un GTP ≥ 12 mmHg

La tabla 16 recoge la comparación de las características demográficas, electrocardiográficas, ecocardiográficas, analíticas y hemodinámicas entre los 3 grupos.

TABLA 16: Comparación de las características basales entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función del GTP (ANOVA)

	NHP	HPP	HPM	p
N	17	30	32	
Edad (años)	58 \pm 10	62 \pm 6	60 \pm 12	0,31
Hombres (%)	47,1	76,7	59,4	0,11
IMC (kg/m²)	24,5 \pm 4,2	24,1 \pm 3,2	26,14 \pm 3,7	0,01*
Clase NYHA IIIB/IV (%)	29,4	56,6	68,7	0,02*
C. Isquémica (%)	35,3	36,7	43,8	0,79
MCD (%)	23,5	33,3	25,0	0,78
Muerte o TC (%)	23,5	53,3	70,0	0,01*
Ritmo sinusal (%)	64,7	40	68,8	0,07
QRSd (ms)	108 \pm 30	130 \pm 39	116,7 \pm 30,1	0,10
DTDVI (mm)	49,7 \pm 9,1	60,5 \pm 14,6	62,7 \pm 13,1	0,01*
DTSVI (mm)	35,7 \pm 8,8	48,9 \pm 18,5	50,1 \pm 17,3	0,49
FEVI (%)	46,5 \pm 15,5	34,2 \pm 18,9	34 \pm 19,8	0,07
Disfunción VI (FEVI < 40%) (%)	31,3	63,3	59,4	0,06
Llenado VI patológico (%)	31,2	80,1	93,8	<0,001*

	NHP	HPP	HPM	p
Diámetro basal del VD (mm)	39,4 ± 8,8	48,4 ± 8,6	48,9 ± 7,5	0,91
Disfunción significativa VD (%)	23,5	36,6	62,5	0,02*
PsAP estimada chorro de IT (mmHg)	40,3 ± 8,7	52,5 ± 14,4	65,7 ± 20,2	<0,001*
IM significativa (%)	23,5	40	50,0	0,20
EM significativa (%)	0	13,3	9,4	0,31
EAO significativa (%)	0	0	9,4	0,11
IAo significativa (%)	0	3,3	6,3	0,86
IT significativa (%)	41,2	66,7	62,5	0,17
Creatinina (mg/dl)	0,92 ± 0,3	1,16 ± 0,7	0,98 ± 0,30	0,27
Sodio (mEq/L)	138,8 ± 3	138,1 ± 2,2	135 ± 6,9	0,03*
AST (UI/L)	27,6 ± 17,8	34,2 ± 25,9	34,8 ± 47,2	0,77
Bilirrubina (mg/dl)	1,01 ± 0,6	1,32 ± 0,45	1,7 ± 0,95	0,01*
Ácido úrico (mg/dl)	7,5 ± 2,9	7,1 ± 3,1	8,1 ± 2,6	0,48
Colesterol LDL (mg/dl)	101 ± 48	83 ± 30	69 ± 23	0,01*
Hemoglobina glicosilada (%)	6,3 ± 0,8	6,3 ± 0,6	6,3 ± 0,8	0,87
NT-pro BNP (pg/ml)	2409 ± 2863	5821 ± 7368	7715 ± 9194	0,21
Troponina T us (ng/L)	38,2 ± 41,1	86,8 ± 175	75,6 ± 136,4	0,73
Hemoglobina (g/dl)	13,8 ± 1,9	12,7 ± 1,5	12,4 ± 2,4	0,09
Plaquetas (x10 ³ /ml)	213 ± 61	209 ± 75	202 ± 76	0,86
Presión AD (mmHg)	9,3 ± 4,4	15,4 ± 6,6	16,9 ± 5,7	<0,001*
PsAP (mmHg)	33,5 ± 7,3	51,8 ± 14,8	73,0 ± 19,6	<0,001*
PdAP (mmHg)	12,1 ± 3,1	24,4 ± 4,3	33,4 ± 6,6	<0,001*
PAPm (mmHg)	21,3 ± 2,3	35,3 ± 5,6	48,8 ± 8,7	<0,001*
PCP (mmHg)	15,6 ± 1,1	24,9 ± 4,4	26,9 ± 5,9	<0,001*
GTP (mmHg)	5,7 ± 2,1	10,3 ± 2,1	21,9 ± 5,9	<0,001*
DPD (mmHg)	-3 ± 2,6	-0,17 ± 2,6	7,5 ± 3,7	<0,001*
GC (L/min)	4,2 ± 0,9	3,8 ± 0,85	3,5 ± 0,87	0,33

IC (L/min/m ²)	2,2 ± 0,55	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,4	0,10
RVP (UW)	1,75 ± 0,73	3,44 ± 1,31	6,71 ± 2,57	<0,001*

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPM: hipertensión pulmonar mixta; IMC: índice de masa corporal; MCD: miocardiopatía dilatada; TC: trasplante cardiaco; DTVI: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; DTVI: diámetro telesistólico ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho; IM: insuficiencia mitral; EM: estenosis mitral; EAo: estenosis aórtica; IAo: insuficiencia aórtica; IT: insuficiencia tricuspídea; AST: aspartato transferasa; LDL: low density lipoprotein; NT-proBNP: fragmento N terminal del propéptido natriurético cerebral ; us: ultrasensible; AD: aurícula derecha; PsAP: presión sistólica arteria pulmonar; PdAP: presión sistólica arteria pulmonar; PAPm: presión media arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; GTP: gradiente transpulmonar; DPD: diferencia diastólica de presiones; GC: gasto cardiaco; IC: índice cardiaco; RVP: resistencias vasculares pulmonares.* significativo con $p < 0,05$ (ANOVA)

También en este caso, como era predecible, las principales diferencias entre los 3 grupos radicarón en los parámetros hemodinámicos. Se vieron diferencias significativas en la PAD ($p < 0,001$), la PsAP ($p < 0,001$), la PdAP ($p < 0,001$), la PAPm, ($p < 0,001$), la PCP ($p < 0,001$), el DPD ($p < 0,001$), el GTP ($p < 0,001$) y las RVP ($p < 0,001$). No hubo diferencias intergrupales en el GC ($p = 0,33$) o el IC ($p = 0,10$).

Respecto a las variables clínicas, hubo diferencias significativas entre los 3 grupos en el IMC, (NHP $24,5 \pm 4,2$ kg/m², HPP $24,1 \pm 3,2$ kg/m², HPM $26,14 \pm 3,7$ kg/m²; $p = 0,01$); la clase funcional, valorada como el porcentaje de pacientes con clase funcional IIIB o IV, (NHP 29,4%, HPP 56,6%, HPM 68,7%, $p = 0,02$); y en el porcentaje de pacientes que habían presentado el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses del CCD (NHP 23,5%, HPP 53,3%, HPMR 70,0%; $p = 0,01$).

En cuanto a las variables ecocardiográficas, alcanzaron la significación estadística los siguientes parámetros: el diámetro telediastólico del VI (NHP $49,7 \pm 9,1$ mm, HPP $60,5 \pm 14,6$ mm, HPM $62,7 \pm 13,1$ mm; $p = 0,01$);

el llenado patológico del VI, considerado como disfunción diastólica grado II, (NHP 31,2%, HPP 80,1%, HPM 93,8%; $p < 0,001$); la disfunción sistólica significativa del VD (NHP 23,5%, HPP 36,6%, HPM 62,5%; $p = 0,02$); y la PSAP estimada a partir del chorro de regurgitación de la IT (NHP $40,3 \pm 8,7$ mmHg, HPP $52,5 \pm 14,4$ mmHg, HPM $65,7 \pm 20,2$ mmHg; $p < 0,001$).

Por lo que respecta a los parámetros analíticos, 3 variables obtuvieron diferencias significativas: la bilirrubina (NHP $1,01 \pm 0,6$ mg/dl, HPP $1,32 \pm 0,45$ mg/dl, HPM $1,7 \pm 0,95$ mg/dl; $p = 0,01$), el sodio (NHP $138,8 \pm 3$ mEq/L, HPP $138,1 \pm 2,2$ mEq/L, HPM $135 \pm 6,9$ mEq/L; $p = 0,03$) y el colesterol LDL (NHP 101 ± 48 mg/dl, HPP 83 ± 30 mg/dl, HPM 69 ± 23 mg/dl; $p = 0,01$).

2.3. Comparación entre 3 grupos diferenciando entre componente poscapilar y precapilar a partir del gradiente diastólico

En este caso, los pacientes fueron divididos en 3 grupos; sin HP (NHP), HP poscapilar (HPP) y HP mixta (HPM), en función de la presencia o no de HP y de una DPD ≥ 7 mmHg

La tabla 17 recoge la comparación de las características demográficas, electrocardiográficas, ecocardiográficas, analíticas y hemodinámicas entre estos 3 grupos.

TABLA 17: Comparación de las características basales entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función de la DPD (ANOVA)

	NHP	HPP	HPM	p
N	17	39	23	
Edad (años)	58,1 ± 10,8	60,9 ± 10,8	62,4 ± 9,4	0,44
Hombres (%)	47,1	69,2	65,2	0,29
IMC (kg/m²)	24,5 ± 4,2	24,8 ± 3,5	27,1 ± 4,5	0,01*
Clase NYHA IIIB/IV (%)	29,4	64,1	66,7	0,04*
C. Isquémica (%)	35,3	46,2	30,4	0,45
MCD (%)	23,5	30,8	26,1	0,84
Muerte o TC (%)	23,5	59,0	66,7	0,02*
Ritmo sinusal (%)	64,7	51,3	60,9	0,59
QRSd (ms)	108 ± 30	126,7 ± 37,8	118,4 ± 31,4	0,23
DTDVI (mm)	49,7 ± 9,1	62,9 ± 14,9	60,33 ± 11,6	0,01*
DTSVI (mm)	35,7 ± 8,8	51,5 ± 18,3	47,2 ± 16,5	0,27
FEVI (%)	46,5 ± 15,5	31,1 ± 18,2	34 ± 20,1	0,01*
Disfunción VI (FEVI < 40%) (%)	31,3	69,2	57,8	0,02*
Llenado VI patológico (%)	31,2	82,1	91,3	<0,001*
Diámetro basal del VD (mm)	39,4 ± 8,8	47,9 ± 7,9	48,7 ± 8,3	0,88
Disfunción significativa VD (%)	23,5	46,2	59,5	0,05*
PsAP estimada chorro de IT (mmHg)	40,3 ± 8,7	56,3 ± 16,8	64,6 ± 20,9	0,01*
IM significativa (%)	23,5	48,7	39,1	0,21
EM significativa (%)	0	10,3	13,0	0,33
EAO significativa (%)	0	0	13,0	0,02*
IAo significativa (%)	0	5,1	4,3	0,97
IT significativa (%)	41,2	66,7	60,9	0,16
Creatinina (mg/dl)	0,92 ± 0,3	1,10 ± 0,6	1,01 ± 0,29	0,62
Sodio (mEq/L)	138,8 ± 3	137,6 ± 3,3	134 ± 7,9	0,02*

	NHP	HPP	HPM	p
AST (UI/L)	27,6 ± 17,8	31,5 ± 23,9	39,7 ± 54,9	0,52
Bilirrubina (mg/dl)	1,01 ± 0,6	1,49 ± 0,69	1,68 ± 0,89	0,04*
Ácido úrico (mg/dl)	7,5 ± 2,9	7,3 ± 2,8	7,9 ± 2,9	0,83
Colesterol LDL (mg/dl)	101 ± 48	79 ± 30	70 ± 23	0,04*
Hemoglobina glicosilada (%)	6,3 ± 0,8	6,3 ± 0,7	6,1 ± 0,7	0,42
NT-pro BNP (pg/ml)	2409 ± 2863	6645 ± 8251	6988 ± 8625	0,31
Troponina T us (ng/L)	38,2 ± 41,1	95,6 ± 184,1	51,6 ± 53,9	0,49
Hemoglobina (g/dl)	13,8 ± 1,9	12,8 ± 1,6	12,3 ± 2,5	0,07
Plaquetas (x10 ³ /ml)	213 ± 61	210 ± 80	198 ± 68	0,78
Presión AD (mmHg)	9,3 ± 4,4	15,6 ± 6,2	17,1 ± 6,2	<0,001*
PsAP (mmHg)	33,5 ± 7,3	56,7 ± 17,4	73,1 ± 21,1	<0,001*
PdAP (mmHg)	12,1 ± 3,1	26,4 ± 6,1	33,5 ± 6,8	<0,001*
PAPm (mmHg)	21,3 ± 2,3	37,9 ± 7,9	49,7 ± 8,6	<0,001*
PCP (mmHg)	15,6 ± 1,1	25,6 ± 4,8	26,5 ± 6,0	<0,001*
GTP (mmHg)	5,7 ± 2,1	12,2 ± 4,9	23,2 ± 6,9	<0,001*
DPD (mmHg)	-3 ± 2,6	0,79 ± 3,36	9,57 ± 2,8	<0,001*
GC (L/min)	4,2 ± 0,9	3,2 ± 0,87	3,6 ± 0,78	0,10
IC (L/min/m²)	2,2 ± 0,55	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	0,05*
RVP (UW)	1,75 ± 0,73	4,20 ± 2,39	6,71 ± 2,27	<0,001*

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPM: hipertensión pulmonar mixta; IMC: índice de masa corporal; MCD: miocardiopatía dilatada; TC: trasplante cardiaco; DTVI: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; DTVI: diámetro telesistólico ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho; PSAP: presión sistólica de arteria pulmonar; IM: insuficiencia mitral; EM: estenosis mitral; EAo: estenosis aórtica; IAo: insuficiencia aórtica; IT: insuficiencia tricuspídea; AST: aspartato transferasa; LDL: low density lipoprotein; NT-proBNP: fragmento N terminal del propéptido natriurético cerebral ; us: ultrasensible; AD: aurícula derecha; PsAP: presión sistólica arteria pulmonar; PdAP: presión sistólica arteria pulmonar; PAPm: presión media arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; GTP: gradiente transpulmonar; DPD: diferencia diastólica de presiones; GC: gasto cardiaco; IC: índice cardiaco; RVP: resistencias vasculares pulmonares.

* significativo con p< 0,05 (ANOVA)

Una vez más, como era previsible, las principales diferencias entre los 3 grupos radicarón en los parámetros hemodinámicos. Se vieron diferencias significativas en la PAD ($p < 0,001$), la PsAP ($p < 0,001$), la PdAP ($p < 0,001$), la PAPm, ($p < 0,001$), la PCP ($p < 0,001$), el DPD ($p < 0,001$), el GTP ($p < 0,001$), el IC ($p = 0,05$) y las RVP ($p < 0,001$). No hubo diferencias intergrupales en el GC ($p = 0,33$) ni en el IC ($p = 0,10$).

Respecto a las variables clínicas, hubo diferencias significativas entre los 3 grupos en el IMC, (NHP $24,5 \pm 4,2 \text{ kg/m}^2$, HPP $24,8 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$, HPM $27,0 \pm 4,6 \text{ kg/m}^2$; $p = 0,01$); la clase funcional, valorada como el porcentaje de pacientes con clase funcional IIIB o IV, (NHP 29,4%, HPP 64,1%, HPM 66,7%, $p = 0,04$); y en el porcentaje de pacientes que habían presentado el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses del CCD (NHP 23,5%, HPP 59,0%, HPMR 66,7%; $p = 0,02$).

En cuanto a las variables ecocardiográficas, alcanzaron la significación estadística los siguientes parámetros: el diámetro telediastólico del VI (NHP $49,7 \pm 9,1 \text{ mm}$, HPP $62,9 \pm 14,9 \text{ mm}$, HPM $60,33 \pm 11,6 \text{ mm}$; $p = 0,01$); la FEVI (NHP $46,5 \pm 15,5\%$, HPP $31,1 \pm 18,2\%$, HPM $34 \pm 20,1\%$; $p = 0,01$); el porcentaje de pacientes con FEVI $< 40\%$ (NHP 31,3%, HPP 69,2%, HPM 57,8%; $p = 0,02$); el llenado patológico del VI, considerado como disfunción diastólica grado II o superior, (NHP 31,2%, HPP 82,1%, HPM 91,3%; $p < 0,001$); la disfunción sistólica significativa del VD (NHP 23,5%, HPP 46,2%, HPM 56,5%; $p = 0,05$); la PSAP estimada a partir del chorro de regurgitación de la IT (NHP $40,3 \pm 8,7 \text{ mmHg}$, HPP $56,3 \pm 16,8 \text{ mmHg}$, HPM $64,6 \pm 20,9 \text{ mmHg}$; $p = 0,01$); y el porcentaje de pacientes con estenosis aórtica severa (NHP 0%, HPP 0%, HPM 13%; $p = 0,02$);

Por lo que respecta a los parámetros analíticos, 3 variables obtuvieron diferencias significativas, la bilirrubina (NHP $1,01 \pm 0,6$ mg/dl, HPP $1,49 \pm 0,69$ mg/dl, HPM $1,68 \pm 0,89$ mg/dl; $p=0,04$), el sodio (NHP $138,8 \pm 3$ mEq/L, HPP $137,6 \pm 3,3$ mEq/L, HPM $134 \pm 7,9$ mEq/L; $p=0,02$) y el colesterol LDL (NHP 101 ± 48 mg/dl, HPP 79 ± 30 mg/dl, HPM 70 ± 23 mg/dl; $p=0,04$).

3. Resultados obtenidos en el panel de proteínas (microarray).

3.1. Consideraciones previas a la interpretación de las lecturas de intensidad de señal

Como hemos comentado anteriormente se analizaron de forma semicuantitativa un total de 1.000 proteínas en muestras de suero de los pacientes, utilizando el array comercial Human L-series 1.000 Ref. 126AAH-BLG-1000 (ver apartado IV.5).

La intensidad de la señal fluorescente de los chips de vidrio se midió utilizando un lector láser y se importó para poder ser procesada a la aplicación *Launch RayBio® Antibody Array Analysis Tool* (RayBiotech, Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France). Previo a proceder con el análisis de las lecturas, se realizó la normalización de las mismas con los controles positivos y la substracción del ruido de fondo. La figura 25 recoge una imagen de la fluorescencia de los chips de vidrio

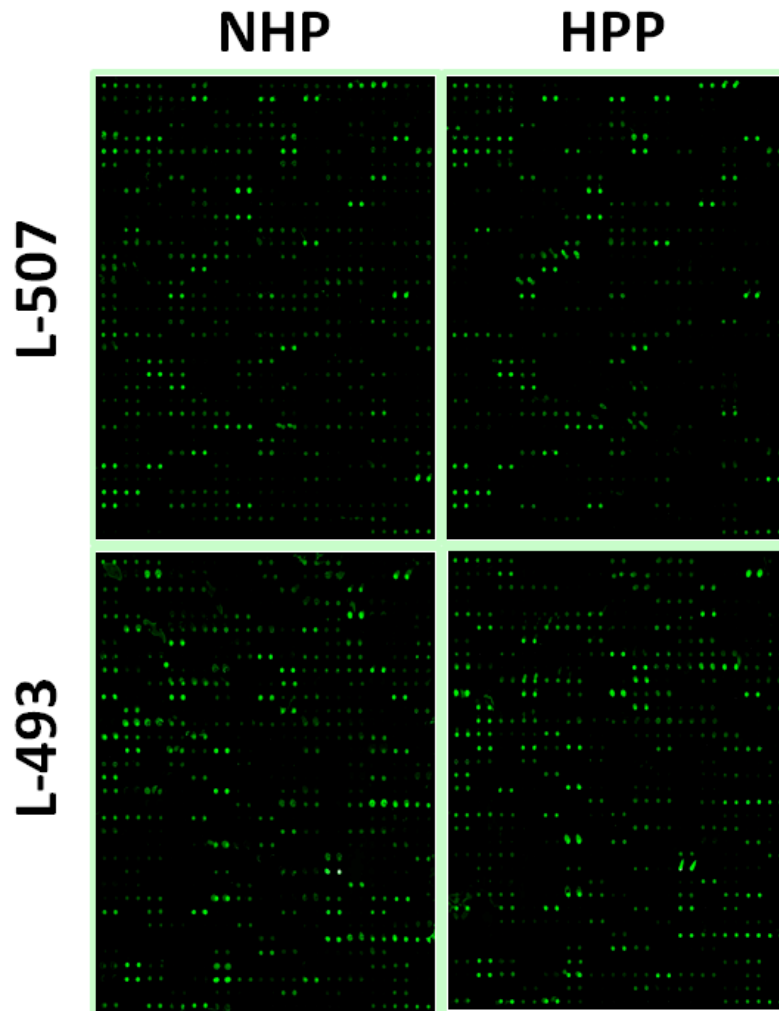
correspondiente al panel de proteínas para cada uno de los 4 grupos estudiados.

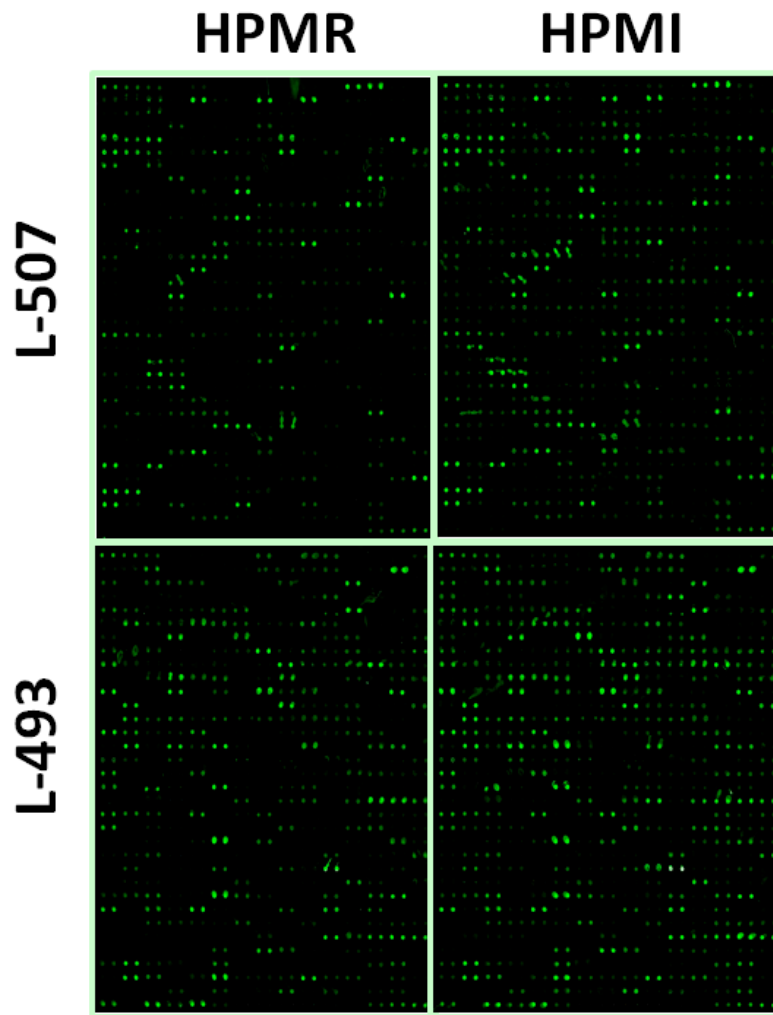
Se consideró como una diferencia significativa para cada una de las proteínas analizadas un incremento $\geq 1,5$ veces o un decremento $\leq 0,65$ veces en los niveles de expresión entre grupos, siempre que la intensidad de señal estuviera más de 2 veces por encima de la máxima intensidad de señal de los controles negativos (media de ruido de fondo + 2 desviaciones estándar).

Para evitar en la medida de lo posible resultados espurios y falsos positivos, consideramos como significativas inicialmente aquellas proteínas que tenían un incremento $\geq 1,5$ veces o un decremento $\leq 0,65$ veces progresivo entre grupos consecutivos (es decir, HP mixta irreversible $\geq 1,5$ veces HP mixta reversible, HP mixta reversible $\geq 1,5$ veces HP poscapilar, HP poscapilar $\geq 1,5$ veces No HP). Aquellas proteínas que alcanzaron diferencias significativas, pero con cambios de intensidad ilógicos entre grupos fueron descartadas.

En segundo lugar, consideramos aquellas proteínas que si bien no alcanzaban una diferencia significativa ($\geq 1,5$ veces) entre grupos consecutivos, habían alcanzado una diferencia muy marcada (arbitrariamente consideramos ≥ 3 veces) entre los grupos más extremos de la enfermedad (HP mixta irreversible ≥ 3 veces No HP) siempre y cuando no hubiera una progresión ilógica de las señales de intensidad.

Figura 25: Señales de fluorescencia de los chips de vidrio correspondientes a los paneles de proteínas de cada uno de los 4 grupos estudiados





NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible;

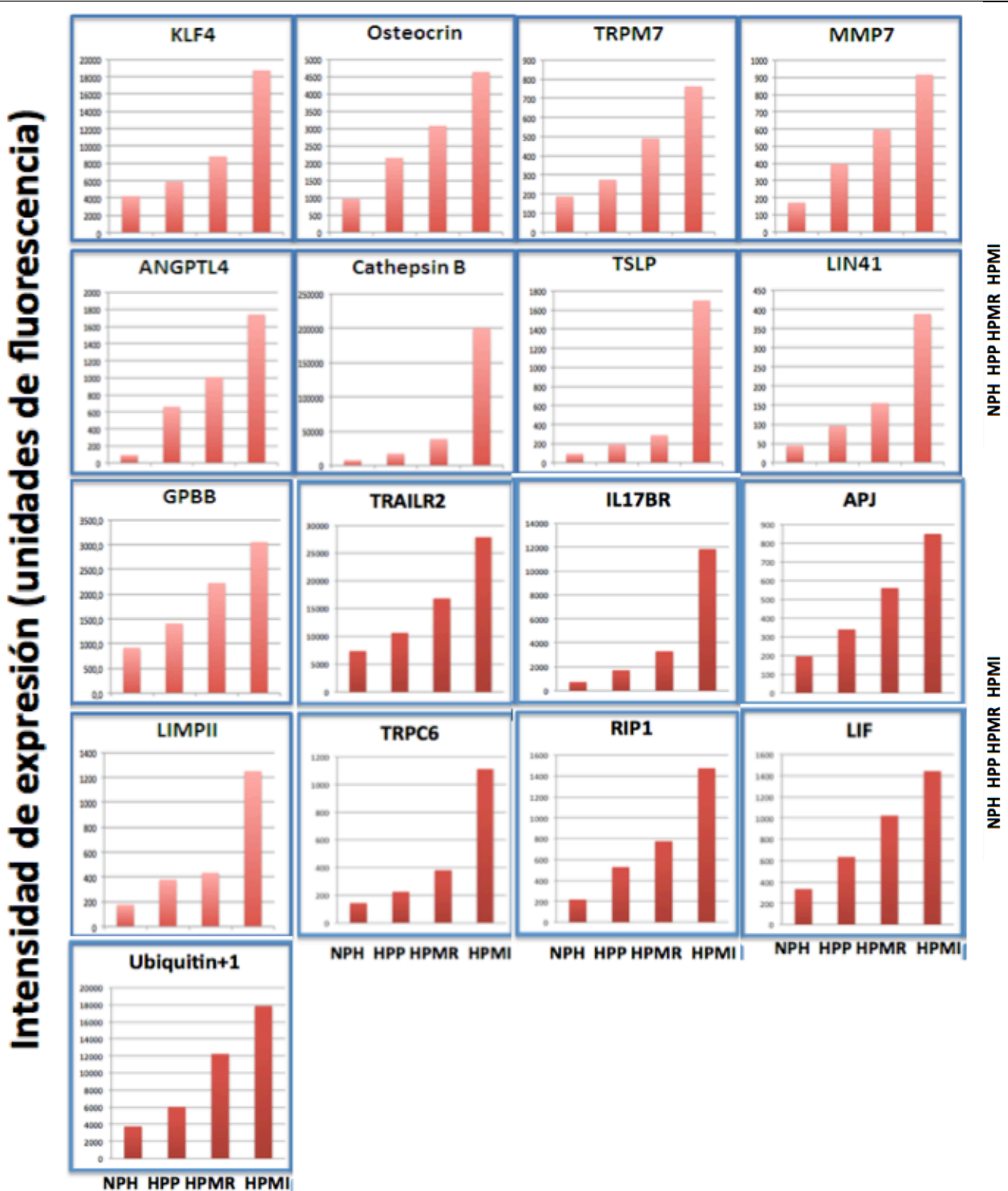
3.2. Análisis de las lecturas de intensidad de señal

Entre las 1.000 proteínas estudiadas, tan sólo 67 (6,7%) mostraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia aplicando los criterios explicados en el apartado anterior (incremento $\geq 1,5$ veces / decremento $\leq 0,65$ veces progresivo entre grupos consecutivos o diferencias ≥ 3 veces entre los grupos más extremos de la enfermedad sin expresiones anómalas en los grupos intermedios).

Entre estas 67 proteínas, 17 presentaron incrementos progresivos de expresión proteica entre grupos consecutivos, según empeoraba la gravedad de los parámetros hemodinámicos. Estas proteínas fueron:

- Catepsina B
- Glucógeno fosforilasa isoenzima BB (GPBB)
- Proteína angiopoyetina-like 4 (ANGPTL4)
- Receptor transitorio de potencial canal de cationes subfamilia C miembro 6 (TRPC6)
- Linfopoyetina tímica estromal (TSLP)
- Factor Kruppel-like 4 (KLF4)
- Variante de linaje 41 (LIN41)
- Factor inhibidor de la leucemia (LIF)
- Ubiquitina⁺¹
- Osteocrina / Musculina
- Metaloproteasa de matriz 7 (MMP7)
- Receptor transitorio de potencial canal de cationes subfamilia M miembro 7 (TRPM7)
- Proteína interactuante de receptor 1 (RIP1)
- Receptor de apelina (APJ)
- Proteína de membrana lisosomal II (LIMP2)
- Receptor de la interleuquina 17B (IL17BR)
- Receptor del factor de necrosis tumoral miembro 10B (TRAILR2)

Figura 26: Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 17 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre grupos consecutivos



NPH: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible.

TABLA 18: Lista de proteínas que alcanzaron diferencias de más de 3 veces entre los pacientes sin HP y HP mixta irreversible

Acrónimo	Nombre proteína	Diferencia HPMI>NHP	Acrónimo	Nombre proteína	Diferencia HPMI>NHP
11b-HSD1	11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1	4 veces	2B4	Receptor de Célula Natural Killer B4	6 veces
ANGPT2	Angiopoyetina 2	3 veces	ANGPTL2	Angiopoyetina-like 2	3 veces
AXA7	Annexina A7	7 veces	BMP3	Proteína morfogenética ósea 3	4 veces
BMP8	Proteína morfogenética ósea 8	6 veces	BMPR1A	Receptor de la proteína morfogenética ósea 1A	3 veces
CHGA	Cromogranina A	4 veces	CLDN3	Claudina-3	6 veces
	Creatinina	3 veces	CV2	Crossveinless 2	3 veces
DD	D-dímeros	4 veces	EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial	8 veces
FABP3	Proteína ligadora de ácidos grasos tipo cardiaco	4 veces	FABP4	Proteína ligadora de ácidos grasos tipo adiposo	6 veces
FGF9	Factor de crecimiento fibroblástico 9	4 veces	FGF11	Factor de crecimiento fibroblástico 11	3 veces
FGF21	Factor de crecimiento fibroblástico 21	3 veces	FIH	Factor inhibidor HIF	3 veces
	Fibrinógeno	3 veces	FZD5	Frizzled 5	7 veces
FOXO	<i>Forkhead box protein O1</i>	4 veces	FXIII B	Factor XIII B	7 veces

GAL1	Galectina 1	7 veces	GAL7	Galectina 1	6 veces
HADHA	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa subunidad alfa	4 veces	HSP10	Proteína de choque térmico 10	3 veces
IL22R	Receptor de interleuquina 22	11 veces	IL23R	Receptor de interleuquina 23	4 veces
LEPR	Receptor de leptina	3 veces	LOX-1	Receptor de LDL oxidadas lectina-like 1	3 veces
LTF	Lactotransferrina	3 veces	MK	Midkine	3 veces
MMP11	Metaloproteasa de matriz 11 (estromalisina 3)	4 veces	NPL2	Neuropilina 2	3 veces
NT4	Neurotrofina 4	3 veces	PLUNC	Proteína del epitelio nasal, palatino y pulmonar	3 veces
Pref-1	Factor preadipocítico 1	4 veces	RARRES2	Quemerina / Proteína respondedora al receptor del ácido retinoico	4 veces
ROCK2	Proteína kinasa asociada a Rho 2	6 veces		Serotonina	9 veces
SDC1	Sindecan 1	5 veces	Smad7	SMAD 7	10 veces
SP	Proteína S	5 veces	TSP4	Trombospondina 4	3 veces
TIMP2	Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2	3 veces	TLR4	Receptor Toll-like 4	6 veces
VEGF	Factor de crecimiento vascular-endotelial	4 veces	vWF	Factor von Willebrand	3 veces

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible;

Otras 50 proteínas, aunque también mostraron un incremento progresivo, no alcanzaron diferencias significativas entre grupos consecutivos. Sin embargo, si se alcanzaron diferencias en la intensidad de fluorescencia de más de 3 veces entre el grupo sin HP y el grupo con HP mixta irreversible. La tabla 18 recoge es listado de las citadas proteínas.

Las variaciones de intensidad de fluorescencia para los diferentes grupos de estas 50 proteínas quedan representadas en la figuras 27-29.

De estas 67 proteínas que dieron diferencias significativas entre los grupos de estudio, se seleccionaron 17 para volver a analizar mediante un método cuantitativo de enzoinmunoensayo (ELISA).

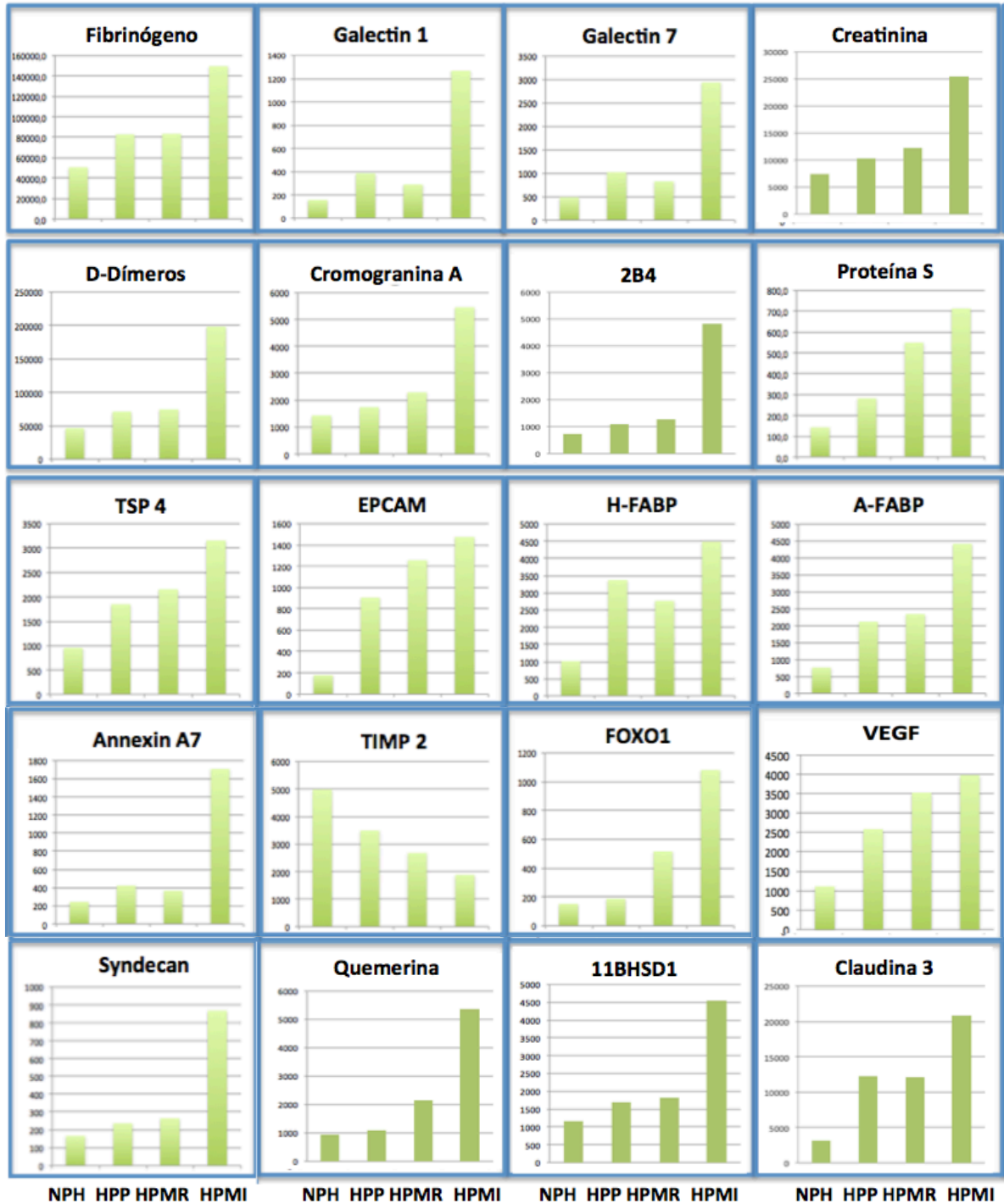
El criterio de selección fue económico (ajuste del precio de los kits comerciales al presupuesto estimado) y logístico (disponibilidad por parte de los proveedores) y se priorizaron en función de los datos disponibles en la literatura.

Estas proteínas fueron:

- a) Función endotelial vascular: factor de von Willebrand, APJ, TRCP6
- b) Angiogénesis: VEGF, FOXO1, KLF 4, angiopoyetina like 4.
- c) Matriz extracelular: catepsina B, Galectina 1, TIMP 2, MMP 7
- d) Cardiacas: osteocrina (musculina).
- e) Inflamación y Coagulación: fibrinógeno, D-dímeros, proteína S.
- f) Otras: cromogranina A, FABP4.

Figura 27: Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 50 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos de SHP e HPMI

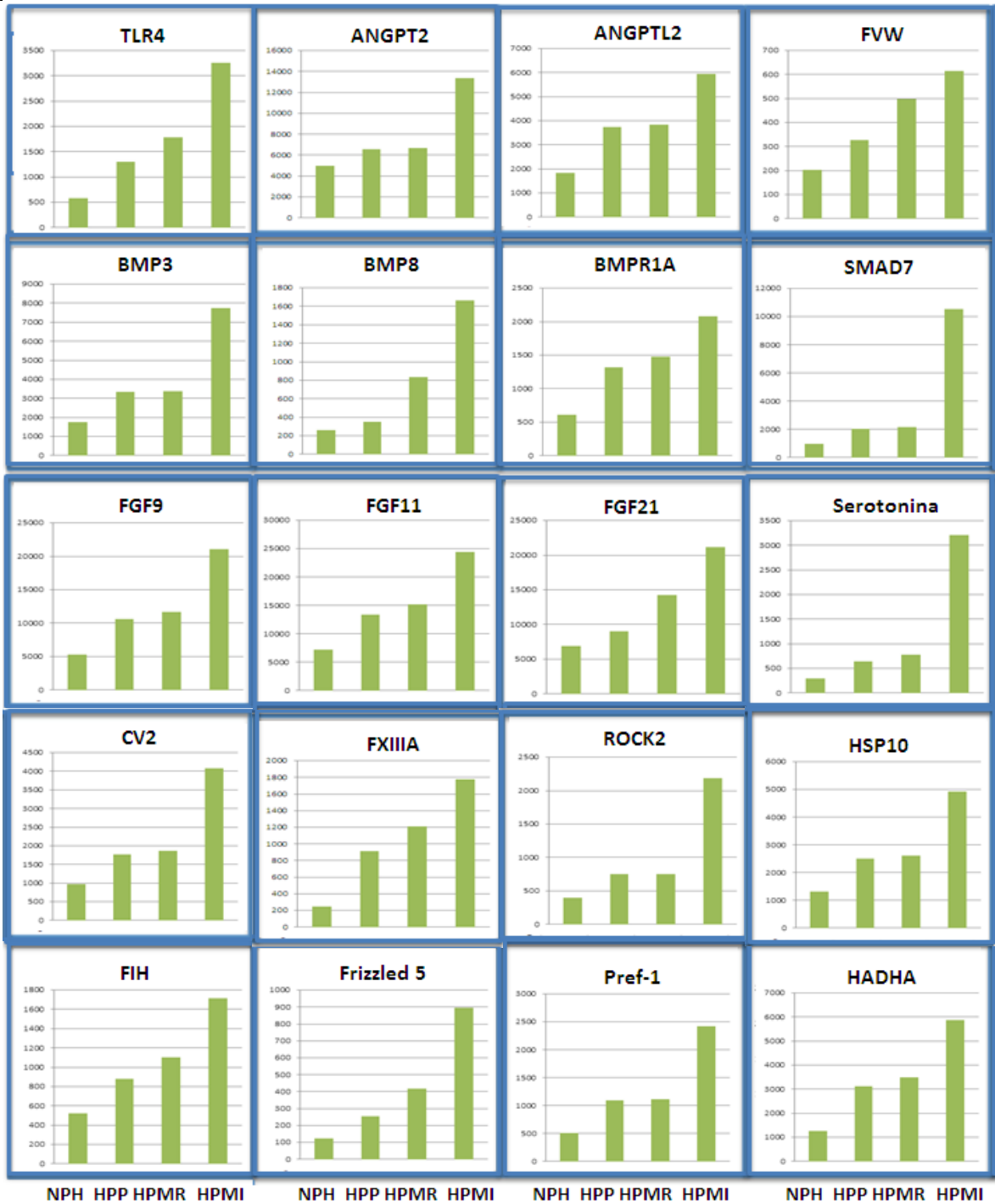
Intensidad de expresión (unidades de fluorescencia)



NPH: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible.

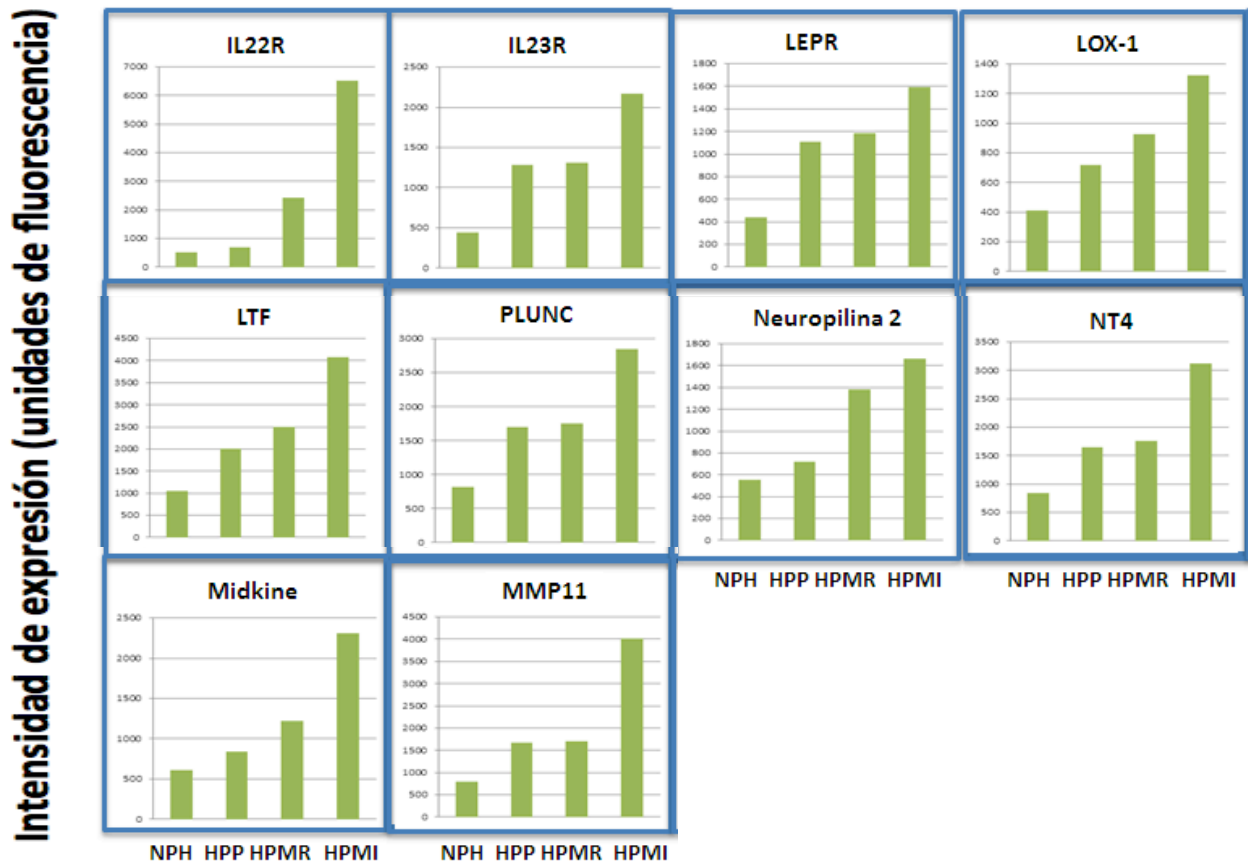
Figura 28: Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 50 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos de SHP e HPMI (2)

Intensidad de expresión (unidades de fluorescencia)



NPH: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible.

Figura 29: Diagrama de barras de intensidad de fluorescencia de las 50 proteínas que alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos de SHP e HPMI (3)



NPH: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible.

A estas 17 se unen para el análisis mediante ELISA aquellas proteínas previamente descritas en la literatura en otros tipos de HP como el NT-proBNP, la troponina T, la homocisteína, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y la endotelina-1 [ET-1].

Aunque ni la homocisteína ni la dimetilarginina asimétrica son proteínas, sino aminoácidos, para facilitar la escritura nos referiremos a ellas como “proteínas” al englobarlas junto con el resto de biomarcadores.

4. Resultados obtenidos en el enzimoimmunoensayo (ELISA)

4.1. Consideraciones previas

Un total de 22 proteínas fueron analizadas cuantitativamente. Todas ellas se analizaron utilizando el método ELISA excepto el factor von Willebrand, del cual se midió su actividad (en porcentaje) mediante un método de inmunturbidimetría.

Las proteínas fibrinógeno, D-Dímeros, proteína S, factor von Willebrand, NT-proBNP, troponina T y homocisteína fueron medidas en el suero de los pacientes utilizando las instalaciones y equipamiento del servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Las mediciones fueron llevadas a cabo por personal del servicio vinculado al presente proyecto de investigación.

El resto de proteínas se analizaron en los laboratorios de la Unidad de Hemostasia y Trombosis del Centro de Investigación del Hospital Universitari i Politècnic La Fe y fueron llevadas a cabo por el doctorando y otros colaboradores del proyecto.

Por motivos económicos, no fue posible medir las 22 proteínas en los 80 pacientes previstos. En algunas de ellas sólo pudo en la mitad de muestra (40). Queda detallado a continuación:

- 79 pacientes: fibrinógeno, D-dímeros, proteína S, factor de von Willebrand, TRCP6, TIMP 2, cromogranina A, NT-proBNP, troponina T, VEGF, homocisteína y endotelina-1.
- 40 pacientes: APJ, FOXO1, KLF 4, angiopoyetina like 4, catepsina B, Galectina 1, MMP 7, osteocrina, FABP4 y ADMA.

Dado que la información obtenida tras realizar los análisis estadísticos con las 22 proteínas es muy voluminosa, en los apartados siguientes sólo vamos a reflejar aquellas proteínas que han obtenido un resultado estadísticamente significativo o muestran una tendencia hacia la significación para cada uno de los análisis realizados. Todos los resultados obtenidos en el análisis para cada una de las proteínas se encuentran recopilados en el anexo.

4.2. Comparación entre grupos según su perfil hemodinámico.

Cuatro grupos: NHP, HPP, HPMR, HPMI

La tabla 19 recoge aquellas proteínas que alcanzaron significación estadística o presentaron tendencia a la significación al comparar los pacientes según los 4 grupos hemodinámicos del estudio.

TABLA 19: Diferencias intergrupos entre los 4 grupos hemodinámicos del estudio (ANOVA)

	NHP	HPP	HPMR	HPMI	p
TIMP 2 (ng/ml)	98,7±31,8	156±57	126±48	139±55	*0,03
TRCP 6 (pg/ml)	964 ± 75	462±36	568±51	653±51	*0,02
Cromogranina A (ng/ml)	58,7±101	186 ± 207	116±155	104 ± 144	0,85
ADMA (uM/ml)	0,55±0,16	0,69±0,1	0,77±0,3	0,68±0,12	0,95

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; TRCP 6: Receptor transitorio de potencial canal de cationes subfamilia C miembro 6; ADMA: dimetil arginina asimétrica. significativo con p< 0,05 (ANOVA)

Tres grupos: NHP, HPP, HPM

La tabla 20 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística o presentaron tendencia a la significación al comparar los pacientes divididos en 3 grupos en función de la presencia o no de HP y de un GTP ≥ 12 mmHg

TABLA 20: Diferencias intergrupos entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función del GTP (ANOVA)

	NHP	HPP	HPM	p
ET-1 (pg/ml)	2,01±1,1	2,80±1,71	3,12±1,65	0,08
TIMP 2 (ng/ml)	98,7±31,8	156±57	131±50	*0,001
TRCP 6 (pg/ml)	964 ± 75	462±36	603±50	*0,01
Cromogranina A (ng/ml)	58,7±101	186 ± 207	111±148	*0,04
ADMA (uM/ml)	0,55±0,16	0,69±0,1	0,73±0,24	0,08
Factor von Willebrand (%)	180±36	225±88	236±97	0,10
NT-pro BNP (pg/ml)	883±1147	4233±4776	4132±6299	0,06

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPM: hipertensión pulmonar mixta
 ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; TRCP 6: Receptor transitorio de potencial canal de cationes subfamilia C miembro 6; ADMA: dimetil arginina asimétrica, NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral

*significativo con $p < 0,05$ (ANOVA)

La tabla 21 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística o presentaron tendencia a la significación al comparar los pacientes divididos en 3 grupos en función de la presencia o no de HP y de un DPD ≥ 7 mmHg

TABLA 21: Diferencias intergrupos entre los 3 grupos hemodinámicos del estudio en función de la DPD (ANOVA)

	NHP	HPP	HPM	p
ET-1 (pg/ml)	2,01±1,1	3,02±1,87	2,65±1,25	0,05
TIMP 2 (ng/ml)	98,7±31,8	142±60	146±44	*0,01
TRCP 6 (pg/ml)	964±75	451±35	677±55	*0,01
Catepsina B (ng/ml)	72,4±42,7	115,8±46,8	99,8±54,2	0,09
ADMA (uM/ml)	0,55±0,16	0,69±0,12	0,76±0,28	*0,04
Factor von Willebrand (%)	180±36	241±104	211±64	0,06
NT-pro BNP (pg/ml)	883±1147	5247±6665	2389±1983	*0,01

NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPM: hipertensión pulmonar mixta;
 ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; TRCP 6: Receptor transitorio de potencial canal de cationes subfamilia C miembro 6; ADMA: dimetil arginina asimétrica.; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral

*significativo con $p < 0,05$ (ANOVA)

Únicamente 2 proteínas, TIMP2 ($p=0,03$) y TRCP6 ($p=0,03$) obtuvieron diferencias significativas entre los 4 grupos hemodinámicos, que se mantuvieron al agrupar los pacientes con HP mixta en un solo grupo, ya

sea en función del GTP ($p=0,001$ y $0,01$ respectivamente) o en función del DPD ($p=0,01$ y $0,01$ respectivamente). No obstante, la proteína no presenta una progresión lógica en función de la severidad de los grupos y como se muestra en la figura 30, aunque las medias se diferencian, los diagramas de cajas de los diferentes grupos se solapan entre ellos.

Al agrupar los pacientes con HP mixta, otras 3 proteínas alcanzaron la significación; la cromogranina A ($p=0,04$) si el parámetro diferenciador es el GTP y la ADMA ($p=0,04$) y el NT-proBNP ($P=0,01$) si el parámetro es el DPD.

Otras proteínas como la ET-1, la cromogranina A y el fvW mostraron una tendencia a las diferencias significativas entre pacientes sin HP, HP poscapilar y HP mixta (independientemente de GTP o DPD) pero sin alcanzar la significación estadística.

Dos grupos: ausencia de HP y presencia de HP

La tabla 22 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística o presentaron tendencia a la significación al comparar los pacientes sin hipertensión pulmonar con aquellos que si la presentaban.

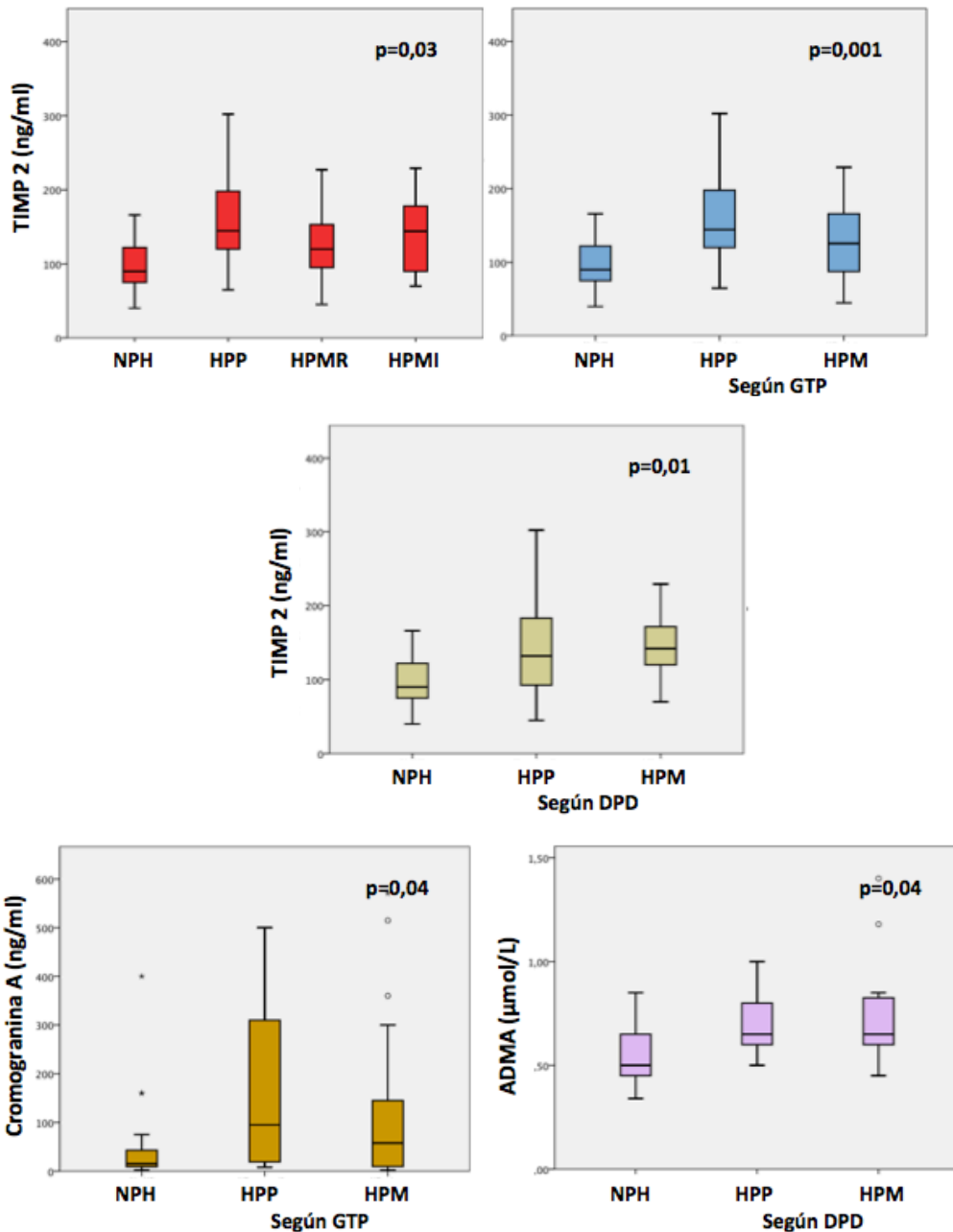
En este caso 6 proteínas, ET-1 ($p=0,01$), TIMP2 ($p=0,01$), Catepsina B ($p=0,04$), ADMA ($p=0,02$), fvW ($p=0,03$) y NT-proBNP ($p=0,02$) obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes con y sin hipertensión pulmonar. La figura 31 muestra los diagramas de cajas de estas 6 proteínas.

TABLA 22: Proteínas que alcanzaron la significación estadística diferenciando ausencia y presencia de hipertensión pulmonar (t-Student)

	Ausencia de HP	Presencia de HP	p
ET-1 (pg/ml)	2,01 ± 1,1	2,96 ± 1,67	*0,01
TIMP 2 (ng/ml)	98,7 ± 31,8	143,6 ± 54,89	*0,01
TRCP 6 (pg/ml)	918 ± 51	636 ± 42	0,10
Catepsina B (ng/ml)	72,4 ± 42,7	110,1 ± 48,9	*0,04
Cromogranina A (ng/ml)	58,71 ± 101,02	147,55 ± 182,21	0,06
ADMA (uM/ml)	0,55 ± 0,16	0,72 ± 0,19	*0,02
Factor von Willebrand (%)	180 ± 36	231 ± 92	*0,03
NT-pro BNP (pg/ml)	883 ± 1147	4181 ± 5555	*0,02

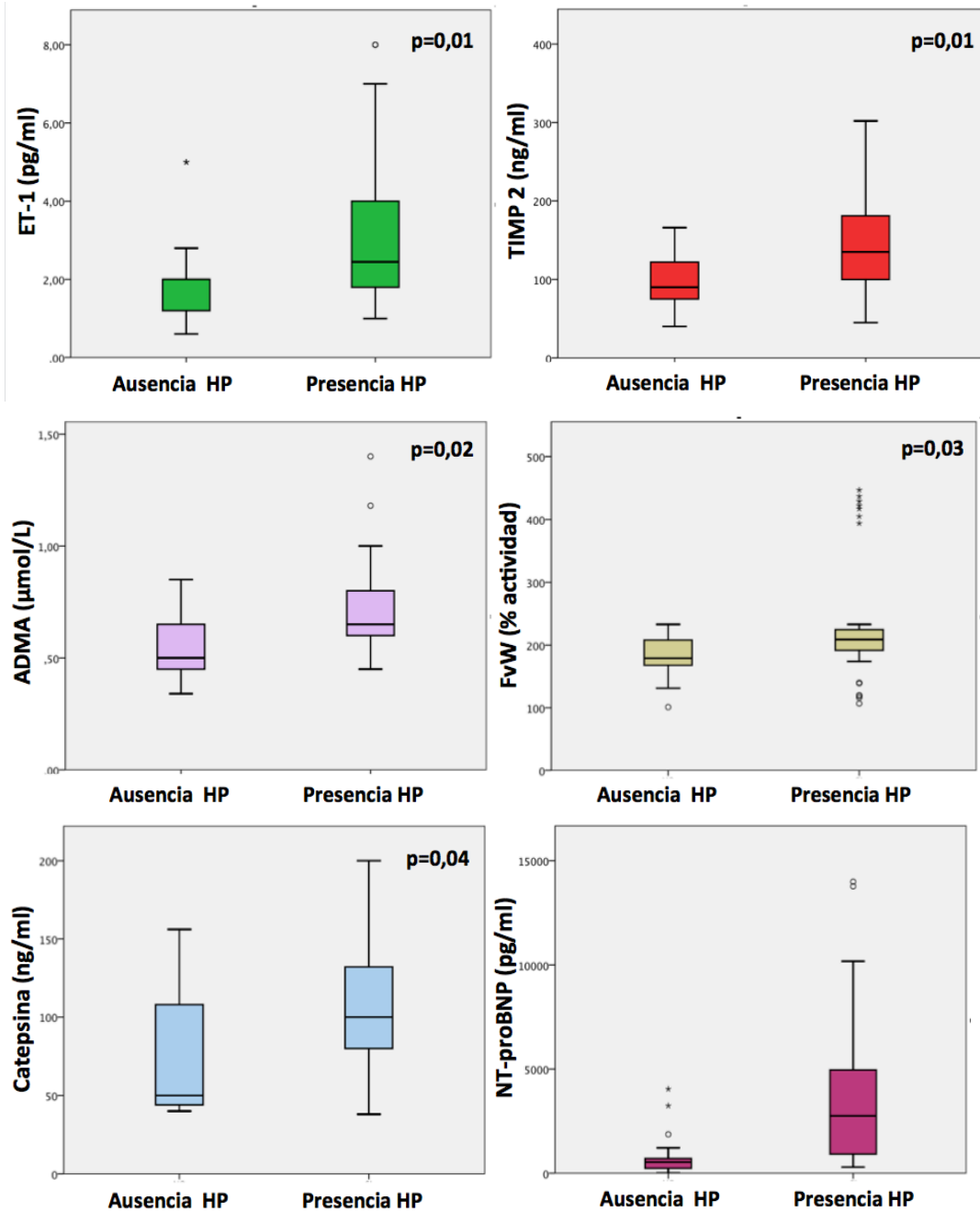
NHP: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPM: hipertensión pulmonar mixta; ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; TRCP 6: Receptor transitorio de potencial canal de cationes subfamilia C miembro 6; ADMA: dimetil arginina asimétrica; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral

Figura 30: Diagrama de cajas para varias proteínas analizadas que alcanzaron resultados significativos entre los distintos grupos analizados



NPH: sin hipertensión pulmonar; HPP; hipertensión pulmonar poscapilar; HPMR: hipertensión pulmonar mixta reversible; HPMI: hipertensión pulmonar mixta irreversible; HPM: hipertensión pulmonar mixta; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; ADMA: dimetil arginina asimétrica.

Figura 31: Diagrama de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron resultados significativos entre pacientes con y sin hipertensión pulmonar



ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; ADMA: dimetil arginina asimétrica; FvW: factor von Willebrand; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral

4.3. Detección de la presencia o no del componente precapilar de la hipertensión pulmonar

La tabla 23 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística o presentaron tendencia a la significación al comparar los pacientes con componente precapilar de la hipertensión pulmonar con aquellos que no lo presentaron (hipertensión pulmonar poscapilar aislada). Se consideró el componente precapilar en función del GTP y del DPD.

TABLA 23: Proteínas que alcanzaron la significación estadística diferenciando ausencia y presencia de componente precapilar de la HP (t-Student)			
Componente precapilar como GTP ≥ 12 mmHg			
	Poscapilar	Precapilar	p
APJ (pg/ml)	58,83 \pm 28,08	43,00 \pm 15,20	*0,04
Cromogranina A (ng/ml)	198,71 \pm 209,73	105,41 \pm 146,23	0,05
Componente precapilar como DPD ≥ 7 mmHg			
VEGF (pg/ml)	150,3 \pm 124,6	283,3 \pm 281,1	*0,01
ANGPTL4 (pg/ml)	789,74 \pm 504,9	521,7 \pm 298,9	0,07
Osteocrina (ng/ml)	7,56 \pm 2,11	6,31 \pm 1,69	0,08
APJ: receptor de apelina; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; ANGPTL4: angiopoietina like 4;			

De nuevo, únicamente 2 proteínas, APJ (p=0,04) por GTP y VEGF (p=0,01) por DPD obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes con y sin componente precapilar de la hipertensión pulmonar.

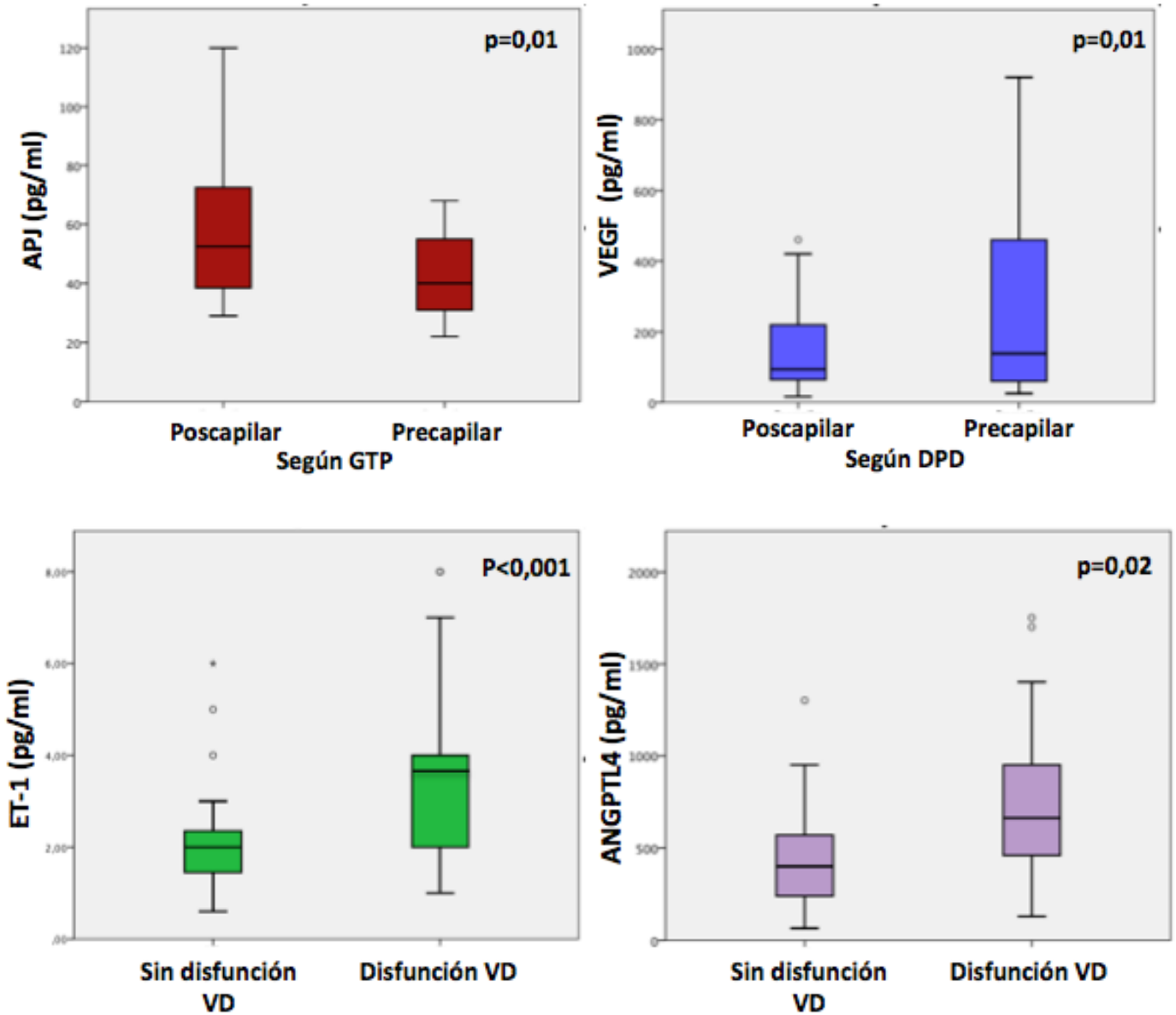
4.4. Detección de la disfunción ventricular derecha

La tabla 24 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística al comparar los pacientes con disfunción ventricular derecha significativa (moderada o severa) con aquellos que no lo presentaron.

TABLA 24: Proteínas que alcanzaron la significación estadística diferenciando ausencia y presencia de disfunción ventricular derecha (t-Student)			
	No disfunción VD	Disfunción VD	p
ET-1 (pg/ml)	2,07 ± 1,02	3,62 ± 1,85	*<0,001
ANGPTL4 (pg/ml)	461,67 ± 326,72	768,18 ± 441,19	*0,02
ET-1: endotelina 1; ANGPTL4: angiopoyetina like 4;			

Una vez más, únicamente 2 proteínas, ET-1 ($p < 0,001$) y ANGPTL4 ($p = 0,02$), obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes con y sin disfunción ventricular derecha.

Figura 32: Diagramas de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron resultados significativos entre pacientes con y sin componente precapilar y con y sin disfunción ventricular derecha.



APJ: receptor de apelina; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; ANGPTL4: angiopoyetina like 4; ET-1: endotelina 1;

4.5. Relación con el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses

La tabla 25 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística al comparar los pacientes que fallecieron o fueron trasplantados durante los 12 meses posteriores a la realización del cateterismo cardiaco derecho con los que no.

TABLA 25: Proteínas que alcanzaron la significación estadística en relación con el evento muerte o trasplante cardiaco (t-Student)

	Supervivientes	Muerte o TC	p
ET-1 (pg/ml)	2,22 ± 127	3,30 ± 1,76	*0,01
Galectina 1 (ng/ml)	16,69 ± 5,25	20,88 ± 6,45	*0,04
Cromogranina A (ng/ml)	77,53 ± 118,86	174,07 ± 200,91	*0,01
ADMA (uM/ml)	0,57 ± 0,13	0,74 ± 0,21	*0,01
Factor von Willebrand (%)	187 ± 57	257 ± 92	*0,01
NT-pro BNP (pg/ml)	1608 ± 2005	5253 ± 6494	*0,01

TC: trasplante cardiaco; ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; ADMA: dimetil arginina asimétrica; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral

Un total de 6 proteínas; ET-1 (p=0,01), Galectina 1 (p=0,04), Cromogranina A (p=0,01), ADMA (p=0,01), fvW (p=0,01) y NT-proBNP (p=0,01) obtuvieron diferencias significativas entre que fallecieron y fueron trasplantados y los que no.

4.6. Correlación con parámetros hemodinámicos

Se produjeron múltiples correlaciones entre las proteínas analizadas y los parámetros hemodinámicos medidos en el CCD (PAD, PsAP, PdAP, PAPm, PCP, GC y RVP), aunque la gran mayoría fueron de escasa entidad ($R < 0,5$). En la tabla 26 quedan recogidos aquellos que, siendo significativos, presentaron un coeficiente de correlación de Pearson ($R > 0,4$).

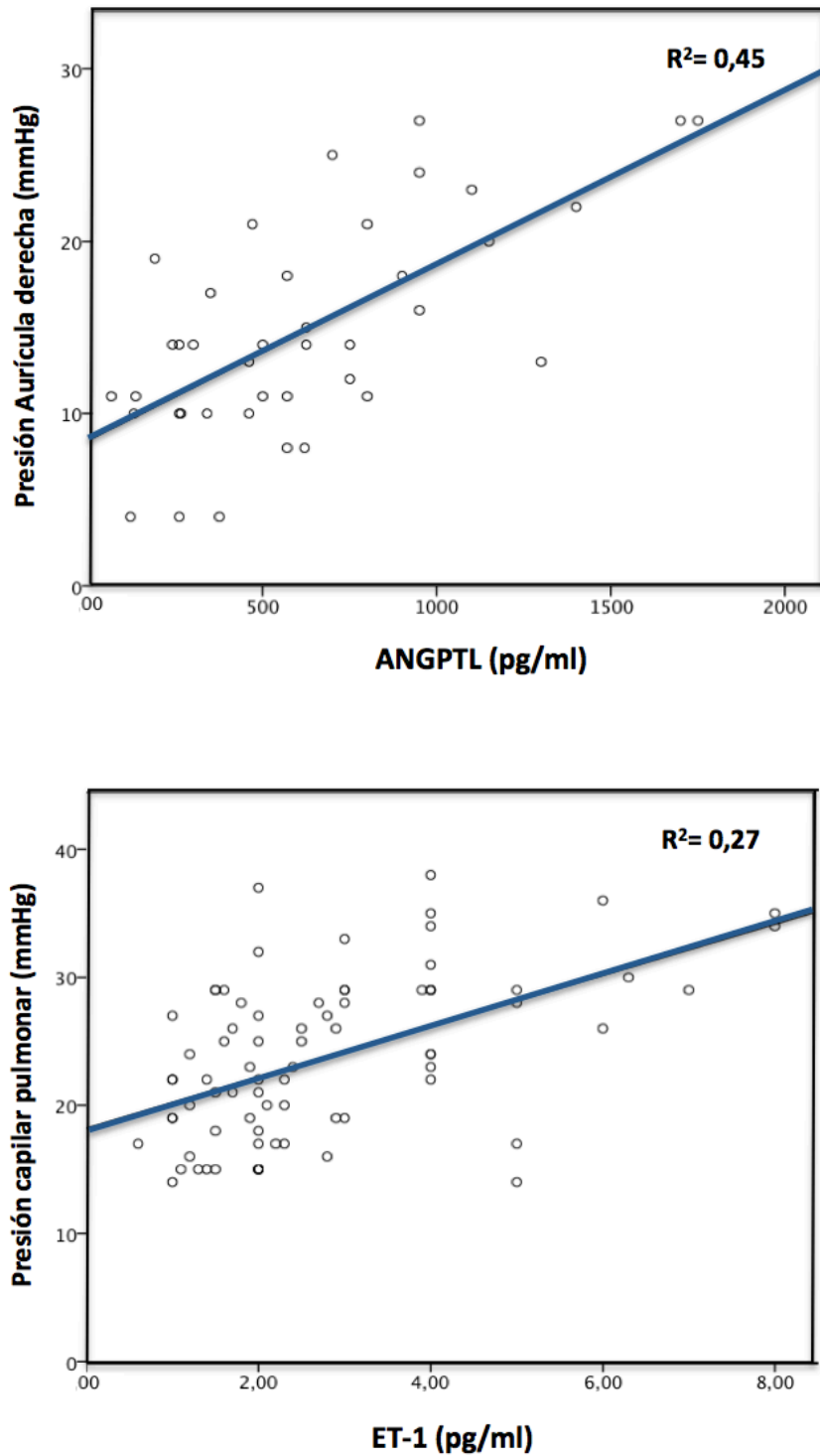
TABLA 26: Relación de proteínas y sus correlaciones significativas con parámetros hemodinámicos (R de Pearson)

Proteína	Parámetro hemodinámico	R	p
ET-1	PAD	0,41	<0,001
	PdAP	0,45	<0,001
	PCP	0,52	<0,001
	RVP	0,44	<0,001
ANGPTL4	PAD	0,67	<0,001
	PCP	0,46	0,01
Catepsina B	PAD	0,45	0,01
APJ	PAD	0,43	0,01
Troponina T	RVP	0,41	<0,001
NT-pro BNP	PdAP	0,41	<0,001
	PCP	0,43	<0,001

ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; ANGPTL4: angiopoyetina like 4; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral; APJ: receptor de apelina; PAD: presión de aurícula derecha; PdAP: presión diastólica de arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; RVP: resistencias vasculares pulmonares.

La figura 33 recoge la representación gráfica de aquellas correlaciones que obtuvieron un coeficiente de correlación mayor de 0,5.

Figura 33: Correlaciones entre proteínas y parámetros hemodinámicos con un coeficiente R mayor de 0,5



ANGPTL4: angiopoyetina like 4; ET-1: endotelina 1;

La angiopoyetina like 4 mostró una correlación significativa ($p < 0,001$) con la presión de aurícula derecha con un coeficiente de correlación de Pearson 0,67. Por su parte la ET-1 mostró correlación significativa ($p < 0,001$) con la presión capilar pulmonar, con un coeficiente de correlación de 0,52.

4.7. Pacientes con miocardiopatía dilatada

Si en lugar de los 79 pacientes consideramos únicamente aquellos pacientes con una determinada causa de su cardiopatía, los resultados varían sustancialmente. En la muestra se incluyeron un total de 22 pacientes con miocardiopatía dilatada.

La tabla 27 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística en el subgrupo de pacientes con MCD en alguna de las relaciones que hemos analizado previamente en la muestra completa.

Al comparar los pacientes según los cuatro grupos hemodinámicos del estudio, tres proteínas, catepsina B ($p = 0,02$), osteocrina ($p = 0,03$) y ADMA ($p = 0,01$) obtuvieron diferencias significativas. Si agrupamos a los pacientes con HP mixta en un solo grupo, en función del GTP, osteocrina y ADMA mantienen la significación estadística ($p = 0,01$ y $0,04$ respectivamente). Si la agrupación es en función del DPD, sólo ADMA la mantiene ($p = 0,04$).

TABLA 27: Listado de proteínas que han obtenido diferencias estadísticas significativas o correlación con parámetros hemodinámicos en pacientes con MCD

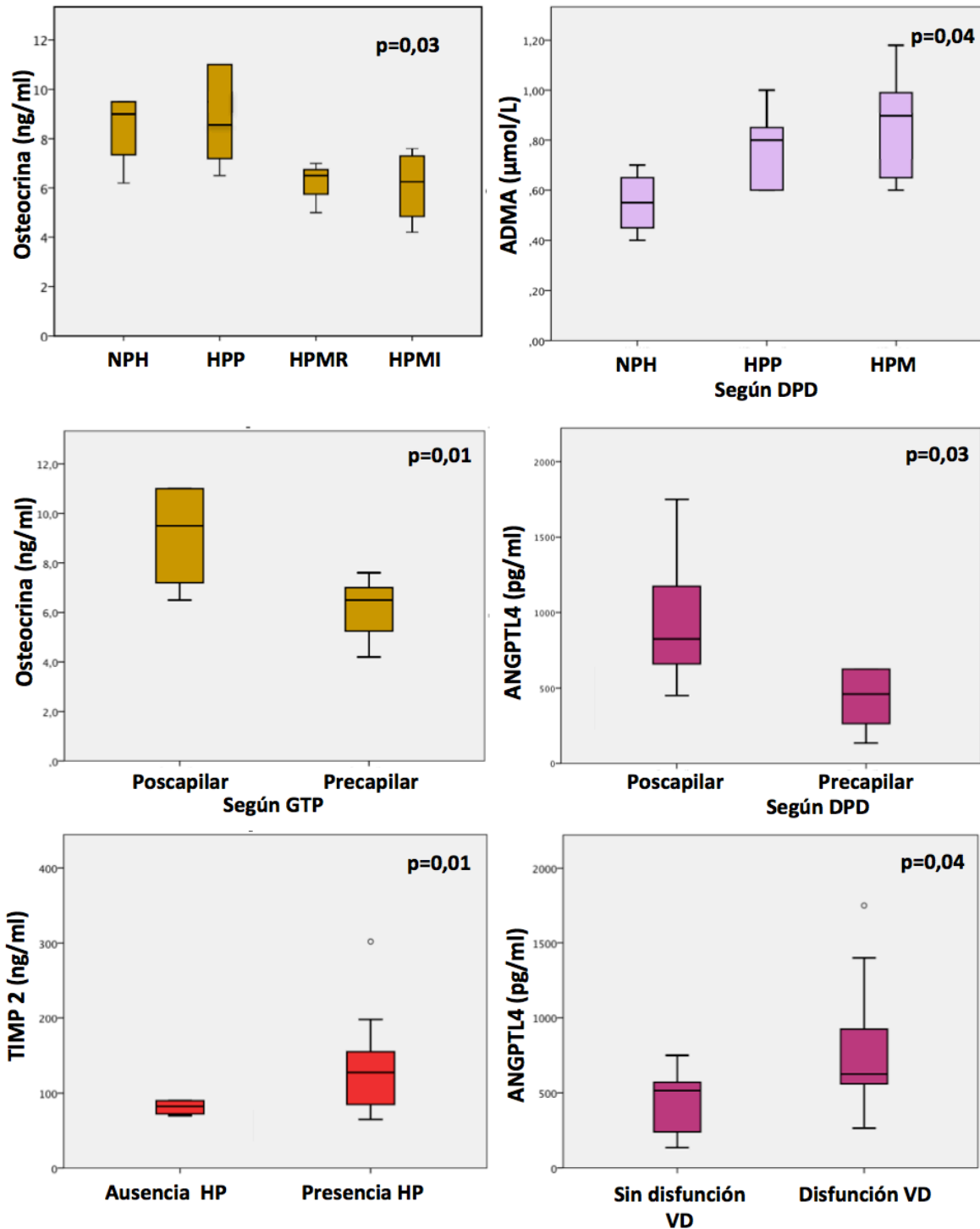
Factor	Proteína	p	
Grupo hemodinámico (4 grupos): NHP, HPP, HPMR, HPMI (ANOVA)	Catepsina B	0,02	
	Osteocrina	0,03	
	ADMA	0,01	
Grupo hemodinámico (3 grupos): NHP, HPP, HPM según GTP (ANOVA)	Osteocrina	0,01	
	ADMA	0,04	
Grupo hemodinámico (3 grupos): NHP, HPP, HPM según DPD (ANOVA)	ADMA	0,04	
Grupo hemodinámico (2 grupos): Presencia o no de HP (T-Student)	VEGF	0,01	
	TIMP2	0,01	
	Catepsina B	0,03	
	ADMA	0,02	
Presencia o no de componente precapilar por GTP (T-Student)	Osteocrina	0,01	
Presencia o no de componente precapilar por DPD (T-Student)	Endotelina-1	0,04	
	Angiopoyetina like 4	0,03	
Disfunción de VD (t-Student)	Angiopoyetina like 4	0,04	
Mortalidad o trasplante 12 meses (T-Student)	VEGF	0,01	
	ADMA	0,04	
Proteína	Parámetro hemodinámico	R	p
Endotelina-1	PAD	0,60	0,01
TIMP2	PAD	0,44	0,04
Angiopoyetina like 4	PAD	0,78	<0,001

Cromogranina A	PAD	0,63	0,01
Osteocrina	PdAP	-0,54	0,03
	GTP	-0,66	0,01
	DPD	-0,68	0,01
	RVP	-0,49	0,05
ADMA	PdAP	0,49	0,05
NT-pro BNP	PAD	0,65	0,01
	PCP	0,44	0,04
<p>MCD: miocardiopatía dilatada; ADMA: dimetil arginina asimétrica; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; PAD: presión de aurícula derecha; PsAP: presión sistólica de arteria pulmonar; PdAP: presión diastólica de arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; GTP; gradiente transpulmonar; DPD: diferencia diastólica de presiones; RVP: resistencias vasculares pulmonares.</p>			

Al comparar los pacientes sin hipertensión pulmonar con aquellos que si la presentaban, cuatro proteínas, VEGF ($p=0,01$), TIMP2 ($p=0,01$), catepsina B ($p=0,03$) y ADMA ($p=0,02$) obtuvieron diferencias significativas. Respecto a la detección del componente precapilar, si éste se consideró en función del GTP, únicamente la osteocrina ($p=0,01$) obtuvo resultados significativos, mientras que cuando se consideró en función del DPD, fueron dos proteínas, la ET-1 ($p=0,04$) y la ANGPTL4 ($p=0,03$), las que alcanzaron la significación estadística.

Únicamente una proteína, la ANGPTL4 ($p=0,04$), obtuvo diferencias significativas entre los pacientes con y sin disfunción ventricular derecha.

Figura 34: Diagramas de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron los resultados más significativos en pacientes con miocardiopatía dilatada

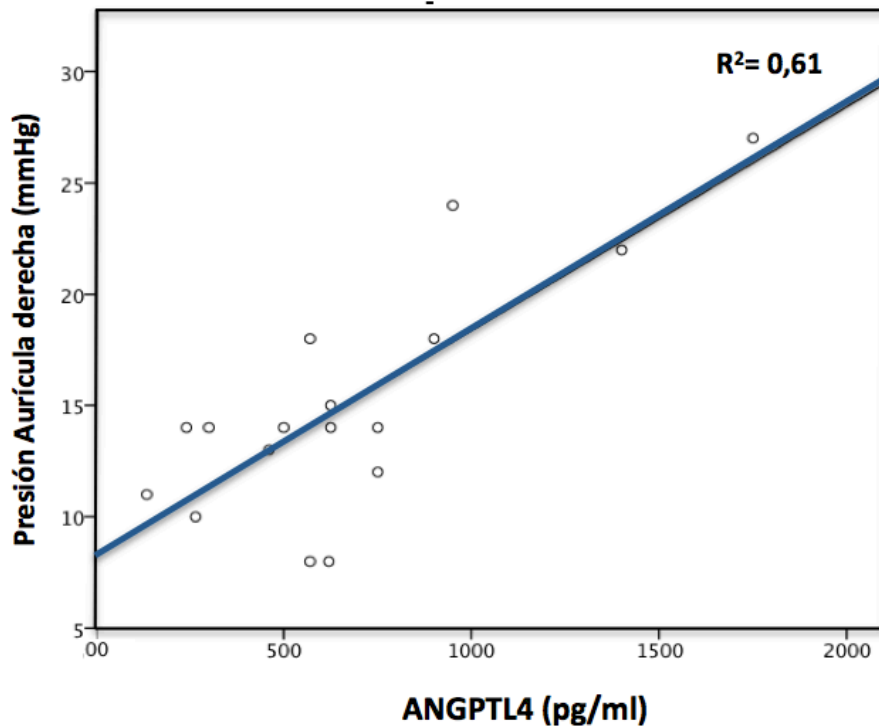


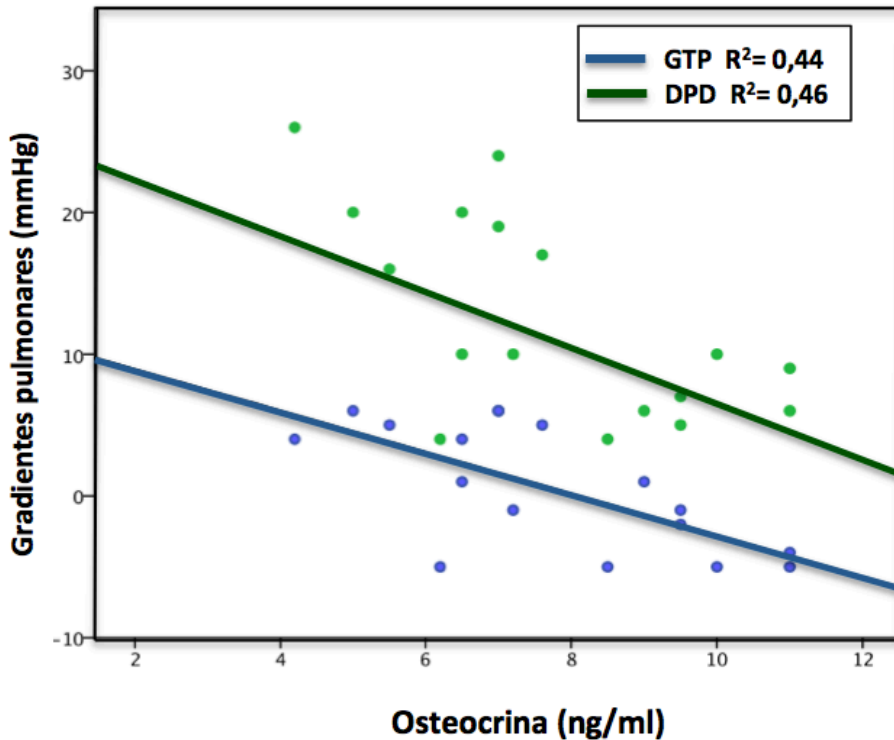
TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; ADMA: dimetil arginina asimétrica; ANGPTL4: angiopoyetina like 4;

Al comparar los pacientes que fallecieron o fueron trasplantados durante los 12 meses posteriores a la realización del cateterismo cardiaco derecho con los que no, fueron dos proteínas, VEGF ($p=0,01$) y ADMA ($p=0,04$) las que alcanzaron la significación estadística.

Al igual que en la muestra completa, se produjeron múltiples correlaciones de escasa entidad ($R<0,5$) entre las proteínas analizadas y los parámetros hemodinámicos. En la tabla 26 quedan recogidos aquellos con un coeficiente de correlación de Pearson (R) $> 0,4$. Entre ellos destaca la relación de la osteocrina con el GTP ($p=0,01$ y $R=-0,66$) y DPD ($p=0,01$ y $R=-0,68$) y de la ANGPTL4 con la PAD ($p<0,001$ y $R=0,78$). Las figuras 34 y 35 muestran algunos los resultados más significativos.

Figura 35: Correlaciones entre proteínas y parámetros hemodinámicos con un coeficiente R mayor de 0,5 en pacientes con miocardiopatía dilatada





ANGPTL4: angiopoyetina like 4; ET-1: endotelina 1;

4.8. Pacientes con cardiopatía isquémica

Al igual que con la MCD, si en lugar de los 79 pacientes consideramos únicamente aquellos con cardiopatía isquémica (31), los resultados varían sustancialmente.

La tabla 28 recoge las proteínas que alcanzaron significación estadística en el subgrupo de pacientes con CI en alguna de las relaciones que hemos analizado previamente en la muestra completa.

Al comparar los pacientes según los cuatro grupos hemodinámicos del estudio, sólo una proteína, la TIMP2 ($p=0,02$), obtuvo diferencias significativas. Si agrupamos a los pacientes con HP mixta en un solo

grupo en función del GTP, TIMP2 y cromogranina mantienen la significación estadística ($p=0,01$ y $0,03$ respectivamente). Si la agrupación es en función del DPD, aparecen VEGF ($p=0,02$) y ET-1 ($p=0,03$) como variables con diferencias estadísticamente significativas.

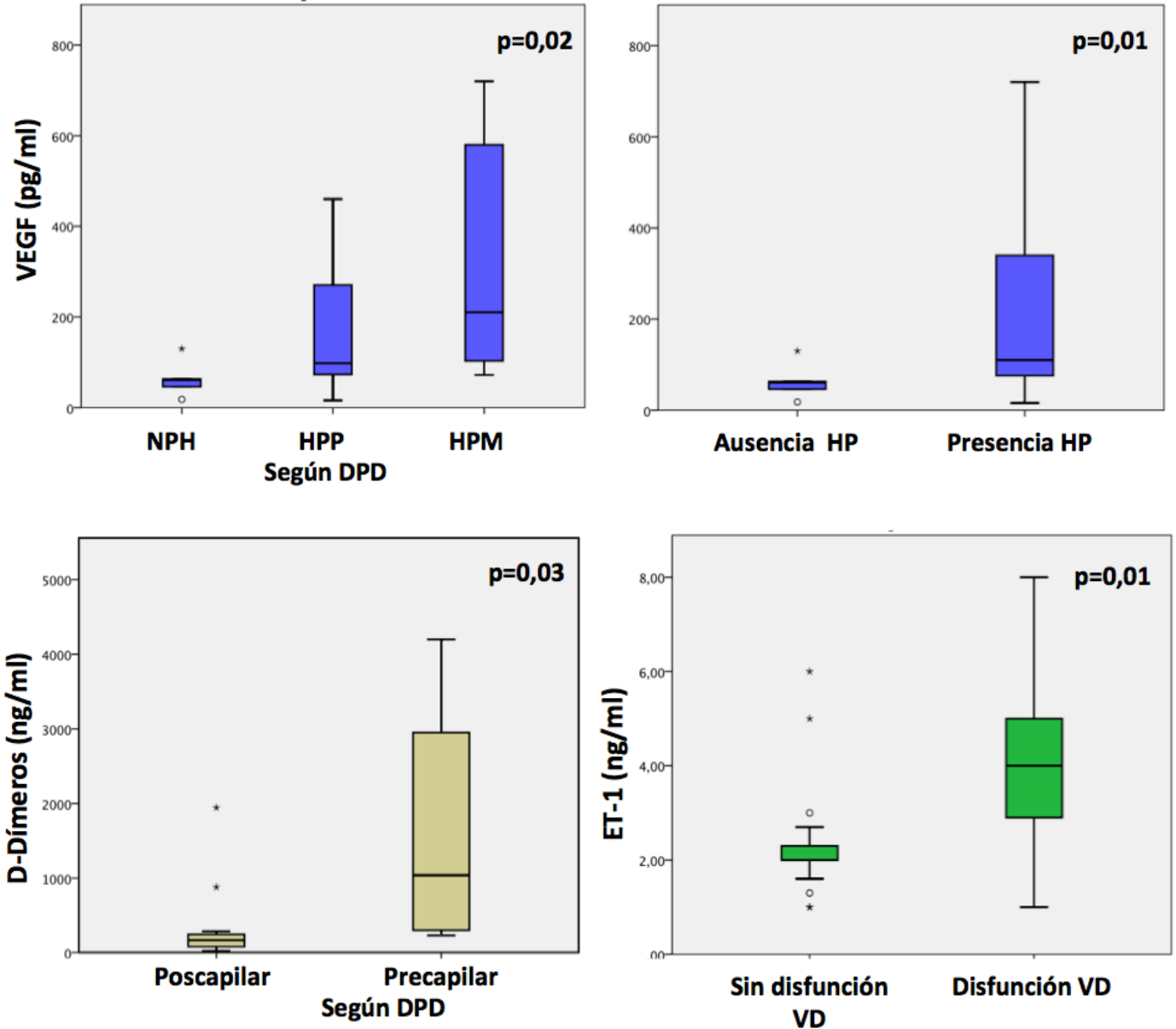
TABLA 28: Listado de proteínas que han obtenido diferencias estadísticas significativas o correlación con parámetros hemodinámicos en pacientes con CI

Factor	Proteína	p
Grupo hemodinámico (4 grupos): NHP, HPP, HPMR, HPMI (ANOVA)	TIMP2	0,02
Grupo hemodinámico (3 grupos): NHP, HPP, HPM según GTP (ANOVA)	TIMP2	0,01
	Cromogranina A	0,03
Grupo hemodinámico (3 grupos): NHP, HPP, HPM según DPD (ANOVA)	VEGF	0,02
	Endotelina-1	0,03
Grupo hemodinámico (2 grupos): Presencia o no de HP (T-Student)	VEGF	0,01
	Endotelina-1	0,03
	TIMP2	0,01
	NT-pro BNP	0,01
Presencia o no de componente precapilar por GTP (T-Student)	TIMP2	0,05
	Cromogranina A	0,04
Presencia o no de componente precapilar por DPD (T-Student)	VEGF	0,02
	D-Dímeros	0,03
Disfunción de VD (t-Student)	Endotelina-1	0,01
	Catepsina B	0,01
Mortalidad o trasplante 12 meses (T-Student)	VEGF	0,01
	MMP 7	0,03

Proteína	Parámetro hemodinámico	R	p
VEGF	GTP	0,47	0,01
	DPD	0,43	0,02
Endotelina-1	PAD	0,61	<0,001
	PsAP	0,63	<0,001
	PdAP	0,54	0,01
	PAPm	0,49	0,01
	PCP	0,61	<0,001
Catepsina B	PAD	0,51	0,01
	PsAP	0,44	0,03
	PdAP	0,51	0,01
	PCP	0,43	0,04
	RVP	0,46	0,02
Angiopoyetina like 4	PAD	0,63	0,01
	PsAP	0,62	0,01
	PdAP	0,47	0,02
	PAPm	0,48	0,02
	PCP	0,54	0,01
Troponina T	RVP	0,59	0,01
NT-pro BNP	PsAP	0,44	0,01
	PdAP	0,46	0,01
	PAPm	0,42	0,02
	RVP	0,54	0,01

ET-1: endotelina 1; TIMP 2: Inhibidor tisular de las metaloproteasas 2; ANGPTL4: angiopoyetina like 4; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; MMP7: metaloproteasa de matriz 7; PAD: presión de aurícula derecha; PsAP: presión sistólica de arteria pulmonar PdAP: presión diastólica de arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; RVP: resistencias vasculares pulmonares.

Figura 36: Diagramas de cajas para las proteínas analizadas que alcanzaron los resultados más significativos en pacientes con cardiopatía isquémica



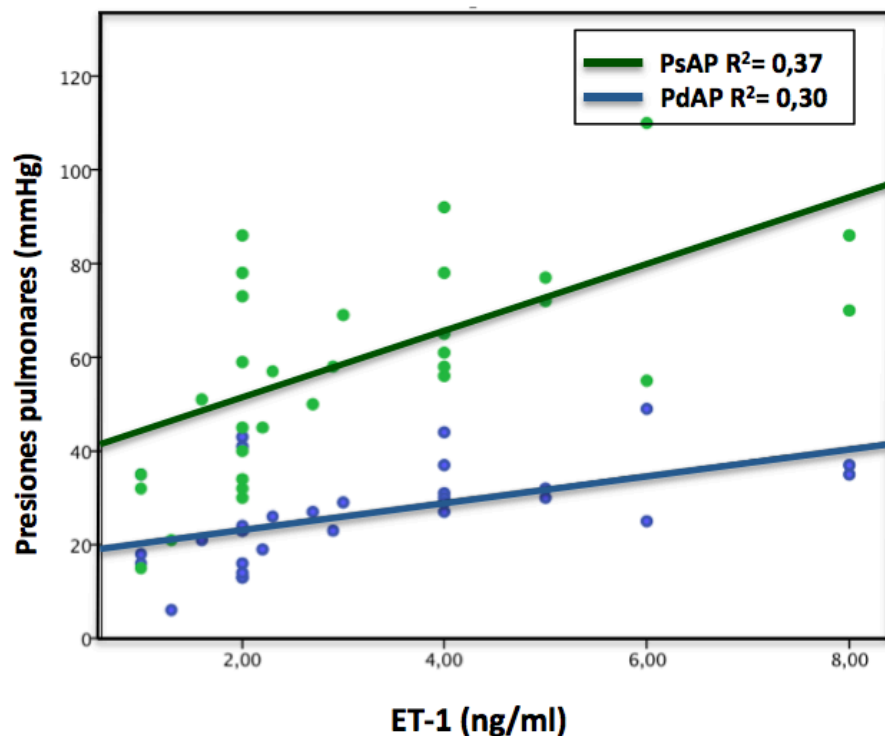
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial ; ET-1: endotelina 1; DPD: gradiente diastólico pulmonar

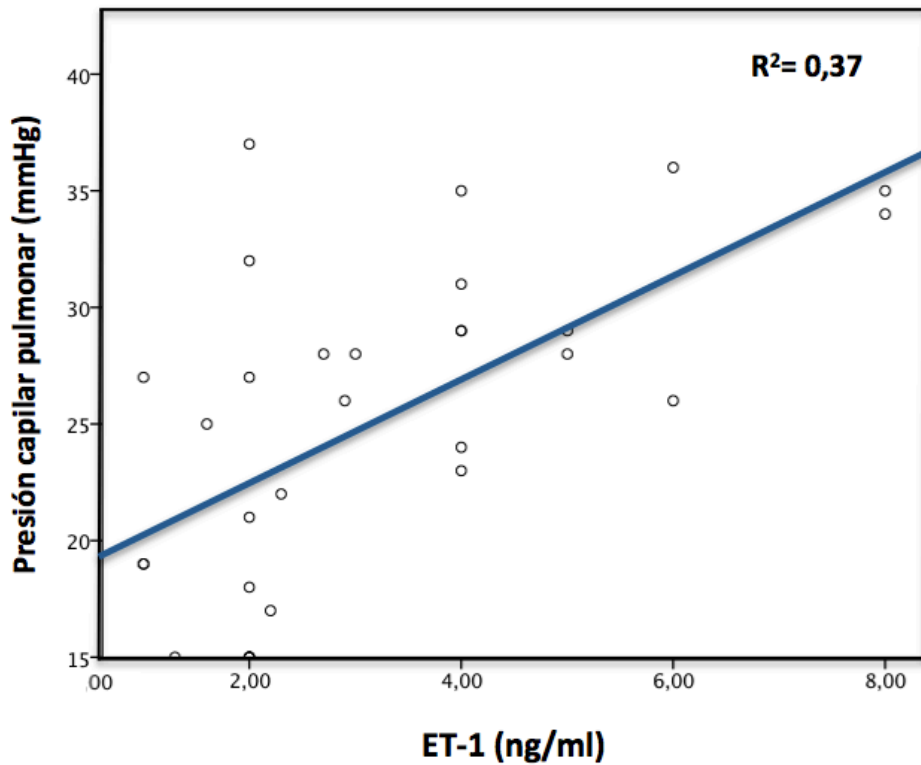
Al comparar los pacientes sin hipertensión pulmonar con aquellos que si la presentaban, cuatro proteínas, VEGF (p=0,01), TIMP2 (p=0,01), ET-1 (p=0,03) y NT-proBNP (p=0,01) obtuvieron diferencias significativas. Respecto a la detección del componente precapilar, si éste se consideró

en función del GTP, TIMP2 y cromogranina A ($p=0,05$ y $0,04$ respectivamente) obtuvieron resultados significativos, mientras que cuando se consideró en función del DPD, fueron dos proteínas, VEGF ($p=0,02$) y los D-Dímeros ($p=0,03$), las que alcanzaron la significación estadística.

Dos proteínas, la ET-1 ($p=0,01$) y la catepsina B ($p=0,01$) obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes con y sin disfunción ventricular derecha. Respecto a los pacientes que fallecieron o fueron trasplantados durante los 12 meses posteriores a la realización del cateterismo cardiaco derecho, fueron dos proteínas, VEGF ($p=0,01$) y MMP7 ($p=0,03$) las que alcanzaron la significación estadística.

Figura 37: Correlaciones entre proteínas y parámetros hemodinámicos con un coeficiente mayor de 0,5





ET-1: endotelina 1;

Al igual que en los análisis previos, se produjeron múltiples correlaciones entre las proteínas analizadas y los parámetros hemodinámicos de escasa entidad ($R < 0,5$). En la tabla 26 quedan recogidos aquellos con un coeficiente de correlación de Pearson (R) $> 0,4$. Entre ellos destaca la relación de la ET-1 con la PAD ($p < 0,001$ y $R = 0,61$), PsAP ($p < 0,001$ y $R = 0,63$) y PCP ($p < 0,001$ y $R = 0,61$) y de la ANGPTL4 con la PAD ($p = 0,01$ y $R = 0,63$) y PsAP ($p = 0,01$ y $R = 0,62$). Las figuras 36 y 37 muestran algunos los resultados más significativos.

4.9. Curvas ROC y puntos de corte para cada uno de los objetivos del estudio.

En el presente apartado realizamos para cada uno de los siguientes objetivos propuestos: presencia o no de HP, presencia o no de componente precapilar y presencia o no de disfunción derecha significativa; una curva ROC con cada una de las proteínas que obtuvieron diferencias significativas tanto en la muestra completa, como en los subgrupos de MCD y MCI.

Sólo consideramos aquellas curvas COR que mostraron un área bajo la curva mayor de 0,75. Para cada una de las curvas destacamos además, el punto de corte que ha mostrado la sensibilidad y especificidad más altas. Estos datos quedan recogidos en la tabla 29 y la figura 38.

TABLA 29: Listado de proteínas que han obtenido un área bajo la curva mayor de 0,75 en la curva ROC en la muestra completa, y en los subgrupos de MCD y MCI para cada uno de los objetivos marcados.

Muestra completa					
Objetivo	Proteína	AUC	Punto corte	S	E
Presencia o no de HP	TIMP2 ng/ml	0,75	107,5	0,71	0,71
	ADMA um/L	0,75	0,55	0,91	0,67
	NT-proBNP pg/ml	0,83	635	0,85	0,71
Disfunción de VD	ET-1 pg/ml	0,76	2,15	0,72	0,68
MCD					
Presencia o no de HP	TIMP2 ng/ml	0,76	92,5	0,69	0,75
	Catepsina B ng/ml	0,83	65	0,92	0,75
	ADMA um/L	0,86	0,65	0,70	0,75

Presencia o no de componente precapilar por GTP	Osteocrina ng/ml	0,89	7,1	0,83	0,86
Presencia o no de componente precapilar por DPD	ANGPTL4 ng/ml	0,85	687,5	0,79	0,81
Disfunción de VD	ANGPTL4 ng/ml	0,78	595	0,73	0,83
MCI					
Presencia o no de HP	VEGF pg/ml	0,85	63,50	0,92	0,84
	ET-1 pg/ml	0,83	2,1	0,78	0,82
	TIMP2 ng/ml	0,81	87,5	0,76	0,84
	NT-proBNP pg/ml	0,91	1355	0,79	0,84
Presencia o no de componente precapilar por DPD	D-Dímeros ng/ml	0,86	330	0,75	0,85
Disfunción de VD	ET-1 pg/ml	0,80	2,8	0,79	0,83
	Catepsina B ng/ml	0,80	86	0,73	0,75
<p>AUC: área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; MCD: miocardiopatía dilatada; MCI: miocardiopatía isquémica; ADMA: dimetil arginina asimétrica; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; TIMP2; inhibidor tisular de metaloproteasas 2; ANGPTL4: angiopoyetina like 4; GTP; gradiente transpulmonar; DPD: diferencia diastólica de presiones.</p>					

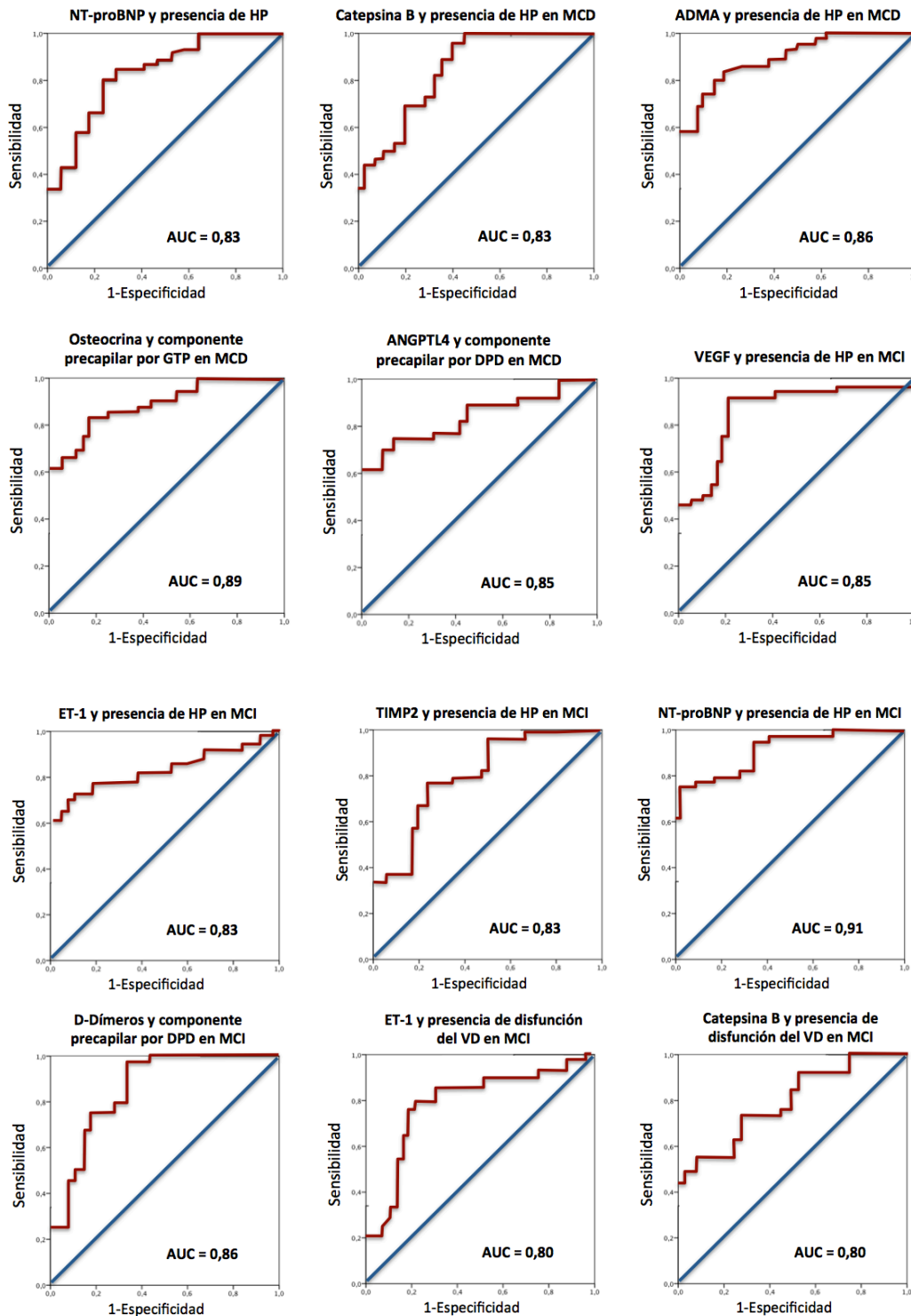
Las proteínas más destacadas fueron:

- TIMP2:
 - a) AUC de 0,75 para detección de HP en la muestra completa. El punto de corte de 107,5 ng/ml obtuvo una S y una E del 71%.
 - b) AUC de 0,76 para detección de HP en pacientes con MCD. El punto de corte de 92,5 ng/ml obtuvo una S de 69% y una E del 75%.

- c) AUC de 0,81 para detección de HP en pacientes con MCI. El punto de corte de 87,5 ng/ml obtuvo una S de 76% y una E del 84%.
- ADMA:
 - a) AUC de 0,75 para detección de HP en la muestra completa. El punto de corte de 0,55 $\mu\text{M}/\text{ml}$ obtuvo una S del 85% y una E del 71%.
 - b) AUC de 0,86 para detección de HP en pacientes con MCD. El punto de corte de 0,55 $\mu\text{M}/\text{ml}$ obtuvo una S de 70% y una E del 75%.
- NT-proBNP:
 - a) AUC de 0,83 para detección de HP en la muestra completa. El punto de corte de 635 pg/ml obtuvo una S del 91% y una E del 67%.
 - b) AUC de 0,91 para detección de HP en pacientes con MCI. El punto de corte de 1355 pg/ml obtuvo una S del 79% y una E del 84%.
- ET-1:
 - a) AUC de 0,83 para detección de HP en pacientes con MCI. El punto de corte de 2,1 pg/ml obtuvo una S de 78% y una E del 82%.
 - b) AUC de 0,76 para detección de disfunción del VD en la muestra completa. El punto de corte de 2,1 pg/ml obtuvo una S del 72% y una E del 68%.
 - c) AUC de 0,80 para detección de disfunción del VD en pacientes con MCI. El punto de corte de 2,8 pg/ml obtuvo una S del 79% y una E del 83%.
- Catepsina B:
 - a) AUC de 0,83 para detección de HP en pacientes con MCD. El punto de corte de 65 ng/ml obtuvo una S de 92% y una E del 75%.

- b) AUC de 0,80 para detección de disfunción del VD en pacientes con MCI. El punto de corte de 86 ng/ml obtuvo una S del 73% y una E del 75%.
- Osteocrina:
 - a) AUC de 0,89 para detección de componente precapilar de la HP medido por GTP en pacientes con MCD. El punto de corte de 7,1 ng/ml obtuvo una S de 83% y una E del 85%.
- ANGPTL4:
 - a) AUC de 0,85 para detección de componente precapilar de la HP medido por DPD en pacientes con MCD. El punto de corte de 687 ng/ml obtuvo una S de 79% y una E del 81%.
 - b) AUC de 0,80 para detección de disfunción del VD en pacientes con MCD. El punto de corte de 595 ng/ml obtuvo una S del 73% y una E del 83%.
- VEGF:
 - a) AUC de 0,85 para detección para detección de HP en pacientes con MCI. El punto de corte de 63,50 pg/ml obtuvo una S del 92% y una E del 84%.
- D-Dímeros:
 - a) AUC de 0,86 para detección de componente precapilar de la HP medido por DPD en pacientes con MCI. El punto de corte de 330 ng/ml obtuvo una S de 75% y una E del 85%.

Figura 38: Representación gráfica de las curvas COR con un área bajo la curva mayor de 0,80 para cada uno de los objetivos marcados.



AUC: área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; MCD: miocardiopatía dilatada; MCI: miocardiopatía isquémica; ADMA: dimetil arginina asimétrica; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; TIMP2; inhibidor tisular de metaloproteasas 2; ANGPTL4: angiopoyetina like 4; GTP; gradiente transpulmonar; DPD: diferencia diastólica de presiones.

5. Análisis multivariado

Para realizar el análisis multivariado mediante regresión logística binaria hemos considerado todas aquellas variables antropométricas, ecocardiográficas y analíticas más relevantes. Se han tenido que excluir de este análisis aquellas proteínas que sólo han sido medidas en la mitad de los pacientes por no llegar al número mínimo para que los modelos de regresión fueran válidos. Por ese mismo motivo, no fue posible realizar análisis multivariados en los subgrupos de pacientes con MCD y MCI.

Los resultados del análisis estadístico quedan recogidos en las siguientes tablas: para la presencia de HP en la tabla 30, para la presencia de componente precapilar en la tabla 31, y para la detección de la disfunción ventricular derecha, en la tabla 32.

Fueron predictores independientes de la aparición de HP el llenado patológico del VI (considerado como disfunción diastólica grado II o superior) con una OR de 164 ($p=0,02$) y los niveles de TIMP2 con una OR de 1,10 ($p=0,02$).

Respecto al componente precapilar de la HP, sólo se ha podido incluir proteínas del ELISA en el análisis realizado en HPM por gradiente diastólico, siendo predictores independientes de HP precapilar la disfunción del VD con una OR de 10,6 ($p=0,03$) y los niveles de VEGF 1,06 ($p=0,01$). En la HPM por GTP, fueron predictores independientes del componente precapilar el llenado patológico del VI con una OR de 18,68

($p=0,02$), la disfunción del VD con una OR de 4,88 ($p=0,04$) y el IMC con una OR de 1,32 ($p=0,01$).

Por último, fueron predictores independientes de disfunción del VD, la disfunción del VI (FEVI $<40\%$), con una OR de 9,69 ($p=0,03$) y los niveles de ET-1, con una OR de 1,78 ($p=0,02$).

TABLA 30: Asociación entre las distintas variables analizadas y la presencia o no de HP en la muestra completa

Covariable	OR	IC(95%)	p
DTDVI (mm)	1,12	0,98 – 1,28	0,10
Disfunción VI (FEVI < 40%)	9,4	0,2 – 429,7	0,25
Llenado VI patológico	163,9	2,1 – 128,7	0,02
Bilirrubina (mg/dl)	10,8	0,74 – 158,3	0,08
ET-1 (pg/ml)	0,61	0,28 – 1,35	0,22
NT-proBNP (pg/ml)	1,001	1,00 – 1,05	0,09
TIMP 2 (ng/ml)	1,10	1,02 – 1,12	0,02
FvW (%)	1,01	0,98 – 1,04	0,48

DTV: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; TIMP2; inhibidor tisular de metaloproteasas 2; ET-1: endotelina 1; FvW: factor von Willebrand; NT-proBNP: fragmento N terminal del péptido natriurético cerebral

* significativo con $p < 0,05$

TABLA 31: Asociación entre las distintas variables analizadas y la presencia o no de componente precapilar en la muestra completa

Componente precapilar por GTP			
Covariable	OR	IC(95%)	p
DTDVI (mm)	1,01	0,95 – 1,08	0,84
Disfunción VI (FEVI < 40%)	0,23	0,33 – 1,56	0,06
Llenado VI patológico	18,68	1,67– 208,24	0,02
Bilirrubina (mg/dl)	2,13	0,64 – 7,11	0,22
IMC (kg/m²)	1,32	1,06 – 1,64	0,01
Disfunción VD	4,88	1,01 – 23,87	0,04
Componente precapilar por DPD			
Covariable	OR	IC(95%)	p
DTDVI (mm)	1,02	0,94 – 1,06	0,96
Disfunción VI (FEVI < 40%)	0,19	0,26 – 1,31	0,10
Llenado VI patológico	27,1	0,80 – 918,95	0,06
Bilirrubina (mg/dl)	1,68	0,60– 4,73	0,32
IMC (kg/m ²)	1,11	0,92– 1,34	0,27
Disfunción VD	10,62	1,33 – 84,63	0,03
VEGF (pg/ml)	1,06	1,02– 1,11	0,01
DTVI: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; * significativo con p< 0,05			

TABLA 32: Asociación entre las distintas variables analizadas y la presencia o no de disfunción ventricular derecha en la muestra completa

Covariable	OR	IC(95%)	p
DTDVI (mm)	0,96	0,89 – 1,03	0,28
Disfunción VI (FEVI < 40%)	9,69	1,26 – 74,33	0,03
Llenado VI patológico	0,86	0,66 – 4,62	0,67
Bilirrubina (mg/dl)	2,25	0,90 – 5,65	0,08
IMC (kg/m ²)	0,97	0,83 – 1,14	0,74
ET-1 (pg/ml)	1,78	1,10 – 2,89	0,02

DTVI: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; ET-1: endotelina 1
* significativo con p< 0,05

VI. DISCUSIÓN

El presente trabajo pretende seleccionar un perfil de proteínas que puedan ser potencialmente útiles para la clasificación de los pacientes en los distintos tipos diagnósticos de HPCI. Como se ha comentado anteriormente, la HPCI es la causa más prevalente de HP, y su presencia empeora el pronóstico de los pacientes que la padecen. Sin embargo, a día de hoy, no existe una forma no invasiva de realizar el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, ni tampoco un tratamiento adecuado orientado a los distintos perfiles de esta enfermedad.

1. Diseño e inclusión de pacientes.

Los trabajos publicados en la literatura sobre biomarcadores en HP, muestran por lo general un tamaño muestral reducido, comprendido generalmente entre 20 y 81 pacientes^{233-34, 243, 261, 267.68, 280, 288, 290}. Si nos circunscribimos a nuestro tema de interés, que es la HPCI, los estudios publicados son escasos^{128,248-50,256}, y las muestras aún más reducidas, comprendidas entre 14 y 52 pacientes. La excepción a esta tendencia la tiene el estudio de Hayabuchi et al²⁵¹, que incluyó a un total de 238 pacientes intervenidos de una cardiopatía congénita y midió la relación del H-FABP con una serie de parámetros clínicos y hemodinámicos, entre ellos las presiones pulmonares. El presente estudio, con un tamaño muestral de 79 pacientes, supone el mayor estudio sobre biomarcadores en HPCI realizado hasta la fecha.

Durante los 27 meses que duró el periodo de inclusión, se ofreció la participación en el estudio a un total de 113 pacientes. No obstante, de

estos 113, 34 no llegaron a ser incluidos por diversos motivos. Las causas más frecuentes fueron: el rechazo a la participación en el estudio (12 pacientes), proporción que consideramos admisible puesto que a un considerable porcentaje de pacientes se les ofreció la participación justo antes de realizarse el CCD en el laboratorio de hemodinámica; y la existencia de otras causas de HP distintas a la cardíaca (12 pacientes), como es el caso de pacientes con comorbilidades como las broncopatías severas (10) o la esclerodermia (1).

El seguimiento de los pacientes se realizó durante los 12 meses posteriores al CCD. De los 79 pacientes que finalmente se incluyeron, no hubo ninguna pérdida de seguimiento. No obstante, a esa fecha, un 51,2% de los pacientes había sido trasplantado o había fallecido, por lo que la supervivencia global de la muestra a 1 año fue de tan sólo un 48,8%. Este dato no es de extrañar, ya que como se ha comentado previamente, esta muestra no es totalmente representativa de la población de pacientes con HPCI, puesto que está sesgada, debido a que por las características de nuestro servicio (que es de referencia en insuficiencia cardíaca avanzada y trasplante cardíaco) los pacientes atendidos representan el espectro más grave de la enfermedad. Por tanto el impacto de la información obtenible de la naturaleza prospectiva del estudio es limitado.

El proyecto definitivo se presentó al Comité Ético del Hospital Universitari i Politècnic La Fe en febrero de 2012, obteniendo su aprobación definitiva en abril del mismo año, al poco de comenzar el periodo de inclusión. El período de inclusión se prolongó hasta junio de 2014, si bien, en octubre de 2013 se dispuso ya de las 32 muestras

necesarias para proceder a la realización del panel de proteínas (microarray), como se había dispuesto al diseñar el cronograma de trabajo.

2. Método empleado: microarray y ELISA

Uno de los puntos más destacables del presente proyecto es el novedoso enfoque que se ha hecho para la búsqueda de potenciales biomarcadores en HPCI. Como se ha documentado con anterioridad, las publicaciones en este campo hasta la fecha son escasas, y mucha de la información disponible sobre marcadores de HPCI la derivamos de los trabajos realizados en HAP y otros tipos de HP.

Por ello, con el objetivo de ampliar la búsqueda a otras proteínas no estudiadas hasta la fecha en este campo, se solicitó a una empresa externa (laboratorios Tebu-bio, París, Francia) la realización de un panel proteico en el que se analizaron un total de 1.000 proteínas en muestras agrupadas de suero de pacientes. El método de detección de proteínas en este *microarray* está basado en inmunofluorescencia (anticuerpos específicos impregnados en la placa + proteína biotinilada + estreptavidina- cianina Cy3). La lectura de intensidad de fluorescencia mediante un escáner láser nos aporta información semicuantitativa.

El panel seleccionado se denomina Human L-series 1.000 Ref. 126AAH-BLG-1000 y está comercializado por RayBiotech, (RayBiotech Inc, Norcross, Georgia, Estados Unidos). Se seleccionó este microarray, entre otras plataformas disponibles en el mercado, por ser la más

extensa, incluyendo una amplia colección de proteínas involucradas en mecanismos relacionados con la fisiopatología de la HP como la disfunción endotelial, factores angiogénicos, proteasas de matriz, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, proteínas de la coagulación, etc. La ejecución del panel con el array de proteínas se llevó a cabo en febrero de 2014.

No obstante, la elección de este método y este panel en concreto, presenta una serie de limitaciones que no podemos obviar. Primero, a pesar de las más de 1000 proteínas incluidas, no estaban en la placa todas aquellas potencialmente interesantes como por ejemplo la ET-2, la NOS, o varios péptidos natriuréticos. Segundo, realizar tantos análisis (1000) puede ser pernicioso. Cuando la cantidad de análisis realizados es tan numerosa, la posibilidad de obtener resultados espurios aumenta substancialmente. Tercero, cada muestra analizada en el array estaba formada por una muestra agrupada de 8 individuos. En estas condiciones, valores extremos en pacientes aislados afectan notablemente a la medición final, pudiendo llevar a lecturas erróneas de la intensidad de señal.

Las proteínas seleccionadas a partir del panel de proteínas y aquellas que ya habían sido previamente descritas en la literatura como potencialmente útiles se analizaron de forma cuantitativa mediante el método de enzimoimmunoensayo (ELISA) con la utilización de kits comerciales de anticuerpos frente a las diferentes proteínas seleccionadas. La medición se realizó, en su mayor parte, en los laboratorios dependientes de la Unidad de Hemostasia y Trombosis de la Torre A de Investigación del Hospital La Fe de Valencia entre los meses

de abril y julio de 2015. Sin embargo, por la necesidad de optimizar los recursos económicos disponibles para el presente proyecto, aquellas proteínas a medir que se encuentran disponibles dentro de la cartera de servicios del servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitari i Politènic La Fe, fueron analizadas en los laboratorios dependientes del citado servicio, utilizando sus instalaciones, equipamiento y reactivos. En todo momento, las mediciones fueron llevadas a cabo por personal vinculado al presente proyecto de investigación.

Como hemos comentado, la posibilidad de medir mediante ELISA un determinado número de proteínas venía condicionada por los recursos económicos disponibles para financiar la compra de los kits comerciales de anticuerpos. Aunque el presente proyecto cuenta con financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III mediante una beca FIS, la dotación económica asignada para cada uno de los ejercicios es limitada, y el número de proteínas con potencial interés para su medición cuantitativa muy elevado.

A las 67 proteínas que obtuvieron diferencias significativas entre los grupos de estudio, se le unieron 4 más que no estaban incluidas en el microarray pero habían sido previamente descritas en la literatura en otros tipos de HP; y la ET-1 que pese a no obtener diferencias significativas en el panel de proteínas, su relevancia en la literatura publicada hacía recomendable su medición.

Así, de un total de 72 posibles proteínas, se han podido analizar 22 de ellas. Los criterios de selección de unas determinadas proteínas para este primer grupo de medición han sido económicos (ajuste del precio

de los kits comerciales al presupuesto disponible) y logísticos (disponibilidad por parte de los proveedores habituales en un tiempo razonable). Se priorizaron unas proteínas sobre otras en función de la evidencia disponible en la literatura de su posible relación con la HP, aún en modelos animales. Las proteínas escogidas fueron las siguientes:

- Las proteínas fibrinógeno, D-Dímeros, proteína S, factor von Willebrand, NT-proBNP, troponina T y homocisteína por poder ser medidas en el servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe sin suponer coste adicional al proyecto.
- Las proteínas ADMA, ET-1, VEGF, angiopoyetina like 4, TIMP 2 y MMP 7 se priorizaron por existir estudios previos en pacientes con HP.
- Las proteínas APJ, TRCP6, KLF4, catepsina B, osteocrina se seleccionaron por haber obtenido algunas de las diferencias más relevantes en el microarray.
- Las proteínas cromogranina A, FABP4, Galectina 1, FOXO1 se escogieron por criterios logísticos y económicos.

Por motivos de índole económica, en el presente ejercicio no se pudo adquirir el segundo kit de ELISA para algunas de las proteínas escogidas, de forma que no se pudo completar el análisis de APJ, FOXO1, KLF 4, angiopoyetina like 4, catepsina B, Galectina 1, MMP 7, osteocrina, FABP4 y ADMA en los 79 pacientes, sino sólo en la mitad (40).

Se puede plantear que la selección de las proteínas a determinar ha sido arbitraria y no se ha seguido un método objetivo. También se puede objetar que estamos dejando muchas proteínas potencialmente

interesantes por analizar, que incluso podrían tener mejores resultados que las sí analizadas. Ciertamente es, que la línea de investigación no acaba con los resultados actuales, y que ha de continuar más allá de los análisis realizados para el presente proyecto de investigación.

3. Comparación de las características basales entre los distintos grupos según su perfil hemodinámico

Determinar los parámetros para definir los diferentes perfiles hemodinámicos y establecer los distintos grupos del estudio ha sido una de las principales dificultades a las que se ha enfrentado el proyecto.

El estudio fue planteado en cuatro grupos (NHP, HPP, HPMI y HPMR) desde su fase inicial de diseño en 2011, y en base a la literatura publicada hasta esa fecha^{1,2,14}, se utilizó el GTP como parámetro para diferenciar la existencia de componente precapilar. Además, a los pacientes con componente precapilar se les realizó un test de vasorreactividad con NO inhalado para valorar su reversibilidad, puesto que su ausencia es una contraindicación para el trasplante cardiaco²⁴.

Sin embargo, entre los años 2012 y 2015, con el proyecto ya iniciado, aparecieron nuevas publicaciones^{5,6,15,19}, tanto estudios como guías de práctica clínica, que modificaron sustancialmente la clasificación de la HPCI. Por una parte, se modificó la nomenclatura de los tipos de HP de pasiva y reactiva/desproporcionada a poscapilar y precapilar/mixta. Por otra parte, se cuestionó el papel del GTP para poder diferenciar la existencia de componente precapilar²⁰, proponiendo en su lugar el

DPD¹⁹, dado que tiene mayor implicación pronóstica³¹¹. Además, se cuestionó la utilidad del test de vasorreactividad en la HPCI más allá de sentar una posible contraindicación al trasplante cardiaco^{6,15}.

Por todo ello, además de los cuatro grupos iniciales, hemos considerado también tres grupos (NHP, HPP, HPM) para todas las comparaciones y análisis posteriores, eso sí, considerando el componente precapilar medido tanto por GTP como por DPD.

Como era esperable, dado que los pacientes estaban agrupados según perfiles hemodinámicos, las principales diferencias radicaron en los parámetros hemodinámicos medidos en el CCD (PsAP, PdAP, PAPm, PCP, GTP, DPD, RVP), tanto en las comparaciones entre cuatro grupos como entre tres. Sin embargo, no hubo diferencias intergrupales ni en el GC ni en el IC en ninguna de las comparaciones.

Respecto a las variables clínicas, dado que los grupos representan diferentes estados de gravedad de la enfermedad, también era esperable encontrar diferencias intergrupales en la clase funcional (porcentaje de pacientes con clase funcional IIIB o IV) y en la supervivencia, (porcentaje de pacientes que habían presentado el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses del CCD). Estas diferencias se mantuvieron en todas las comparaciones, tanto entre tres como entre 4 grupos. Más sorprendente es el hallazgo de diferencias significativas entre los 3 grupos, tanto por GTP como por DPD, en el IMC ($p=0,01$ en ambos casos). Las diferencias son muy sutiles, del orden de 2-3 kg/m², a expensas de una diferencia del HPM del resto de grupos. No creemos que este dato sea de relevancia.

En cuanto a las variables ecocardiográficas, merece la pena destacar el hecho de que alcanzó la significación estadística en las comparaciones entre tres ($p=0,01$ ambos) y cuatro grupos ($p<0,001$) el llenado patológico del VI (considerado como disfunción diastólica grado II o superior). Esto refuerza el hecho, ya conocido, del importante papel de la disfunción diastólica en la patogenia y posterior desarrollo de la HPCI^{12,24,29}, y que probablemente debería valorarse con más detenimiento en los pacientes con HP o en riesgo de desarrollarla. Otros parámetros que mostraron diferencias intergrupales en todas las comparaciones fueron: la disfunción sistólica significativa del VD (considerada como moderada o severa) ($p=0,04$, $p=0,02$, $p=0,05$ respectivamente), y la PSAP estimada a partir del chorro de regurgitación de la IT. La primera, es esperable al ser grupos de gravedad creciente, mientras que la segunda, es inherente a la condición de grupos de distinto perfil hemodinámico. Además, entre los 3 grupos, tanto por GTP como por DPD, el diámetro telediastólico del VI también alcanzó la significación estadística ($p=0,01$ en ambos), aunque a expensas del grupo de NHP respecto a los otros dos. Siguiendo esta misma tónica, en las comparaciones entre 3 grupos por DPD, la FEVI ($p=0,01$) y el porcentaje de pacientes con FEVI $<40\%$ ($p=0,02$) también mostraron diferencias significativas.

Por lo que respecta a los parámetros analíticos, hay datos interesantes. La bilirrubina mantuvo diferencias significativas en todas las comparaciones ($p<0,001$, $p=0,01$, $p=0,04$) con unos valores crecientes conforme aumentaba la gravedad del grupo hemodinámico. No deja de sorprender que la bilirrubina muestre diferencias entre los distintos

grupos, puesto que su elevación se considera un epifenómeno en la HP, debido a congestión hepática secundaria a fallo del VD o a IT severa. Sí que es conocido su valor pronóstico³¹² en la HAPI; y puesto que es un indicador de fallo hepático, conlleva mal pronóstico. Más sorprendente aún, es el hecho de las diferencias obtenidas por el colesterol LDL, y que se mantiene en todas las comparaciones ($p=0,03$, $p=0,01$, $p=0,04$) con una tendencia decreciente según aumenta la gravedad de la enfermedad. Estos datos hay que interpretarlos con cautela, puesto que existe un factor de confusión como es el hecho de que en la muestra hay un 38,8% de pacientes isquémicos, y que por tanto, toman estatinas. No existe en la literatura ningún trabajo que correlacione el colesterol LDL con la HP de ningún tipo, al contrario del colesterol HDL que sí se ha correlacionado²⁶². Podría ser interesante realizar nuevas mediciones de esta lipoproteína en un subgrupo de pacientes que no tomen estatinas ni otros fármacos hipolipemiantes. En las comparaciones ente 3 grupos, tanto por GTP como por DPD, el sodio también mostro diferencias significativas, si bien su magnitud es escasa como para considerar que pudiera ser de alguna relevancia.

4. Panel de proteínas (microarray).

El panel está compuesto por un array de 1000 proteínas. Dado el elevado número de análisis realizados, para evitar en la medida de lo posible resultados espurios y falsos positivos, consideramos como diferencias significativas entre grupos aquellas proteínas que mostraron un incremento $\geq 1,5$ veces (o un decremento $\leq 0,65$ veces) progresivo

entre grupos consecutivos. Aplicando este criterio, únicamente 17 proteínas cumplieron los requisitos.

Por ello, en segundo lugar, consideramos aquellas proteínas que si bien no alcanzaron una diferencia significativa ($\geq 1,5$ veces) entre grupos consecutivos, habían alcanzado una diferencia neta muy marcada (arbitrariamente consideramos ≥ 3 veces) entre los grupos NHP y HPMI, siempre y cuando no hubiera una progresión ilógica de las señales de intensidad. Aplicando este criterio, otras 50 proteínas cumplieron los requisitos.

Con estos criterios, 933 proteínas fueron descartadas para análisis posteriores. Se podría argumentar que el punto de corte es totalmente arbitrario, y que proteínas potencialmente útiles en HPCI podrían ser pasadas por alto. Esto es cierto, pero nos encontramos manejando una cantidad muy elevada de candidatos a biomarcadores, que han de ser tamizados de alguna forma, dado que van a requerir una cantidad de recursos muy importante para ser medidas mediante ELISA en este o futuros proyectos.

De entre las 67 proteínas destacadas, algunas de ellas merecen ser discutidas con algo más de detalle. Empezaremos con las 17 que presentaron incrementos progresivos de expresión entre grupos consecutivos.

De estas 17, sólo unas pocas han sido relacionadas con la HP, bien tanto en estudios in vitro como con animales. La apelina, es una hormona derivada del endotelio con acción paracrina. Induce la apoptosis de las células musculares lisas e inhibe su proliferación³¹³. Además, cuando se

infundió en ratas con HP inducida por monocrotalina, se consiguió mejorar la función del VD, por lo que actualmente se ha propuesto como una potencial diana terapéutica en la HP³¹⁴. TRPC6 es un canal de calcio que participa de la vía del fosfatidilinositol como segundo mensajero. Se expresa de forma predominante en el músculo liso de las arteriolas precapilares pulmonares. Contribuye a la HP inducida por hipoxia potenciado el efecto vasoconstrictor^{315,316}. Además, la infusión de bosentán en cultivos de miocitos inhibió su expresión³¹⁷. En las células endoteliales, el TRCP6 se ha demostrado que aumenta la permeabilidad endotelial³¹⁸. Por su parte, KLF4 es un factor de transcripción tipo dedo de zinc que juega un papel clave en la proliferación y diferenciación de las células vasculares. Se sabe que promueve un estado antiinflamatorio y anticoagulante, y que aumenta la expresión de NO en las células endoteliales³¹⁹. Ratones knock-out para KLF4 desarrollan HP severa en respuesta a la hipoxia crónica³²⁰. Mención aparte merece la ubiquitina. Se trata de una de las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución y se encuentra en todas las células eucariotas. Su principal función es la señalización intracelular de proteínas que van a ser degradadas por el proteosoma 26S mediante el proceso de ubiquitinación. Precisamente, alteraciones en esta vía de degradación proteica se han asociado al desarrollo de HP en pacientes³²¹-y modelos murinos³²².

Otras proteínas, aunque su papel en la HP no ha sido valorado hasta el momento, se sabe que participan de la fisiología del árbol cardiovascular. De las muchas proteínas angiogénicas incluidas en el array, sólo ANGPTL4 cumplió los requisitos de la primera categoría. La

síntesis de ANGPTL4 se induce en las células endoteliales en respuesta a la hipoxia, y actúa como un factor de supervivencia frente a la apoptosis en dichas células³²³⁻³²⁴. Por su parte, TRPM7 es un canal de cationes no selectivo que se expresa en las células endoteliales y participa de la homeostasis del magnesio. Contribuye a la función del sistema vascular regulando la adhesión celular y la formación de nuevos tubos vasculares^{325,326}. De entre las metaloproteasas analizadas, sólo MMP7 se incluyó en esta selección. También conocida como matrilisina, su papel en el campo de la función cardiopulmonar es poco conocido y no se ha relacionado hasta la fecha con la HP. Se sabe que promueve la apoptosis de las células musculares lisas³²⁷. La osteocrina, también conocida como musculina, es una proteína que recientemente se ha clasificado dentro de la familia de los péptidos natriuréticos de mamíferos³²⁸. La osteocrina se une selectivamente al receptor de aclaramiento de péptidos natriuréticos (NPR-C) y modula la respuesta de esas células a dichos péptidos, presumiblemente aumentando su disponibilidad³²⁹. La catepsina B es una cisteína proteasa lisosomal que está involucrada en los procesos de apoptosis y degradación de miofibrillas en procesos de necrosis cardíaca³³⁰. Su inhibición reduce el proceso inflamatorio pulmonar en modelos animales³³¹. Por su parte, GPBB es una isoenzima de la glucógeno fosforilasa expresada en el tejido cardíaco y que se eleva en relación con la necrosis de tejido cardíaco³³². Por último, LIMP-2 es una proteína codificada por el gen SCARB2 que se expresa en corazón, pulmones y cerebro humanos. Se encuentra principalmente en las membranas lisosomales, aunque en el corazón se expresa también en los discos intercalados³³³. Niveles anormales de LIMP-2 se han detectado en pacientes con miocardiopatía hipertrófica³³⁴.

Finalmente, las seis proteínas restantes no han mostrado ningún tipo de relación con la HP ni existen estudios que les hayan atribuido funciones en la fisiología vascular. Se trata de tres proteínas relacionadas con la inmunidad e inflamación el TSLP, el LIF (estas dos se han relacionado con inflamaciones crónicas de la vía aérea³³⁵⁻³³⁶) y el IL17RB; y tres relacionadas con el ciclo celular y la apoptosis, el LIN41, el TRAILR2 y el RIP1.

Nos quedarían por discutir las otras 50 proteínas que fueron escogidas en el array aplicando el segundo criterio de selección. Escapa fuera de los límites de la presente discusión el comentar al detalle cada una de las 50 proteínas y su potencial papel en la HP. Enumeraremos y citaremos brevemente aquellas proteínas de las cuales hay evidencia en la literatura de su posible implicación en la patogenia de la HP:

- Fibrinógeno: se considera un marcador pronóstico independiente en la HPTEC³³⁷⁻³³⁸.
- D-Dímeros: estudios iniciales lo postularon como un posible biomarcador en HAPI³³⁹ pero trabajos posteriores no fueron concluyentes³⁴⁰.
- Galectina 1: ratones deficientes en esta proteína mostraron un aumento de las presiones pulmonares en respuesta a la hipoxia³⁴¹.
- Cromogranina A: ha cobrado interés en los últimos años como posible marcador en las enfermedades cardiovasculares. Sus niveles se encuentran elevados en CI o IC³⁴², además, afecta a la función endotelial³⁴³.
- FOXO1: recientemente relacionado con la PH, como factor de transcripción común de estímulos inflamatorios y angiogénicos³⁴⁴.

Se asocia a deterioro de la función del VD por disminución de la oxidación glucídica³⁴⁵.

- Trombospondina-4: en ratones se ha documentado que regula la fibrosis y promueve el remodelado miocárdico en respuesta a la sobrecarga de presión³⁴⁶.
- H-FABP: hasta el momento solo ha sido estudiado en la HPTEC³⁴⁷, donde ha demostrado ser un buen predictor de supervivencia. En la IC también ha demostrado valor pronóstico³⁴⁸.
- TIMP2: este inhibidor de las metaloproteasas posee un efecto supresor sobre la proliferación endotelial en respuesta a factores proangiogénicos³⁴⁹.
- Angiopoyetina 2: ha demostrado ser un predictor independiente de supervivencia en la HAP²⁶¹. Sus niveles correlacionaron con la PAPm y la RVP.
- Factor von Willebrand: predictor independiente de supervivencia en pacientes con HP del grupo 1²⁸⁰ y sus niveles se normalizaron en los pacientes que iniciaron tratamiento con PGI₂²⁸¹. Los niveles de fvW fueron significativamente más altos en pacientes con IC descompensada que en pacientes con IC en fase estable, o que en controles sanos²⁷⁷.
- TLR4: receptor de la inmunidad innata relacionado con el desarrollo de HAP en modelos animales. Su inhibición protege frente a la HP³⁵⁰.
- BMPR1A: mutaciones en este receptor se han relacionado con causas hereditarias de HAP³⁵¹. Su expresión está reducida en las arterias de pacientes con HP³⁵².

- ROCK2: Rho-kinasa 2 se expresa en las células musculares lisas arteriales. La actividad de esta enzima está aumentada en pacientes con HAP³⁵³. Un modelo murino de HP por hipoxia mostró una disminución de la magnitud de la HP en ratones knock-out para ROCK2³⁵⁴.
- LOX-1: este receptor de LDL oxidadas se encuentra hiperexpresado en ratones con HP por hipoxia crónica³⁵⁵.
- IL23R: polimorfismos de este receptor ha mostrado ser un factor protector frente al desarrollo de HP en pacientes con esclerodermia³⁵⁶.
- VEGF: es un factor proangiogénico al que se le atribuye un papel fundamental en la patogenia de la HP. Sin embargo, los mecanismos subyacentes no están bien definidos³⁵⁷. Por una parte se ha demostrado un efecto protector mediado por un descenso en la producción de ET-1³⁵⁸. Modelos murinos bloqueando el receptor del VEGF desarrollan HP severa³⁵⁹⁻³⁶⁰. Un estudio en perros con IC e HP mostró un aumento de la expresión de VEGF y su receptor³⁶¹. Se han detectado niveles elevados de VEGF en pacientes con HP secundaria a cardiopatía congénita³⁶², y en pacientes con HAP³⁶³⁻³⁶⁴.

5. ELISA: Comparación entre grupos según su perfil hemodinámico

Esta comparación responde a uno de los objetivos primarios de este trabajo. De entre las 22 proteínas analizadas, únicamente dos, el TIMP2

y el TRCP6 obtuvieron diferencias significativas ($p=0,03$ ambos) entre los cuatro grupos hemodinámicos estudiados (NHP, HPP, HPMR, HPMI). No obstante, ninguna de las dos proteínas presenta una progresión lógica de sus niveles en función de la severidad de los grupos (figura 30). Además, aunque las medias grupales se diferencian, como se puede apreciar en la citada figura, los diagramas de cajas de los diferentes grupos se solapan entre ellos en buena medida.

Por tanto, podemos concluir que existe una muy pobre correlación entre los resultados iniciales que arrojó el microarray para cada una de las proteínas seleccionadas a partir de él (donde se objetivó una progresión lógica acorde a la severidad de los grupos) y los resultados obtenidos al medir de forma cuantitativa, mediante ELISA, estas mismas proteínas.

Partiendo de la base de que ambos experimentos han sido realizados correctamente, y que no se ha producido ningún error metodológico ni de ejecución, la explicación a estos hallazgos podría deberse a diversos motivos; por una parte, el peso que los valores individuales han tenido en las muestras agrupadas utilizadas en el panel de proteínas. Si alguno de los pacientes escogidos para formar estas muestras presentaba valores extremos, o la muestra de sangre estaba alterada, se podrían haber afectado de forma significativa las mediciones. Otro punto a tener en cuenta es que la muestra de pacientes incluidos en el presente trabajo está formada por un grupo heterogéneo de patologías cardíacas (MCD, MCI, valvulopatías...), mientras que los individuos escogidos en su momento para realizar las muestras agrupadas del microarray fueron en su mayoría pacientes con MCD.

Otro aspecto que no podemos dejar de considerar, es que la división entre 4 grupos hemodinámicos no sea relevante desde el punto de vista bioquímico. Es decir, que realmente estas divisiones arbitrarias en 4 perfiles hemodinámicos no tenga una impronta entre los niveles de biomarcadores.

Si agrupamos los dos grupos precapilares en uno sólo, y no consideramos el hecho de la reversibilidad con NO, (aspecto cuya relevancia es muy discutido hoy en día en la HPCI fuera del estudio de candidatos para trasplante cardiaco^{6,15,19}) otras proteínas alcanzan la significación estadística, tanto si el componente precapilar se mide en función del GTP como del DPD. A las ya comentadas TIMP y TRCP6 ($p=0,001$ y $0,01$ respectivamente para GTP y $p=0,01$ y $0,01$ respectivamente para DPD), se unieron otras tres proteínas; la cromogranina A ($p=0,04$) si el parámetro diferenciador es el GTP, y la ADMA ($p=0,04$) y el NT-proBNP ($P=0,01$) si el parámetro es el DPD.

A pesar de ello, siguen siendo sólo unas pocas proteínas del total de las analizadas, posiblemente porque el resto de factores a considerar que hemos citado siguen presentes. Cuando contemplamos como marcador de la presencia de componente precapilar al GTP, se siguen observando los problemas de progresión ilógica entre grupos y de solapamiento marcado de las cajas. Sin embargo, cuando el parámetro hemodinámico identificador del componente precapilar es el DPD, estos inconvenientes se atenúan. Si se observa la figura 30, tanto para el TIMP como para el ADMA, como también se da en el caso del NT-proBNP que no aparece representado, hay una progresión lógica con la gravedad de la HP.

Si reducimos los perfiles hemodinámicos a tan sólo dos (pacientes con y sin hipertensión pulmonar), en este caso fueron seis las proteínas, ET-1 ($p=0,01$), TIMP2 ($p=0,01$), Catepsina B ($p=0,04$), ADMA ($p=0,02$), fvW ($p=0,03$) y NT-proBNP ($p=0,02$) las que obtuvieron diferencias significativas. Además, en esta comparación, salvo en el caso de la catepsina, los diagramas de cajas se separan de forma mucho más clara. Estos resultados están en consonancia con la publicado hasta la fecha para estos biomarcadores. Por ejemplo, el NT-proBNP se encuentra elevado en pacientes con HAP²⁴¹ y disminuye tras iniciar el tratamiento con vasodilatadores pulmonares²⁴². Por su parte, el ET-1 también ha demostrado un aumento de sus niveles plasmáticos en presencia de HP en varios estudios previos^{128, 254, 256}, incluidos pacientes con HPCI^{128, 256}. La ADMA también viene respaldada en la literatura, puesto que sus niveles se encuentran elevados en pacientes con HP de todo tipo²⁶⁷⁻²⁷⁰, incluido el HPCI²⁷¹. Por último, el fvW también ha mostrado niveles más elevados de actividad tanto en pacientes con HAP²⁸⁰ como en pacientes con IC descompensada (que se asocia invariablemente a presencia de HP)²⁷⁷.

Sin restar importancia a este resultado, puesto que la existencia de biomarcadores que permitan diferenciar a los pacientes que no presentan HP del resto podría ser de utilidad en la práctica clínica diaria, quizá sea el aspecto menos relevante de todos los objetivos propuestos. Por un lado, porque como hemos dicho previamente en la introducción, la prevalencia de la HPCI es muy elevada en todas las cardiopatías (ICFEVI-p entre 50 y 80%^{12,28}; ICFEVI-r entre 20 y 60%^{7,49-51}; IC descompensada 99%³⁷, valvulopatía mitral hasta un 73% de los

pacientes^{39,54}, valvulopatía aórtica entre 30-50%⁵⁶⁻⁵⁸). Por otro lado, porque existen otros métodos no invasivos para estimar la presencia de HP, ampliamente utilizados en cardiología, como es la ecocardiografía que permite estimar de forma fiable las presiones pulmonares^{69,70} y que es la que utilizamos hoy en día como screening de la HP. Además, el hecho per se de detectar la presencia de HP no conlleva, por el momento, cambios en el tratamiento de las patologías causantes. En el caso de la IC, el ajuste del tratamiento se hace en función de la clase funcional y de parámetros ecocardiográficos, y en el caso de las valvulopatías, la indicación de cirugía de reparación o sustitución valvular se basa también en criterios clínicos y de imagen.

No obstante, estos biomarcadores podrían tener su utilidad en el seguimiento de pacientes a los que no se les realiza control ecocardiográfico frecuente, como es el caso de la IC FEVI-p; o en pacientes con IC FEVI-r ya conocida que se encuentran en clase funcional baja, y por tanto en situación de estabilidad clínica, muy probablemente sin HP, para monitorizar su evolución y ajustar las terapias. De hecho, esto se viene haciendo desde hace años con el NT-proBNP en la IC³⁶⁵⁻³⁶⁶. En ambos casos, habría que diseñar nuevos estudios enfocados a esta población concreta para comprobar su potencial utilidad.

6. ELISA: Detección de la presencia o no del componente precapilar de la hipertensión pulmonar

La respuesta al otro objetivo primario del estudio ofrece datos menos concluyentes, independientemente de que la existencia de componente precapilar se estimara en función del GTP o del DPD. Únicamente dos proteínas de entre todas las analizadas, APJ ($p=0,04$) por GTP y VEGF ($p=0,01$) por DPD, obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes con y sin componente precapilar de la hipertensión pulmonar. Al representar gráficamente en un diagrama de cajas ambas comparaciones (figura 31) podemos ver como existe un solapamiento casi completo de ambos grupos, lo que limita completamente la utilidad de estos biomarcadores en la práctica clínica.

En los pocos datos que existen en la literatura previa, el trabajo de Cody et al¹²⁸ de hace más de 20 años, mostró una correlación entre los niveles plasmáticos de ET-1 y las RVP en pacientes con IC. Aunque el hecho de presentar RVP elevadas no es sinónimo de presencia del componente precapilar, ambos hechos están muy relacionados por lo que habría sido esperable haber observado en nuestro trabajo diferencias significativas para la ET-1. Habría que destacar que en el estudio de Cody no se detalla la etiología de la IC de los 20 pacientes incluidos en su estudio, por lo que probablemente no sea tan heterogénea como nuestra muestra.

7. ELISA: Detección de la disfunción ventricular derecha medida por ecocardiografía

De nuevo, únicamente dos proteínas de entre todas las analizadas, ET-1 ($p<0,001$) y ANGPTL4 ($p=0,02$) obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes con y sin disfunción ventricular derecha. Se consideró

como disfunción ventricular aquellas depresiones de la FEVD catalogadas como moderadas o severas según los hallazgos de las exploraciones ecocardiográficas.

Se podría esperar que aquellas proteínas que hayan dado diferencias significativas para los distintos grupos hemodinámicos de HP las hubieran alcanzado también al valorar la disfunción del VD, puesto que a más HP más probabilidad de fallo derecho. Sin embargo, esto no es del todo cierto. La resistencia del VD a las presiones pulmonares es muy variable entre individuos, pudiendo soportar los ventrículos en algunos casos altas presiones durante años sin desarrollar fallo alguno. Por otra parte, algunos pacientes presentan signos de fallo derecho sin apenas HP concomitante, por afectación intrínseca del VD por la cardiopatía de base (MCD, infarto del VD).

A diferencia de comparaciones previas, los diagramas de cajas para ambas proteínas muestran una separación clara de los grupos, por lo que este hallazgo podría ser de especial interés. Como se ha comentado en el apartado de introducción, la disfunción del VD empeora de forma añadida el pronóstico¹¹⁵ de los pacientes con HPCI independientemente de la clase funcional previa o de los valores de las presiones pulmonares^{7,8}. Dada la importancia pronóstica de este hallazgo, una detección precoz del fallo derecho podría ser de importancia capital a la hora de implementar medidas terapéuticas adicionales que puedan aliviar o mejorar la situación del paciente.

Hay poco con lo que comparar en la literatura estos hallazgos. En HAP si es conocido que el NT-proBNP se asocia a disfunción del VD²³³ pero esto

no es aplicable a la HPCI debido a la coexistencia de patología cardíaca de base. Lo mismo se puede argumentar de las troponinas²⁴³. El H-FABP que no hemos medido en esta primera tanda de biomarcadores, pero que lo haremos en un futuro próximo, si ha demostrado que se encuentra elevado en pacientes con cardiopatías congénitas con afectación del ventrículo derecho y clase funcional avanzada²⁵¹. Respecto a las dos proteínas positivas en nuestro estudio, sólo sabemos de trabajos previos que existe incremento significativo del cociente entre receptores ET_A y ET_B en los VD de pacientes con HP independientemente de su función²⁵⁸.

Se puede argumentar que ya se dispone de una herramienta accesible y fiable para valorar el VD como es la ecografía, sin embargo puede ser que no se solicite de forma periódica a todos los pacientes, o que por dificultades técnicas no se pueda valorar de forma adecuada la función del VD en determinados pacientes. Otro argumento en contra, podría ser el hecho de que la ecocardiografía no es el patrón oro para la evaluación del VD, sino que este lugar lo ocupa la cardio-resonancia magnética. Este punto es cierto, puesto que la ecocardiografía es una exploración muy observador dependiente y la valoración del VD es especialmente subjetiva. Podría ser interesante diseñar en un futuro un estudio que valore la correlación entre estos biomarcadores y la FEVD por cardio-resonancia magnética con el fin de dilucidar su utilidad real en la práctica clínica.

8. ELISA: Relación con el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses

En este caso, otras seis proteínas obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes que fallecieron o fueron trasplantados y los que no. Cuatro de ellas, también habían dado diferencias significativas entre los pacientes con o sin HP como la ET-1 ($p=0,01$), la ADMA ($p=0,01$), el fvW ($p=0,01$) y el NT-proBNP ($p=0,01$). A estas dos se le añaden en este caso la Galectina 1 ($p=0,04$) y la Cromogranina A ($p=0,01$).

En este análisis vuelven a destacar proteínas que han demostrado valor pronóstico en múltiples estudios previos, en grupos diversos de pacientes. El mejor ejemplo de este caso es el NT-proBNP. Es conocido desde hace tiempo el valor pronóstico del proBNP en pacientes con IC independientemente de su etiología³⁶⁷⁻³⁶⁸. Además, también ha demostrado tener valor pronóstico en pacientes con HP arterial²⁴¹. Por su parte, niveles elevados de ADMA se han asociado con peor supervivencia en pacientes con HP idiopática, HP del grupo 4, HP en cardiopatías congénitas y en HP portopulmonar²⁶⁷⁻²⁷⁰. También hay evidencia en la literatura del valor pronóstico del fvW, quien ha demostrado ser predictor independiente de supervivencia en pacientes con HP del grupo 1²⁸⁰ y en la IC descompensada²⁷⁷. Por otro lado, los niveles plasmáticos de ET-1 no han demostrado tener valor pronóstico en la HP, sin embargo, si lo ha hecho el cociente ET-1:ET-3 para la HAP²⁵⁷.

De los otros dos biomarcadores, la evidencia es mucho menor. La cromogranina A ha cobrado cierto interés en los últimos años como

posible marcador en las enfermedades cardiovasculares. De hecho, sus niveles se encuentran elevados en la IC³⁴², sin embargo, no aportaron valor pronóstico adicional al que se obtiene con la exploración física y las pruebas complementarias rutinarias³⁶⁹. De la galectina 1 no hay ninguna publicación al respecto.

Estos datos han de ser interpretados con cautela, puesto que como ya se ha mencionado en las limitaciones del estudio, la muestra de pacientes presenta un sesgo de selección. El hecho de que nuestro centro sea terciario y de referencia en IC avanzada, y que se requiera de un CCD para poder participar en el estudio provoca que se hayan incluido con mucha mayor facilidad a los pacientes con formas más graves de la enfermedad, por lo que no todo el espectro de la misma se encuentra representado. Por este motivo, a diferencia de otros estudios, la supervivencia se ha tenido que definir como falta de muerte o trasplante, y no como falta de muerte o listado para trasplante, puesto que una gran parte de la muestra se ha realizado el CCD como estudio previo a la inclusión en lista para trasplante cardiaco. Además, el seguimiento de los pacientes ha sido corto (sólo doce meses).

Por tanto, para poder extraer conclusiones más robustas en este aspecto sería necesario diseñar un estudio incluyendo pacientes con formas más leves de cardiopatía y medir estos biomarcadores realizando un seguimiento a más largo plazo.

9. ELISA: Correlación con parámetros hemodinámicos

Al igual que en estudios previos en HP presentes en la literatura médica, las proteínas analizadas obtuvieron múltiples correlaciones con los parámetros hemodinámicos medidos en el CCD (PAD, PsAP, PdAP, PAPm, PCP, GC y RVP). No obstante, a pesar de la significación estadística alcanzada, la gran mayoría de las correlaciones fueron de poca entidad ($R < 0,5$), por lo que su posible relevancia clínica es muy escasa.

Sólo dos proteínas obtuvieron correlaciones que merecen ser destacadas. La angiopoyetina like 4 mostró una correlación significativa ($p < 0,001$) con la presión de aurícula derecha con un notable coeficiente de correlación de Pearson de 0,67. Esta proteína también correlacionó, aunque con menor intensidad con la PsAP ($p = 0,02$; $R = 0,38$), la PdAP ($p = 0,02$; $R = 0,38$), la PAPm ($p = 0,03$; $R = 0,35$;) y la PCP ($p = 0,01$, $R = 0,46$). Por su parte la ET-1 mostró correlación significativa con la PAD ($p < 0,001$; $R = 0,40$), la PsAP ($p = 0,01$; $R = 0,38$), la PdAP ($p < 0,001$; $R = 0,43$), la PAPm ($p = 0,01$; $R = 0,38$;) , la PCP ($p < 0,001$, $R = 0,51$), el IC ($p < 0,001$; $R = -0,39$) y las RVP ($p < 0,001$; $R = 0,31$). Estos hallazgos están en sintonía con el trabajo de Cody et al¹²⁸ en el que se objetivó una correlación entre los niveles plasmáticos de ET-1 y las PsAP, PdAP, la PAPm y las RVP. Sin embargo, en dicho estudio la magnitud del coeficiente de correlación estaba en torno a 0,7-0,8. Esto podría deberse a que los pacientes incluidos en el trabajo de Cody eran más homogéneos que los de nuestro estudio.

A pesar de las pobres correlaciones, estas proteínas pueden ser de interés para diseñar nuevos estudios en el futuro con muestras de etiología más homogénea.

10. ELISA: Miocardiopatía dilatada

Ya hemos comentado en varias ocasiones, que nuestra muestra de pacientes no es homogénea, puesto que incluye pacientes con cardiopatías de distinta etiología, y que esto podría afectar a los resultados. Pues bien, si dividimos la muestra en función de la cardiopatía subyacente los resultados varían sustancialmente, lo que apoya esta hipótesis previa. Además, como se puede ver en los diagramas de cajas representados, la separación entre ambos grupos es mucho más nítida.

En la muestra se incluyeron un total de 22 pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática, sin coronariopatía ni enfermedad valvular orgánica (aquí no incluiríamos las IM e IT funcionales por dilatación ventricular). Este es un grupo homogéneo, en el que la enfermedad subyace intrínsecamente en el miocardio y la HP aparece con la evolución de la IC.

Si comparamos estos pacientes entre los cuatro grupos hemodinámicos del estudio, hay tres proteínas, catepsina B ($p=0,02$), osteocrina ($p=0,03$) y ADMA ($p=0,01$) que obtuvieron diferencias significativas. Si agrupamos a los pacientes con HP mixta en un solo grupo en función del GTP, osteocrina y ADMA mantienen la significación estadística ($p=0,01$ y $0,04$

respectivamente). Si la agrupación es en función del DPD, sólo ADMA la mantiene ($p=0,04$). Curiosamente ni la TIMP2 y la TRCP6 que eran las únicas proteínas que mantenían la significación estadística en todas las comparaciones en la muestra completa, obtiene diferencias significativas en la MCD. De hecho, la única proteína que comparten como significativa en las diferentes comparaciones es el ADMA, que en la MCD está presente como significativa en todas ellas, mientras que en la muestra completa sólo en la comparación de 3 grupos medidos por DPD. Es conocido que la ADMA se encuentra elevada en la IC descompensada²⁷¹, y que correlaciona con las presiones pulmonares y con la severidad de la enfermedad³⁷⁰, por lo que no es de extrañar que en esta muestra “más pura” de pacientes con IC haya obtenido estos resultados.

De las otras dos proteínas no existe evidencia previa. De la catepsina sólo tenemos constancia de que presenta una expresión aumentada en los muestras de miocardio de pacientes con MCD³⁷¹. Menos evidencia directa hay todavía de la osteocrina, pero dado que se une selectivamente al receptor de aclaramiento de péptidos natriuréticos (NPR-C)³²⁹ modulando su actividad, tendría sentido que se encontrara elevado en estos pacientes.

Si reducimos la comparación a sólo 2 grupos, con y sin hipertensión pulmonar son cuatro las proteínas, VEGF ($p=0,01$), TIMP2 ($p=0,01$), catepsina B ($p=0,03$) y ADMA ($p=0,02$) las que obtuvieron diferencias significativas. Con respecto a los resultados de la muestra completa, repiten TIMP2, catepsina y ADMA, y se caen el NTproBNP, la ET-1 y el fvW muy probablemente porque sus niveles se vean afectados por la

misma MCD subyacente. Respecto a la aparición del VEGF en este grupo, aunque desde hace muchos años se ha relacionado a esta proteína en las vías patogénicas de la IC y se ha propuesto como posible diana terapéutica³⁷²⁻³⁷³, lo cierto es que hasta el momento no se había logrado relacionar los niveles de VEGF con el desarrollo de HP (sí se ha logrado relacionarlo recientemente en cardiopatías congénitas³⁶²). Sí se ha descrito un descenso de los niveles de VEGF en pacientes con IC descompensada, que se normalizan al volver el paciente a una situación estable³⁷⁴. No obstante, nuestros datos muestran que los niveles de VEGF aumentan con el desarrollo de HP que es una forma más grave y, por tanto más descompensada, de la enfermedad.

Si analizamos la detección del componente precapilar, de nuevo vuelven a variar las proteínas respecto a la muestra completa. Si se consideró en función del GTP, solamente la osteocrina ($p=0,01$) obtuvo resultados significativos, mientras que si se consideró en función del DPD, fueron dos proteínas, la ET-1 ($p=0,04$) y la ANGPTL4 ($p=0,03$), las que alcanzaron la significación estadística. Ya se había documentado en la literatura un aumento de los niveles de ET-1 en paciente con HPCI con componente precapilar²⁵⁶, aunque al ser este estudio más antiguo, ésta se consideró por GTP. En dicho trabajo no se propuso utilizar este biomarcador para diferenciar la HP mixta de la HP poscapilar. Se ha investigado exhaustivamente el papel de la ET-1 en la IC en las últimas 2 décadas sin que hasta el momento se le haya podido dar un uso como biomarcador ni como diana terapéutica³⁷⁵.

La ANGPTL4, además, fue la única proteína que obtuvo diferencias significativas ($p=0,04$) entre los pacientes con y sin disfunción ventricular

derecha. En este punto coincide con los resultados obtenidos en la muestra completa. Poco se ha publicado hasta la fecha del papel de esta proteína en la IC. Sólo conocemos su papel en el metabolismo lipídico del corazón. Esta proteína se encuentra elevada en pacientes con IC y protege al miocardiocito de la toxicidad derivada de un exceso de captación de lípidos que no puede oxidar³⁷⁶. Cabe destacar aquí que, en la MCD, puede haber disfunción del VD en ausencia de HP por afectación intrínseca del miocardio del dicho ventrículo.

En cuanto a posibles predictores de supervivencia en MCD, con todas las limitaciones que hemos comentado en el apartado previo, al comparar los pacientes que fallecieron o fueron trasplantados durante los 12 meses posteriores a la realización del cateterismo cardiaco derecho con los que no, fueron dos proteínas, VEGF ($p=0,01$) y ADMA ($p=0,04$) las que alcanzaron la significación estadística. Curiosamente, el VEGF había fallado como predictor de mortalidad en la IC en un estudio previo³⁷⁷. De la ADMA ya hemos comentado previamente su valor pronóstico en otros tipos de HP²⁶⁷⁻²⁷⁰, a lo que hay que añadir también el valor pronóstico que se le atribuye en pacientes con IC descompensada³⁷⁸.

Por último, al igual que ocurría en la muestra completa, se produjeron múltiples correlaciones entre las proteínas analizadas y los parámetros hemodinámicos, siendo de nuevo la mayoría de escasa entidad ($R<0,5$). Sólo vale la pena destacar a la osteocrina que correlacionó de forma intensa con el GTP ($p=0,01$ y $R=-0,66$) y DPD ($p=0,01$ y $R=-0,68$), y a la ANGPTL4 que lo hizo con la PAD ($p<0,001$ y $R=0,78$) pero no con otros parámetros hemodinámicos.

11. ELISA: Cardiopatía isquémica

En la muestra se incluyeron un total de 31 pacientes con miocardiopatía isquémica, sin enfermedad valvular orgánica (aquí sí incluiríamos las IM e IT funcionales por dilatación ventricular). Al igual que con la MCD, si en lugar de los 79 pacientes consideramos únicamente este grupo, los resultados varían sustancialmente, y los diagramas de cajas resultantes discriminan mejor los grupos de la comparación. Como peculiaridad a tener en cuenta, la cardiopatía isquémica es la manifestación cardiaca de una enfermedad vascular generalizada, la arterioesclerosis, por lo que la función endotelial puede estar alterada independientemente de la existencia o no de HP. Además, estos pacientes toman cierta medicación como las estatinas o la aspirina que pueden afectar los niveles de diversos biomarcadores.

Al realizar la comparación según los cuatro grupos hemodinámicos del estudio, sólo una proteína, la TIMP2 ($p=0,02$), obtuvo diferencias significativas. Si agrupamos a los pacientes con HP mixta en un solo grupo, en función del GTP, TIMP2 y cromogranina A mantienen la significación estadística ($p=0,01$ y $0,03$ respectivamente). Si la agrupación se hace en función del DPD, cambian completamente los marcadores y aparecen VEGF ($p=0,02$) y ET-1 ($p=0,03$) como variables con diferencias estadísticamente significativas. Al igual que en la muestra general, la TIMP2 vuelve a ser significativa en las comparaciones de 4 grupos y en las de 3 por GTP, a la que se une la cromogranina A. Esto muestra el peso del subgrupo de pacientes con MCI en la muestra general. De forma interesante, cuando agrupamos

por DPD, cambia completamente el perfil de proteínas saliendo a la palestra el VEGF y el ET-1.

Estas dos últimas proteínas ($p=0,01$ ambas), junto con TIMP2 ($p=0,01$) y NT-proBNP ($p=0,01$) obtuvieron diferencias significativas a la hora de agrupar a los pacientes en presencia o ausencia de HP. Estos resultados son superponibles a los de la muestra general, con la ausencia del ADMA y la presencia del VEGF. Del papel del VEGF en la insuficiencia cardiaca ya hemos hablado previamente³⁷²⁻³⁷⁵ y no existen nuevos datos a reportar en la bibliografía. De la ET-1 vale la pena destacar un trabajo en MCI en el que se correlacionaron los niveles plasmáticos de esta proteína con la clase funcional NYHA³⁷⁹.

Respecto al componente precapilar, si lo consideramos en función del GTP, son de nuevo las proteínas TIMP2 y cromogranina A ($p=0,05$ y $0,04$ respectivamente) las que obtienen resultados significativos. De nuevo, este marcador neuroendocrino tan en boga, la cromogranina A, obtiene resultados significativos. Como precursor en los miocardiocitos de sustancia vasoactivas su papel hasta el momento en la patogenia de la IC y la HP en la MCI, quizá haya sido minusvalorado³⁸⁰⁻³⁸¹. Si consideramos la detección del componente precapilar en función del DPD, son otras dos proteínas, VEGF ($p=0,02$) y los D-Dímeros ($p=0,03$), las que alcanzaron la significación estadística. Curiosamente, aparecen aquí los D-Dímeros como proteína de interés, además, obteniendo una de las mejores gráficas (de cajas) de toda las comparaciones. Estos péptidos derivados de la fibrinólisis han sido estudiados en multitud de enfermedades cardiovasculares, pero poco se ha desarrollado su potencial papel en cardiopatía isquémica, IC y aún menos en HPCI. Sólo

destacar tres trabajos de los últimos 12 años en los que se demuestra su valor pronóstico en pacientes ambulatorios con IC (HR de 4 para D-Dimeros > 250 ng/mL)³⁸², y en pacientes con IC sistólica (HR de 3,8 para D-Dimeros > 1435 ng/mL)³⁸³; y su relación con un riesgo aumentado de desarrollar FA en la evolución de la IC (HR de 3 para D-Dimeros > 750 ng/mL)³⁸⁴.

Con respecto a la disfunción ventricular derecha, dos proteínas, la ET-1 (p=0,01) y la catepsina B (p=0,01) obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes que la presentaban o no. La ET-1 repite significación, ya que ya la había obtenido en la muestra completa. No disponemos de evidencias en la literatura para ninguna de las dos proteínas que las relacionen con la función del VD.

En cuanto a proteínas con un posible valor pronóstico (valorando pacientes que fallecieron o fueron trasplantados durante los 12 meses posteriores a la realización del CCD con los que no), fueron dos, VEGF (p=0,01) y MMP7 (p=0,03) las que alcanzaron la significación estadística. Tampoco tenemos nada en la literatura para estas dos proteínas y su posible valor pronóstico. La ADMA, que en un trabajo previo se había mostrado como un predictor independiente de mortalidad en la MCI³⁸⁵, no ofrece diferencias significativas en nuestra muestra.

Al igual que con la muestra completa y con la MCD, se produjeron múltiples correlaciones entre las proteínas analizadas y los parámetros hemodinámicos, siendo una vez más la mayoría de escasa entidad. Sin embargo, destacaremos la correlación de la ET-1 con la PAD (p<0,001 y R=0,61), la PsAP (p<0,001 y R=0,63), la PdAP (p=0,01 y R=0,54), la PAPm

($p=0,01$ y $R=0,49$) y PCP ($p<0,001$ y $R=0,61$), resultados que se aproximan más a los observados en el trabajo de Cody et al¹²⁸. También destacamos los obtenidos por la ANGPTL4 con la PAD ($p=0,01$ y $R=0,63$), PsAP ($p=0,01$ y $R=0,62$), la PdAP ($p=0,02$ y $R=0,47$), la PAPm ($p=0,02$ y $R=0,48$) y PCP ($p=0,01$ y $R=0,54$).

12. Curvas COR

Entre toda esta mirada de proteínas, diferencias significativas y correlaciones, resulta muy tedioso el realizar una búsqueda de posibles puntos de corte para cada uno de los objetivos. Sin embargo, es un paso necesario para poder definir la utilidad de estas proteínas como biomarcadores en la práctica clínica. De todas las relaciones significativas obtenidas, sólo hemos considerado representar las curvas COR que habían alcanzado un área bajo la curva de al menos 0,75. Se trata de un límite arbitrario, pero a partir del cual consideramos asumir la posible utilidad clínica de un biomarcador. Los mejores resultados se han conseguido en los subgrupos de pacientes con la misma etiología.

En la miocardiopatía dilatada, podría ser de utilidad para el despistaje de HP la detección de niveles de ADMA (AUC 0,86; $>0,55$ $\mu\text{M}/\text{ml}$ S 70% /E del 75%) o catepsina B (AUC 0,83; >65 ng/ml S 92% /E del 75%). Si en estos pacientes quisiéramos detectar la presencia de componente precapilar, la osteocrina (AUC 0,89; $>7,1$ ng/ml , S 83% /E del 85%) o la ANGPTL4 (AUC 0,85; >687 ng/ml , S 79% /E del 81%) serían las proteínas a determinar. Esta última además, permitiría descartar la presencia de

fallo derecho en este grupo de pacientes AUC 0,80; >595 ng/ml, S 73% /E del 83%).

En el grupo de pacientes con cardiopatía isquémica se puede obtener un perfil de proteínas similar. Para la detección de HP, el VEGF (AUC 0,85; >63,50 pg/ml, S 92% /E del 84%) o el TIMP2 (AUC 0,81; >87,5 ng/ml, S 76%/ E 84%) parecen ser de utilidad, al igual que el NT-proBNP (AUC 0,91; >1355 pg/ml, S 79% /E del 84%). Para descartar la presencia de componente precapilar, la proteína más destacada son los D-Dímeros (AUC 0,86; >330 ng/ml S75% / E 85%). Por último, la ET-1, podría ser de utilidad para detectar la disfunción del VD en esta población (AUC 0,80; > 2,8 pg/ml, S 79% / E 83%).

Aunque los datos de aquí extraídos requieren de nuevos estudios en un número más amplio de pacientes para concluir si estas proteínas si pueden ser de utilidad clínica, ya aportan algo de luz respecto a cuales son los biomarcadores más interesantes a desarrollar.

13. Análisis multivariante

El análisis multivariante ofrece información limitada hasta el momento debido a las limitaciones estadísticas que ofrecen los modelos de regresión empleados y que impiden, considerar aquellas variables que tienen una N pequeña. Así por ejemplo, no ha sido imposible incluir en el modelo las proteínas medidas en la mitad de la muestra (40 pacientes). Del mismo modo, por idénticas razones, tampoco ha sido posible realizar el análisis en los subgrupos de MCD y MCI.

No obstante, se pueden extraer algunos datos interesantes. Por ejemplo, en el primer análisis multivariante fueron predictores independientes de la aparición de HP el llenado patológico del VI con una OR de 164 ($p=0,02$) y los niveles de TIMP2 con una OR de 1,10 ($p=0,02$). Cabe destacar aquí la relevancia del fallo diastólico del VI como el origen patogénico de la HP. En efecto, una vez más queda demostrado que es la dificultad para el llenado del VI, independientemente de la FEVI, la que inicia el aumento retrógrado de las presiones que desemboca en la HP^{12,27,28}. No es pues de extrañar, que la existencia de un fallo diastólico moderado o severo se pueda considerar un factor de riesgo muy potente de la HP (OR 164). No ha ocurrido así, por ejemplo, con el fallo sistólico del VI, cuyo papel en la patogenia de la HP queda condicionado por el fallo diastólico concomitante.

Al respecto de la aparición de componente precapilar de la HP, se realizaron dos análisis multivariantes. En la HPM por GTP, no se pudieron incluir proteínas del ELISA por los motivos antes explicados. De entre el resto de variables clínicas y analíticas, fueron predictores independientes del componente precapilar el llenado patológico del VI con una OR de 18,68 ($p=0,02$), la disfunción del VD con una OR de 4,88 ($p=0,04$) y el IMC con una OR de 1,32 ($p=0,01$). De nuevo el fallo diastólico obtiene significación con un valor de OR alto, y destaca que el fallo del VD aparezca como predictor (es un dato de que el desarrollo de componente precapilar es el que lleva al fallo derecho) y muy curiosamente con un nada desdeñable OR de 1,32 el IMC. Esto quiere indicar que pacientes con sobrepeso tendrían un mayor riesgo de desarrollar HPM. Estos resultados contrastan con el estudio de Berger et

al³², quienes no hallaron diferencias antropométricas entre pacientes con HPP y HPM. En el análisis realizado en HPM por gradiente diastólico fueron predictores independientes de HP precapilar la disfunción del VD con una OR de 10,6 ($p=0,03$) y los niveles de VEGF 1,06 ($p=0,01$).

Por último, fueron predictores independientes de disfunción del VD, la disfunción del VI (FEVI<40%), con una OR de 9,69 ($p=0,03$) y los niveles de ET-1, con una OR de 1,78 ($p=0,02$). Curiosamente aquí, la disfunción del VI aparece como un predictor importante del fallo de VD. Lo podemos interpretar como una prueba de la interdependencia mecánica entre ambos ventrículos, y que el fallo de VI en un paciente con HP, va a facilitar a la larga la aparición de fallo del VD³⁸⁶. La ET-1 es la proteína que mejor resultado obtiene como predictor, con un OR de 1,78. Ya hemos comentado en los apartados previos, que la ET-1 puede ser un biomarcador prometedor para la detección de la disfunción derecha a tenor de los resultados cosechados en los análisis en la muestra completa y la MCI, y los valores destacados de S y E que se extraen de la curva ROC.

14. Perspectivas de futuro.

Si tenemos en cuenta las limitaciones de nuestro proyecto y la forma de poder subsanarlas, las perspectivas de futuro de la presente línea de investigación son muy prometedoras, e invitan a continuar en esta senda. Además, de la experiencia obtenida de este primer trabajo se pueden diseñar nuevos estudios con planteamientos más adecuados y presupuestos más ajustados.

Por una parte, hemos podido objetivar que la HPCI es un estado hemodinámico común a la evolución de muchas enfermedades del corazón izquierdo, que empeora el pronóstico de todas ellas, y que muestra unas características bioquímicas y fisiológicas similares. Sin embargo, la impronta de la patología de origen (MCD, MCI, valvulopatías) sigue teniendo un peso elevado. La función endotelial, miocárdica, la actividad inflamatoria se ven afectadas no sólo por el desarrollo de HP, sino también por la enfermedad de base. Por ello, en trabajos posteriores hemos de considerar cada etiología por separado, intentando reclutar un número similar de pacientes al de este estudio pero para cada una de ellas, puesto que el perfil bioquímico resultante será muy distinto.

Por otra parte, de la lista de proteína de interés ofrecida por el *microarray*, sólo hemos analizado una muy pequeña parte (17 de 67). Quedan otras 50 proteínas por analizar, algunas de ellas tan prometedoras sobre el papel como la H-FABP, el GPBB, el ROCK-2 o la angiopoyetina 2. Además de las 17 analizadas, en diez sólo hemos pedido medirlas en 40 pacientes. Los datos que están por venir en los próximos meses o años de estas y otras proteínas, pueden incluso ser más destacados y útiles que los disponibles hasta el momento.

Para realmente poder cumplir el objetivo de poder realizar un perfil hemodinámico de forma no invasiva en pacientes con HPCI, previamente habremos de demostrar que estos resultados son reproducibles en muestras de sangre periférica, puesto que no olvidemos que este estudio se ha realizado en muestras de sangre de arteria pulmonar. Por tanto, será un paso obligatorio en el futuro, diseñar un trabajo que

compare los niveles de las proteínas de interés a nivel central y periférico y que demuestre si ambos niveles son iguales, o al menos, una correlación.

Por último, no debemos dejar de comentar que, la muestra escogida para este estudio no es representativa del grueso de pacientes con HPCI, sino que está sesgada hacia formas más graves por la idiosincrasia de nuestro centro. Trabajos futuros deberán considerar también la validez de estas medidas en pacientes con formas más leves de la enfermedad y determinar su capacidad de predecir, entre otras cosas, la supervivencia a medio y largo plazo, o el riesgo de desarrollo de fallo del VD.

VII. CONCLUSIONES

Existen unos niveles de expresión diferenciados de las distintas proteínas analizadas en función de la situación hemodinámica pulmonar de los pacientes.

Al analizar los niveles de biomarcadores en cuatro grupos hemodinámicos (NHP, HPP, HPMR y HPMI) hemos encontrado que la proteína TIMP2 permite discriminar los diferentes grupos, aunque no presentan una progresión acorde a la severidad de la enfermedad.

Al analizar los niveles de biomarcadores en tres grupos hemodinámicos (NHP, HPP, HPM) hemos encontrado que las proteínas TIMP2, cromogranina A, ADMA y NT-proBNP permiten diferenciar los distintos grupos.

Al analizar los niveles de biomarcadores en dos grupos hemodinámicos (NHP, HP) hemos encontrado que la concentración plasmática media de las proteínas endotelina 1, TIMP2, catepsina B, ADMA, factor von Willebrand y NT-proBNP permite distinguir a los pacientes con y sin hipertensión pulmonar.

Se han encontrado diferencias según el parámetro hemodinámico utilizado para detectar el componente precapilar. Así la proteína APJ permite detectarlo cuando este es considerado como un gradiente transpulmonar ≥ 12 mmHg, mientras que la proteína VEGF permite detectarlo cuando este es considerado como un gradiente diastólico ≥ 7 mmHg.

Los pacientes con miocardiopatía dilatada y cardiopatía isquémica patrones de expresión distintivos de los biomarcadores estudiados. En pacientes con miocardiopatía dilatada las proteínas más relevantes son ADMA, osteocrina y angiopoyetina like 4, mientras

que en pacientes con cardiopatía isquémica son NT-proBNP, endotelina 1 y D-Dímeros. Las proteínas VEGF y TIMP2 destacan en ambos grupos.

La disfunción ventricular derecha medida por ecocardiografía se asocia a niveles aumentados de las proteínas endotelina 1 y la angiopoyetina like 4.

Unos niveles plasmáticos elevados de las proteínas endotelina 1, cromogranina, ADMA, factor von Willebrand o NT-proBNP se asocian a una peor supervivencia a los 12 meses. En pacientes con miocardiopatía dilatada o cardiopatía isquémica, los niveles de VEGF poseen valor pronóstico.

Las proteínas analizadas tienen múltiples correlaciones con los parámetros hemodinámicos aunque estos son de escasa magnitud. La endotelina 1 y la angiopoyetina like 4 son las proteínas que alcanzan un mayor grado de correlación.

La realización de curvas COR con las proteínas enunciadas en el párrafo anterior permite obtener puntos de corte para los niveles plasmáticos de cada una de ellas con una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de hipertensión pulmonar, componente precapilar o disfunción ventricular derecha.

El análisis multivariante mostró, para la presencia de hipertensión pulmonar, una asociación significativa con el llenado patológico del ventrículo izquierdo y los niveles de TIMP2. También, para la presencia de componente precapilar, mostró una asociación significativa con el llenado patológico del ventrículo izquierdo, el IMC, la disfunción sistólica del ventrículo derecho y los niveles de

VEGF. Además, mostró para la disfunción del ventrículo derecho, una asociación significativa con la disfunción sistólica del ventrículo izquierdo y los niveles de endotelina 1.

VIII. ANEXOS

1. Resultados completos de los análisis estadísticos realizados a las proteínas estudiadas

1.1. Comparación entre grupos según su perfil hemodinámico.

Cuatro grupos: NHP, HPP, HPMR, HPMI

		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
VEGF pg/ml	Inter-grupos	119519,740	39839,913	,775	,512
	Intra-grupos	3855742,210	51409,896		
	Total	3975261,949			
ET-1 pg/ml	Inter-grupos	13,750	4,583	1,764	,161
	Intra-grupos	194,861	2,598		
	Total	208,610			
FABP4 ng/ml	Inter-grupos	557,636	185,879	,409	,747
	Intra-grupos	16359,964	454,443		
	Total	16917,600			
MMP7 ng/ml	Inter-grupos	45,271	15,090	1,513	,228
	Intra-grupos	359,160	9,977		
	Total	404,431			
TIMP2 ng/ml	Inter-grupos	37484,691	12494,897	4,946	,003
	Intra-grupos	189479,258	2526,390		
	Total	226963,949			
Cathepsin ng/ml	Inter-grupos	12527,687	4175,896	1,795	,166
	Intra-grupos	83759,413	2326,650		
	Total	96287,100			
Galectin1	Inter-grupos	147,533	49,178	1,258	,303
	Intra-grupos	1407,067	39,085		
	Total	1554,600			
ANGPTL4 pg/ml	Inter-grupos	481225,476	160408,492	,909	,446
	Intra-grupos	6351322,024	176425,612		
	Total	6832547,500			
TRCP6 pg/ml	Inter-grupos	1893361,587	631120,529	2,858	,050
	Intra-grupos	7950098,413	220836,067		
	Total	9843460,000			

APJ pg/ml	Inter-grupos	2212,678	737,559	1,486	,235
	Intra-grupos	17869,222	496,367		
	Total	20081,900			
Cromogr ng/ml	Inter-grupos	192517,681	64172,560	2,291	,085
	Intra-grupos	2101231,686	28016,422		
	Total	2293749,367			
Osteocrin ng/ml	Inter-grupos	11,952	3,984	,931	,436
	Intra-grupos	154,032	4,279		
	Total	165,984			
FOXO1ng/ml	Inter-grupos	,300	,150	,600	,625
	Intra-grupos	,500	,250		
	Total	,800			
KLF 4 pg/ml	Inter-grupos	98143,408	32714,469	,289	,833
	Intra-grupos	4069798,567	113049,960		

Tres grupos: NHP, HPP, HPM (GTP)

		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
VEGF pg/ml	Inter-grupos	118456,455	59228,228	1,167	,317
	Intra-grupos	3856805,494	50747,441		
	Total	3975261,949			
ET-1 pg/ml	Inter-grupos	13,621	6,810	2,654	,077
	Intra-grupos	194,990	2,566		
	Total	208,610			
FABP4 ng/ml	Inter-grupos	63,561	31,780	,070	,933
	Intra-grupos	16854,039	455,515		
	Total	16917,600			
MMP7 ng/ml	Inter-grupos	19,603	9,801	,942	,399
	Intra-grupos	384,828	10,401		
	Total	404,431			
TIMP2 ng/ml	Inter-grupos	36203,678	18101,839	7,212	,001
	Intra-grupos	190760,271	2510,004		
	Total	226963,949			
Cathepsin ng/ml	Inter-grupos	10542,474	5271,237	2,275	,117
	Intra-grupos	85744,626	2317,422		
	Total	96287,100			

Galectin1	Inter-grupos	84,172	42,086	1,059	,357
	Intra-grupos	1470,428	39,741		
	Total	1554,600			
ANGPTL4 pg/ml	Inter-grupos	446682,478	223341,239	1,294	,286
	Intra-grupos	6385865,022	172590,947		
	Total	6832547,500			
TRCP6 pg/ml	Inter-grupos	1294722,427	647361,213	2,802	,074
	Intra-grupos	8548737,573	231046,961		
	Total	9843460,000			
APJ pg/ml	Inter-grupos	2035,344	1017,672	2,086	,138
	Intra-grupos	18046,556	487,745		
	Total	20081,900			
Cromogr ng/ml	Inter-grupos	191394,902	95697,451	3,459	,036
	Intra-grupos	2102354,465	27662,559		
	Total	2293749,367			
Osteocrin ng/ml	Inter-grupos	11,232	5,616	1,343	,274
	Intra-grupos	154,752	4,182		
	Total	165,984			
FOXO1ng/ml	Inter-grupos	,300	,300	1,800	,272
	Intra-grupos	,500	,167		
	Total	,800			
KLF 4 pg/ml	Inter-grupos	98120,069	49060,034	,446	,644
	Intra-grupos	4069821,906	109995,187		
	Total	4167941,975			
ADMA uM	Inter-grupos	,198	,099	2,678	,082
	Intra-grupos	1,371	,037		
Fibrinogeno	Inter-grupos	8826,398	4413,199	,310	,735
	Intra-grupos	796729,602	14227,314		
	Total	805556,000			
DDimeros	Inter-grupos	10758531,059	5379265,530	,834	,440
	Intra-grupos	361373888,602	6453105,154		
	Total	372132419,661			
FvW	Inter-grupos	31632,894	15816,447	2,369	,103
	Intra-grupos	367165,143	6675,730		
	Total	398798,037			
ProtS	Inter-grupos	402,199	201,099	,443	,644
	Intra-grupos	25428,143	454,074		
	Total	25830,342			
Homocisteina	Inter-grupos	45,538	22,769	,668	,516
	Intra-grupos	2486,825	34,066		
	Total	2532,363			
TnT_LC	Inter-grupos	18099,174	9049,587	,737	,482

ProBNP_LC	Intra-grupos	883848,841	12275,678	2,897	,062
	Total	901948,015			
	Inter-grupos	143711294,704	71855647,352		
	Intra-grupos	1810720989,336	24804397,114		
	Total	1954432284,039			

Tres grupos: NHP, HPP, HPM (DPD)

		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
VEGF pg/ml	Inter-grupos	156104,498	78052,249	1,553	,218
	Intra-grupos	3819157,451	50252,072		
	Total	3975261,949			
ET-1 pg/ml	Inter-grupos	15,778	7,889	3,109	,050
	Intra-grupos	192,832	2,537		
	Total	208,610			
FABP4 ng/ml	Inter-grupos	309,741	154,870	,345	,710
	Intra-grupos	16607,859	448,861		
	Total	16917,600			
MMP7 ng/ml	Inter-grupos	18,239	9,119	,874	,426
	Intra-grupos	386,192	10,438		
	Total	404,431			
TIMP2 ng/ml	Inter-grupos	27146,984	13573,492	5,163	,008
	Intra-grupos	199816,965	2629,171		
	Total	226963,949			
Cathepsin ng/ml	Inter-grupos	11718,041	5859,021	2,563	,091
	Intra-grupos	84569,059	2285,650		
	Total	96287,100			
Galectin1	Inter-grupos	37,441	18,721	,457	,637
	Intra-grupos	1517,159	41,004		
	Total	1554,600			
ANGPTL4 pg/ml	Inter-grupos	538251,023	269125,511	1,582	,219
	Intra-grupos	6294296,477	170116,121		
	Total	6832547,500			
TRCP6 pg/ml	Inter-grupos	1517539,179	758769,590	3,372	,045
	Intra-grupos	8325920,821	225024,887		
	Total	9843460,000			
APJ pg/ml	Inter-grupos	1102,825	551,412	1,075	,352
	Intra-grupos	18979,075	512,948		
	Total	20081,900			

Cromogr ng/ml	Inter-grupos	124474,723	62237,361	2,180	,120
	Intra-grupos	2169274,644	28543,087		
	Total	2293749,367			
Osteocrin ng/ml	Inter-grupos	8,583	4,291	1,009	,374
	Intra-grupos	157,401	4,254		
	Total	165,984			
FOXO1ng/ml	Inter-grupos	,050	,050	,200	,685
	Intra-grupos	,750	,250		
	Total	,800			
KLF 4 pg/ml	Inter-grupos	40775,276	20387,638	,183	,834
	Intra-grupos	4127166,699	111545,046		
	Total	4167941,975			
ADMA uM	Inter-grupos	,220	,110	3,015	,061
	Intra-grupos	1,349	,036		
	Total	1,569			
Fibrinogeno	Inter-grupos	4977,954	2488,977	,174	,841
	Intra-grupos	800578,046	14296,037		
	Total	805556,000			
DDimeros	Inter-grupos	8722971,057	4361485,528	,672	,515
	Intra-grupos	363409448,604	6489454,439		
	Total	372132419,661			
FvW	Inter-grupos	38689,330	19344,665	2,955	,060
	Intra-grupos	360108,707	6547,431		
	Total	398798,037			
ProtS	Inter-grupos	380,835	190,417	,419	,660
	Intra-grupos	25449,507	454,455		
	Total	25830,342			
Homocisteina	Inter-grupos	19,147	9,574	,278	,758
	Intra-grupos	2513,216	34,428		
	Total	2532,363			
TnT_LC	Inter-grupos	44787,973	22393,987	1,881	,160
	Intra-grupos	857160,041	11905,001		
	Total	901948,015			
ProBNP_LC	Inter-grupos	256266621,796	128133310,898	5,508	,006
	Intra-grupos	1698165662,243	23262543,318		
	Total	1954432284,039			

Dos grupos: ausencia de HP y presencia de HP

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,255	,615	-,138	77	,891
	No se han asumido varianzas iguales			-,115	20,833	,909
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	2,719	,103	-2,178	77	,032
	No se han asumido varianzas iguales			-2,564	33,345	,015
FABP4 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,000	,994	-,226	38	,822
	No se han asumido varianzas iguales			-,223	12,733	,827
MMP7 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,236	,630	-1,338	38	,189
	No se han asumido varianzas iguales			-1,557	16,929	,138
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	5,093	,027	-3,221	77	,002
	No se han asumido varianzas iguales			-4,322	44,949	,000
Cathepsin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,079	,780	-2,087	38	,044
	No se han asumido varianzas iguales			-2,251	14,665	,040
Galectin1	Se han asumido varianzas iguales	9,247	,004	-,968	38	,339
	No se han asumido varianzas iguales			-1,455	32,100	,155
ANGPTL4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	4,552	,039	-1,593	38	,119
	No se han asumido varianzas iguales			-2,386	31,763	,023
TRCP6 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	2,780	,104	2,248	38	,030
	No se han asumido varianzas iguales			1,804	10,168	,101

APJ pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,360	,552	-,605	38	,549
	No se han asumido varianzas iguales			-,558	11,721	,587
Cromogr ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	7,507	,008	-1,925	77	,058
	No se han asumido varianzas iguales			-2,636	47,387	,011
Osteocrin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,234	,632	,504	38	,618
	No se han asumido varianzas iguales			,473	11,979	,645
KLF 4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,349	,558	,240	38	,812
	No se han asumido varianzas iguales			,232	12,434	,820
ADMA uM	Se han asumido varianzas iguales	,089	,767	-2,276	38	,029
	No se han asumido varianzas iguales			-2,556	15,784	,021
Fibrinogeno	Se han asumido varianzas iguales	1,093	,300	-,573	57	,569
	No se han asumido varianzas iguales			-,673	38,558	,505
DDimeros	Se han asumido varianzas iguales	2,252	,139	-,935	57	,354
	No se han asumido varianzas iguales			-1,538	42,409	,132
FvW	Se han asumido varianzas iguales	4,419	,040	-2,141	56	,037
	No se han asumido varianzas iguales			-3,023	55,868	,004
ProtS	Se han asumido varianzas iguales	,002	,963	-,895	57	,375
	No se han asumido varianzas iguales			-,876	25,846	,389
Homocisteina	Se han asumido varianzas iguales	,071	,790	,320	74	,750
	No se han asumido varianzas iguales			,333	27,473	,742
TnT_	Se han asumido varianzas iguales	1,862	,177	-1,191	73	,238

ProBNP_	No se han asumido varianzas iguales			-2,085	69,055	,041
	Se han asumido varianzas iguales	5,860	,018	-2,422	74	,018
	No se han asumido varianzas iguales			-4,256	70,816	,000

1.2 Detección de la presencia o no del componente precapilar de la hipertensión pulmonar

Componente precapilar como GTP ≥ 12 mmHg

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	9,171	,004	-1,354	60	,181
	No se han asumido varianzas iguales			-1,434	51,067	,158
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,005	,946	-,394	60	,695
	No se han asumido varianzas iguales			-,392	56,031	,697
FABP4 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	5,689	,024	,300	29	,766
	No se han asumido varianzas iguales			,330	28,931	,744
MMP7 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,483	,492	,350	29	,729
	No se han asumido varianzas iguales			,380	28,623	,707
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,326	,570	1,483	60	,143

	No se han asumido varianzas iguales			1,466	54,659	,148
Cathepsin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,704	,202	,510	29	,614
	No se han asumido varianzas iguales			,547	28,278	,588
Galectin1	Se han asumido varianzas iguales	,000	,994	,984	29	,333
	No se han asumido varianzas iguales			,984	23,508	,335
ANGPTL4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	5,141	,031	,301	29	,766
	No se han asumido varianzas iguales			,266	15,485	,794
TRCP6 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,739	,198	-,874	29	,390
	No se han asumido varianzas iguales			-,997	28,327	,327
APJ pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	4,002	,055	2,041	29	,050
	No se han asumido varianzas iguales			1,794	15,135	,093
Cromogr ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	5,650	,021	2,059	60	,044
	No se han asumido varianzas iguales			1,990	46,831	,052
Osteocrin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,076	,784	1,609	29	,119
	No se han asumido varianzas iguales			1,531	19,872	,141
KLF 4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	.	.	1,342	3	,272
	No se han asumido varianzas iguales			1,000	1,000	,500
ADMA uM	Se han asumido varianzas iguales	4,479	,043	,926	29	,362
	No se han asumido varianzas iguales			,742	11,546	,473
Fibrinogeno	Se han asumido varianzas iguales	5,256	,029	-,505	29	,617
	No se han asumido varianzas iguales			-,599	25,506	,554

DDimeros	Se han asumido varianzas iguales	1,427	,239	1,036	41	,306
	No se han asumido varianzas iguales			1,085	39,963	,285
FvW	Se han asumido varianzas iguales	3,426	,071	,930	41	,358
	No se han asumido varianzas iguales			,832	19,163	,415
ProtS	Se han asumido varianzas iguales	,221	,641	,306	40	,761
	No se han asumido varianzas iguales			,310	39,831	,758
Homocisteina	Se han asumido varianzas iguales	,001	,981	-,443	41	,660
	No se han asumido varianzas iguales			-,440	37,679	,662
TnT_	Se han asumido varianzas iguales	1,480	,229	1,625	57	,110
	No se han asumido varianzas iguales			1,650	56,223	,105
ProBNP_	Se han asumido varianzas iguales	,296	,588	-,034	56	,973
	No se han asumido varianzas iguales			-,035	44,717	,972

Componente precapilar como DPD ≥ 7 mmHg

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	22,480	,000	-2,555	60	,013
	No se han asumido varianzas iguales			-2,186	28,797	,037
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,201	,278	1,130	60	,263
	No se han asumido varianzas iguales			1,193	56,972	,238

FABP4 ng/ml	Se han asumido	,878	,357	-1,286	29	,208
	varianzas iguales					
MMP7 ng/ml	No se han asumido			-1,229	20,117	,233
	varianzas iguales					
TIMP2 ng/ml	Se han asumido	,156	,696	,237	29	,814
	varianzas iguales					
Cathepsin ng/ml	No se han asumido			,217	17,437	,831
	varianzas iguales					
Galectin1	Se han asumido	,866	,356	,707	60	,482
	varianzas iguales					
ANGPTL4 pg/ml	No se han asumido			,731	54,239	,468
	varianzas iguales					
TRCP6 pg/ml	Se han asumido	6,377	,017	-,890	29	,381
	varianzas iguales					
APJ pg/ml	No se han asumido			-,810	16,958	,429
	varianzas iguales					
Cromogr ng/ml	Se han asumido	1,246	,274	,128	29	,899
	varianzas iguales					
Osteocrin ng/ml	No se han asumido			,124	21,118	,902
	varianzas iguales					
KLF 4 pg/ml	Se han asumido	3,141	,087	1,658	29	,108
	varianzas iguales					
MMP7 ng/ml	No se han asumido			1,856	28,938	,074
	varianzas iguales					
TIMP2 ng/ml	Se han asumido	,073	,789	,395	29	,696
	varianzas iguales					
Cathepsin ng/ml	No se han asumido			,414	26,923	,682
	varianzas iguales					
Galectin1	Se han asumido	2,016	,166	1,114	29	,275
	varianzas iguales					
ANGPTL4 pg/ml	No se han asumido			1,249	28,897	,222
	varianzas iguales					
TRCP6 pg/ml	Se han asumido	3,041	,086	1,097	60	,277
	varianzas iguales					
APJ pg/ml	No se han asumido			1,155	56,690	,253
	varianzas iguales					
Cromogr ng/ml	Se han asumido	,200	,658	1,739	29	,093
	varianzas iguales					
Osteocrin ng/ml	No se han asumido			1,828	27,157	,079
	varianzas iguales					
KLF 4 pg/ml	Se han asumido	.	.	,447	3	,685
	varianzas iguales					

	No se han asumido varianzas iguales					
ADMA uM	Se han asumido varianzas iguales	1,677	,206	,649	29	,522
	No se han asumido varianzas iguales			,797	21,584	,434
Fibrinogeno	Se han asumido varianzas iguales	6,118	,019	-1,036	29	,309
	No se han asumido varianzas iguales			-,889	14,006	,389
DDimeros	Se han asumido varianzas iguales	4,054	,051	-,011	41	,991
	No se han asumido varianzas iguales			-,010	20,341	,992
FvW	Se han asumido varianzas iguales	,874	,355	,377	41	,708
	No se han asumido varianzas iguales			,472	32,648	,640
ProtS	Se han asumido varianzas iguales	,035	,852	-,357	40	,723
	No se han asumido varianzas iguales			-,359	32,383	,722
Homocisteina	Se han asumido varianzas iguales	1,272	,266	,349	41	,729
	No se han asumido varianzas iguales			,363	35,471	,719
TnT_	Se han asumido varianzas iguales	,029	,866	,572	57	,569
	No se han asumido varianzas iguales			,581	49,392	,564
ProBNP_	Se han asumido varianzas iguales	2,220	,142	-,771	56	,444
	No se han asumido varianzas iguales			-,637	24,542	,530

1.3 Detección de la disfunción ventricular derecha

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	2,690	,105	1,101	77	,274
	No se han asumido varianzas iguales			1,143	76,168	,256
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	13,080	,001	-4,702	77	,000
	No se han asumido varianzas iguales			-4,420	50,093	,000
FABP4 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,931	,341	1,004	38	,322
	No se han asumido varianzas iguales			1,019	37,829	,315
MMP7 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	6,465	,015	1,427	38	,162
	No se han asumido varianzas iguales			1,342	23,988	,192
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	4,794	,032	-,880	77	,382
	No se han asumido varianzas iguales			-,851	61,216	,398
Cathepsin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,652	,424	-1,603	38	,117
	No se han asumido varianzas iguales			-1,628	37,880	,112
Galectin1	Se han asumido varianzas iguales	,215	,646	1,200	38	,238
	No se han asumido varianzas iguales			1,197	36,137	,239
ANGPTL4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,433	,239	-2,447	38	,019
	No se han asumido varianzas iguales			-2,521	37,676	,016
TRCP6 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,128	,722	,881	38	,384

	No se han asumido varianzas iguales			,875	35,335	,387
APJ pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,011	,916	-,361	38	,720
	No se han asumido varianzas iguales			-,359	35,545	,721
Cromogr ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,604	,439	-1,596	77	,114
	No se han asumido varianzas iguales			-1,577	69,061	,119
Osteocrin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,092	,763	1,087	38	,284
	No se han asumido varianzas iguales			1,074	34,469	,290
KLF 4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	9,600	,053	-,775	3	,495
	No se han asumido varianzas iguales			-1,000	2,000	,423
ADMA uM	Se han asumido varianzas iguales	1,336	,255	,558	38	,580
	No se han asumido varianzas iguales			,527	24,691	,603
Fibrinogeno	Se han asumido varianzas iguales	,048	,827	-,871	38	,389
	No se han asumido varianzas iguales			-,878	37,417	,385
DDimeros	Se han asumido varianzas iguales	,354	,554	-,767	57	,446
	No se han asumido varianzas iguales			-,776	48,797	,441
FvW	Se han asumido varianzas iguales	7,925	,007	-1,597	57	,116
	No se han asumido varianzas iguales			-1,275	22,213	,216
ProtS	Se han asumido varianzas iguales	1,816	,183	-1,664	56	,102
	No se han asumido varianzas iguales			-1,569	36,646	,125
Homocisteina	Se han asumido varianzas iguales	,071	,790	-,985	57	,329
	No se han asumido varianzas iguales			-1,004	49,917	,320

TnT_	Se han asumido varianzas iguales	,001	,979	-,510	74	,612
	No se han asumido varianzas iguales			-,509	68,320	,613
ProBNP_	Se han asumido varianzas iguales	4,766	,032	-1,705	73	,092
	No se han asumido varianzas iguales			-1,470	33,716	,151

1.4 Relación con el evento muerte o trasplante cardiaco a los 12 meses

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,343	,560	-,908	75	,367
	No se han asumido varianzas iguales			-,902	70,961	,370
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	5,852	,018	-3,042	75	,003
	No se han asumido varianzas iguales			-3,105	72,437	,003
FABP4 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,017	,320	-1,955	37	,058
	No se han asumido varianzas iguales			-2,094	28,955	,045
MMP7 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,379	,542	-1,871	37	,069
	No se han asumido varianzas iguales			-2,036	30,139	,051
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,905	,172	-,392	75	,696
	No se han asumido varianzas iguales			-,396	74,760	,693
Cathepsin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,206	,279	-,111	37	,912

	No se han asumido varianzas iguales				-106	21,195	,917
Galectin1	Se han asumido varianzas iguales	1,667	,205	-2,026	37	,050	
	No se han asumido varianzas iguales			-2,173	29,039	,038	
ANGPTL4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	,004	,948	-571	37	,572	
	No se han asumido varianzas iguales			-585	25,768	,564	
TRCP6 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,278	,266	-300	37	,766	
	No se han asumido varianzas iguales			-272	18,893	,789	
APJ pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	2,624	,114	,302	37	,765	
	No se han asumido varianzas iguales			,275	19,175	,786	
Cromogr ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	12,054	,001	-2,521	75	,014	
	No se han asumido varianzas iguales			-2,602	66,221	,011	
Osteocrin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	,014	,907	,050	37	,960	
	No se han asumido varianzas iguales			,049	22,621	,961	
KLF 4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	.	.	.	3	.	
	No se han asumido varianzas iguales			.	.	.	
ADMA uM	Se han asumido varianzas iguales	18,354	,000	2,056	37	,047	
	No se han asumido varianzas iguales			1,454	12,211	,171	
Fibrinogeno	Se han asumido varianzas iguales	1,801	,188	-2,599	37	,013	
	No se han asumido varianzas iguales			-3,027	35,030	,005	
DDimeros	Se han asumido varianzas iguales	,107	,745	-818	55	,417	
	No se han asumido varianzas iguales			-815	50,992	,419	

FvW	Se han asumido varianzas iguales	,824	,368	,322	55	,749
	No se han asumido varianzas iguales			,359	36,726	,722
ProtS	Se han asumido varianzas iguales	11,362	,001	-3,263	54	,002
	No se han asumido varianzas iguales			-3,034	34,386	,005
Homocisteina	Se han asumido varianzas iguales	1,234	,271	-,860	55	,394
	No se han asumido varianzas iguales			-,882	54,905	,381
TnT_	Se han asumido varianzas iguales	,191	,664	-,701	72	,485
	No se han asumido varianzas iguales			-,710	71,255	,480
ProBNP_	Se han asumido varianzas iguales	1,889	,174	-1,273	71	,207
	No se han asumido varianzas iguales			-1,286	46,617	,205

1.5 Correlación con parámetros hemodinámicos

		VEGF pg/ml	ET-1 pg/ml	FABP4 ng/ml	MMP7 ng/ml	TIMP2 ng/ml	Cathepsin ng/ml
AD	Correlación de Pearson	-,173**	,395	,011**	-,177**	,335**	,445
	Sig. (bilateral)	,130	,000	,946	,273	,003	,004
	N	78	78	40	40	78	40
PsAP	Correlación de Pearson	,121**	,383**	,062	,109**	,190**	,288**
	Sig. (bilateral)	,290	,001	,706	,502	,093	,071
	N	79	79	40	40	79	40
PdAP	Correlación de Pearson	,016**	,435**	-,021**	-,089	,165**	,367**
	Sig. (bilateral)	,892	,000	,899	,585	,146	,020
	N	79	79	40	40	79	40
PAPm	Correlación de Pearson	,077**	,377**	,011**	,016**	,190	,294**
	Sig. (bilateral)	,501	,001	,949	,924	,093	,065
	N	79	79	40	40	79	40
PCP	Correlación de Pearson	-,055	,513**	-,122**	-,142**	,122**	,321**
	Sig. (bilateral)	,627	,000	,455	,383	,286	,043
	N	79	79	40	40	79	40
GTP	Correlación de Pearson	,161**	,172**	,131**	,162**	,193**	,187**
	Sig. (bilateral)	,155	,129	,422	,318	,089	,248
	N	79	79	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,089**	,155**	,125**	,026**	,176**	,229**

Gasto	N	79	79	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,196	-,287	,016	,105	,121	-,145
	Sig. (bilateral)	,083	,010	,922	,521	,286	,372
Índice cardiaco	N	79	79	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,171**	-,387	,006	,250**	,131	-,072
	Sig. (bilateral)	,133	,000	,970	,120	,251	,660
RVP	N	79	79	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,090**	,303**	,091**	,074**	,114**	,273**
	Sig. (bilateral)	,428	,007	,576	,648	,318	,088
	N	79	79	40	40	79	40
		Galectin1	ANGPTL4 pg/ml	TRCP6 pg/ml	APJ pg/ml	CHGA. ng/ml	Osteocr. ng/ml
AD	Correlación de Pearson	,019**	,677**	-,316**	,426**	,328	-,061**
	Sig. (bilateral)	,905	,000	,047	,006	,003	,708
	N	40	40	40	40	78	40
PsAP	Correlación de Pearson	-,005	,376**	-,198**	,059**	,164**	-,206
	Sig. (bilateral)	,978	,017	,222	,718	,150	,203
	N	40	40	40	40	79	40
PdAP	Correlación de Pearson	,009**	,375	-,219**	,057**	,138**	-,269**
	Sig. (bilateral)	,957	,017	,175	,728	,224	,093
	N	40	40	40	40	79	40
PAPm	Correlación de Pearson	-,017**	,345**	-,231	,014**	,126**	-,283**
	Sig. (bilateral)	,919	,029	,152	,934	,267	,077
	N	40	40	40	40	79	40
PCP	Correlación de Pearson	-,019**	,457**	-,199**	,149	,250**	-,144**

GTP	Sig. (bilateral)	,909	,003	,218	,360	,026	,377
	N	40	40	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	-,016**	,143**	-,196**	-,122**	-,003**	-,355**
DPD	Sig. (bilateral)	,921	,378	,226	,452	,978	,025
	N	40	40	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,069**	,101**	-,232**	-,089**	-,061**	-,398**
Gasto	Sig. (bilateral)	,672	,535	,151	,583	,593	,011
	N	40	40	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,183	-,277	-,127	-,047	,122	,005
Índice cardiaco	Sig. (bilateral)	,258	,083	,433	,775	,283	,975
	N	40	40	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	,254	-,246**	-,016	,155**	,096	-,124
RVP	Sig. (bilateral)	,114	,126	,922	,339	,399	,446
	N	40	40	40	40	79	40
	Correlación de Pearson	-,057**	,223**	-,182**	-,081**	-,091**	-,344**
	Sig. (bilateral)	,725	,166	,262	,618	,425	,030
	N	40	40	40	40	79	40
		FOXO1 ng/ml	KLF 4 pg/ml	ADMA uM	Fibrino- geno	D- Dimeros	FvW
AD	Correlación de Pearson	,378**	-,003**	-,011**	-,093	,162**	,141**
	Sig. (bilateral)	,531	,984	,945	,486	,225	,295
	N	5	40	40	58	58	57
PsAP	Correlación de Pearson	-,352**	,001**	,116**	,097**	,061	,239**
	Sig. (bilateral)	,562	,994	,477	,464	,648	,071
	N	5	40	40	59	59	58

PdAP	Correlación de Pearson	-,459	-,117**	,167**	-,009**	,102**	,222
	Sig. (bilateral)	,437	,471	,304	,947	,442	,094
	N	5	40	40	59	59	58
PAPm	Correlación de Pearson	-,439**	-,101	,148**	,035**	,059**	,202**
	Sig. (bilateral)	,459	,537	,361	,791	,659	,128
	N	5	40	40	59	59	58
PCP	Correlación de Pearson	-,417**	-,084**	,073	-,032**	,150**	,186**
	Sig. (bilateral)	,485	,607	,653	,808	,258	,163
	N	5	40	40	59	59	58
GTP	Correlación de Pearson	-,395**	-,088**	,175**	,079**	-,024**	,168**
	Sig. (bilateral)	,510	,589	,280	,552	,859	,207
	N	5	40	40	59	59	58
DPD	Correlación de Pearson	-,426**	-,111**	,226**	,003**	,011**	,187**
	Sig. (bilateral)	,474	,495	,161	,983	,933	,161
	N	5	40	40	59	59	58
Gasto	Correlación de Pearson	-,013	,122	,240	,270	-,158	-,128
	Sig. (bilateral)	,984	,455	,136	,038	,233	,339
	N	5	40	40	59	59	58
Índice cardiaco	Correlación de Pearson	-,268**	,120	,084**	,214	-,188	-,122**
	Sig. (bilateral)	,663	,462	,607	,103	,153	,360
	N	5	40	40	59	59	58
RVP	Correlación de Pearson	-,361**	-,142**	,033**	-,060**	,041**	,211**
	Sig. (bilateral)	,551	,383	,841	,650	,757	,113
	N	5	40	40	59	59	58

		ProtS	Homo- cisteina	TnT	ProBNP		
AD	Correlación de Pearson	,100**	,027**	,148**	,247		
	Sig. (bilateral)	,456	,818	,207	,032		
	N	58	75	74	75		
PsAP	Correlación de Pearson	,107**	,024**	,239**	,305**		
	Sig. (bilateral)	,421	,840	,039	,007		
	N	59	76	75	76		
PdAP	Correlación de Pearson	,154**	-,108**	,264**	,402**		
	Sig. (bilateral)	,243	,352	,022	,000		
	N	59	76	75	76		
PAPm	Correlación de Pearson	,149	-,060**	,217**	,325**		
	Sig. (bilateral)	,261	,606	,062	,004		
	N	59	76	75	76		
PCP	Correlación de Pearson	,191**	-,108	,195**	,430**		
	Sig. (bilateral)	,148	,355	,094	,000		
	N	59	76	75	76		
GTP	Correlación de Pearson	,083**	-,010**	,177	,158**		
	Sig. (bilateral)	,533	,935	,130	,173		
	N	59	76	75	76		
DPD	Correlación de Pearson	,070**	-,064**	,235**	,200**		
	Sig. (bilateral)	,599	,583	,042	,083		
	N	59	76	75	76		
Gasto	Correlación de Pearson	,009	,256	-,189	-,208		
	Sig. (bilateral)	,947	,025	,105	,071		
	N	59	76	75	76		

Índice cardiaco	Correlación de Pearson	-,204	,178**	-,177	-,259
	Sig. (bilateral)	,122	,124	,129	,024
	N	59	76	75	76
	Correlación de Pearson	,129**	-,096**	,397**	,367**
RVP	Sig. (bilateral)	,328	,411	,000	,001
	N	59	76	75	76

1.6 Pacientes con miocardiopatía dilatada

Cuatro grupos: NHP, HPP, HPMR, HPMI					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
Cathepsin ng/ml	Inter-grupos	23886,863	7962,288	4,908	,017
	Intra-grupos	21088,667	1622,205		
	Total	44975,529			
Osteocrin ng/ml	Inter-grupos	31,755	10,585	3,946	,033
	Intra-grupos	34,870	2,682		
	Total	66,625			
ADMA uM	Inter-grupos	,377	,126	8,142	,003
	Intra-grupos	,200	,015		
	Total	,577			
Tres grupos GTP: NHP, HPP, HPM					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
Osteocrin ng/ml	Inter-grupos	31,740	15,870	6,369	,011
	Intra-grupos	34,884	2,492		
	Total	66,625			
ADMA uM	Inter-grupos	,184	,092	3,283	,038
	Intra-grupos	,393	,028		
	Total	,577			

Tres grupos GTP: NHP, HPP, HPM					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
ADMA uM	Inter-grupos	,170	,085	2,932	,041
	Intra-grupos	,407	,029		
	Total	,577			

Dos grupos: NHP, HP						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	3,758	,067	-1,433	20	,167
	No se han asumido varianzas iguales			-2,877	19,994	,009
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	2,780	,111	-1,562	20	,134
	No se han asumido varianzas iguales			-3,184	19,814	,005
Cathepsin ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,221	,287	-2,163	15	,047
	No se han asumido varianzas iguales			-2,632	7,293	,033
ADMA uM	Se han asumido varianzas iguales	,393	,540	-2,407	15	,029
	No se han asumido varianzas iguales			-2,840	6,794	,026
Componente precapilar						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Osteocrin ng/ml GTP	Se han asumido varianzas iguales	1,640	,227	3,406	11	,006
	No se han asumido varianzas iguales			3,290	8,326	,010

ET-1 pg/ml DPD	Se han asumido varianzas iguales	,586	,455	2,054	16	,057
	No se han asumido varianzas iguales			2,238	15,845	,040
ANGPTL4 pg/ml DPD	Se han asumido varianzas iguales	1,321	,275	2,160	11	,054
	No se han asumido varianzas iguales			2,541	10,464	,028
Disfunción VD						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
ANGPTL4 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,681	,214	-1,696	15	,111
	No se han asumido varianzas iguales			-2,039	14,993	,039
Muerte o trasplante						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	3,331	,083	-1,212	20	,240
	No se han asumido varianzas iguales			-3,002	19,827	,007
ADMA uM/ml	Se han asumido varianzas iguales	,581	,458	-2,132	15	,050
	No se han asumido varianzas iguales			-2,841	4,408	,042

		ET-1 pg/ml	TIMP2 ng/ml	ANGPTL4 pg/ml	CHGA. ng/ml	Osteocr. ng/ml	ADMA uM
AD	Correlación de Pearson	,599	,439	,782	,626	-,156	,144
	Sig. (bilateral)	,003	,041	,000	,002	,551	,582
	N	22	22	17	22	17	17
PsAP	Correlación	,093	,066	,053	,123	-,539	,315

PdAP	de Pearson						
	Sig. (bilateral)	,681	,769	,841	,585	,026	,218
	N	22	22	17	22	17	17
PAPm	Correlación de Pearson	,112	,370	,310	,199	-,464	,489
	Sig. (bilateral)	,620	,090	,226	,375	,061	,046
	N	22	22	17	22	17	17
PCP	Correlación de Pearson	,102	,216	,201	,122	-,470	,437
	Sig. (bilateral)	,653	,333	,439	,589	,057	,080
	N	22	22	17	22	17	17
GTP	Correlación de Pearson	,225	,330	,387	,398	-,161	,327
	Sig. (bilateral)	,314	,133	,125	,066	,536	,199
	N	22	22	17	22	17	17
DPD	Correlación de Pearson	-,062	,031	-,053	-,204	-,663	,399
	Sig. (bilateral)	,785	,890	,840	,362	,004	,112
	N	22	22	17	22	17	17
Gasto	Correlación de Pearson	-,271	,260	-,020	-,346	-,681	,426
	Sig. (bilateral)	,223	,243	,939	,115	,003	,088
	N	22	22	17	22	17	17
Índice cardiaco	Correlación de Pearson	-,264	-,205	-,254	,156	-,350	,231
	Sig. (bilateral)	,235	,360	,325	,488	,168	,373
	N	22	22	17	22	17	17
RVP	Correlación de Pearson	-,316	-,268	-,355	,234	-,143	,021
	Sig. (bilateral)	,152	,227	,162	,294	,585	,935
	N	22	22	17	22	17	17
RVP	Correlación de Pearson	,043	,144	,040	-,247	-,481	,380
	Sig.	,850	,523	,879	,267	,050	,132

(bilateral)						
N	22	22	17	22	17	17

1.7 Pacientes con miocardiopatía isquémica

Cuatro grupos: NHP, HPP, HPMR, HPMI					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
TIMP2 ng/ml	Inter-grupos	26153,210	8717,737	3,749	,023
	Intra-grupos	62787,758	2325,473		
	Total	88940,968			
Tres grupos GTP: NHP, HPP, HPM					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
TIMP2 ng/ml	Inter-grupos	24091,357	12045,679	5,201	,012
	Intra-grupos	64849,610	2316,058		
	Total	88940,968			
Cromogr ng/ml	Inter-grupos	152838,282	76419,141	4,030	,029
	Intra-grupos	530997,266	18964,188		
	Total	683835,548			
Tres grupos GTP: NHP, HPP, HPM					
		Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig. p
VEGF pg/ml	Inter-grupos	256400,125	128200,063	4,359	,022
	Intra-grupos	823502,262	29410,795		
	Total	1079902,387			
ET-1 pg/ml	Inter-grupos	22,986	11,493	3,789	,035
	Intra-grupos	84,933	3,033		
	Total	107,919			

Dos grupos: NHP, HP						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	8,859	,006	-1,872	29	,071
	No se han asumido varianzas iguales			-3,635	28,544	,001
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	3,188	,085	-2,243	29	,033
	No se han asumido varianzas iguales			-3,231	14,827	,006
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	6,371	,017	-2,266	29	,031
	No se han asumido varianzas iguales			-4,261	28,982	,000
NT-ProBNP	Se han asumido varianzas iguales	2,917	,099	-1,592	28	,123
	No se han asumido varianzas iguales			-3,179	24,377	,004
Componente precapilar						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
TIMP2 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	8,268	,009	2,038	23	,053
	No se han asumido varianzas iguales			1,927	15,818	,072
GTP	Se han asumido varianzas iguales	6,482	,018	2,178	23	,040
	No se han asumido varianzas iguales			2,054	15,568	,057
Cromogr. DPD	Se han asumido varianzas iguales	9,342	,006	-2,391	23	,025
	No se han asumido varianzas iguales			-1,776	7,115	,118
D-Dimeros DPD	Se han asumido varianzas iguales	8,898	,009	-2,380	15	,031
	No se han asumido varianzas iguales					

	No se han asumido varianzas iguales			-1,388	3,155	,255
Disfunción VD						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
ET-1 pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	1,945	,174	-3,109	29	,004
	No se han asumido varianzas iguales			-2,981	21,303	,007
Muerte o trasplante						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
VEGF pg/ml	Se han asumido varianzas iguales	16,149	,000	-2,969	28	,006
	No se han asumido varianzas iguales			-3,324	20,026	,003
MM7 ng/ml	Se han asumido varianzas iguales	4,687	,043	-2,403	20	,026
	No se han asumido varianzas iguales			-2,570	15,214	,021

		ET-1 pg/ml	VEGF ng/ml	ANGPTL4 pg/ml	Catep. ng/ml	TnT. ng/ml	NT-Pro BNP
AD	Correlación de Pearson	,598	,011 **	,630 **	,510	,234 **	,299
	Sig. (bilateral)	,000	,953	,001	,013	,223	,108
	N	31	31	23	23	29	30
PsAP	Correlación de Pearson	,631 **	,367 **	,616 **	,440 **	,381 **	,443 **
	Sig. (bilateral)	,000	,042	,002	,035	,041	,014
	N	31	31	23	23	29	30
PdAP	Correlación de Pearson	,537 **	,291 **	,469	,504 **	,351 **	,464 **
	Sig.	,002	,112	,024	,014	,062	,010

PAPm	(bilateral)						
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	,488**	,365**	,479**	,404**	,321**	,421**
PCP	Sig. (bilateral)	,005	,044	,021	,056	,090	,021
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	,610**	,150	,543**	,429**	,221**	,404**
GTP	Sig. (bilateral)	,000	,421	,007	,041	,250	,027
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	,262**	,475**	,300**	,280**	,341	,345**
DPD	Sig. (bilateral)	,154	,007	,164	,196	,070	,062
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	,282**	,427**	,221**	,357**	,443**	,427**
Gasto	Sig. (bilateral)	,125	,017	,311	,094	,016	,018
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	-,186	,138	-,277	-,358	-,233	-,057
Índice cardiaco	Sig. (bilateral)	,317	,460	,200	,094	,224	,765
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	-,275	,098*	-,181*	-,215	-,158	-,083
RVP	Sig. (bilateral)	,135	,599	,409	,324	,413	,663
	N	31	31	23	23	29	30
	Correlación de Pearson	,345**	,343**	,339**	,465**	,584**	,537**
	Sig. (bilateral)	,058	,059	,113	,025	,001	,002
	N	31	31	23	23	29	30

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Versión de la HIP: 2	Fecha de la versión: 29/03/12
Investigador Principal: JOSEP LLUIS MELERO FERRER SERVICIO DE CARDIOLOGIA	
CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITECNIC LA FE	
Título del proyecto de investigación: Diagnóstico y caracterización de la hipertensión pulmonar de causa izquierda mediante la identificación de un nuevo perfil de biomarcadores circulantes	

1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

La hipertensión pulmonar debida a enfermedad del corazón izquierdo es una patología frecuente, grave y asociada a un importante incremento de morbilidad y mortalidad en los pacientes que la padecen. Llamamos hipertensión pulmonar a la situación en que la sangre circula a presiones elevadas por la circulación pulmonar, bien debido a un problema de vaciamiento de la sangre hacia las cavidades cardiacas izquierdas, bien debido a un aumento del tono muscular de las arterias pulmonares, o bien a ambas. Estas presiones elevadas provocan que el ventrículo derecho deba realizar más fuerza y soportar una mayor tensión para poder bombear la sangre hacia la circulación pulmonar, lo que a la larga produce un deterioro de la función ventricular derecha y el desarrollo de síntomas de insuficiencia cardiaca derecha.

En el caso que nos ocupa, la hipertensión pulmonar que queremos estudiar es la clasificada como grupo 2 o debida a enfermedad del corazón izquierdo. En este grupo existe ya una enfermedad previa que afecta a cavidades y/o válvulas izquierdas (miocardiopatía, estenosis valvulares..) que es la que provoca la hipertensión pulmonar al suponer una dificultad para el vaciamiento de la sangre que se encuentra en los pulmones. Es lo que se conoce como hipertensión pulmonar pasiva o poscapilar debida a la transmisión de las presiones de llenado del corazón izquierdo hacia el árbol vascular pulmonar. Además, con el paso del tiempo se puede desarrollar en estos pacientes un componente reactivo del lecho vascular pulmonar, por vasoconstricción de las arterias, que llamamos hipertensión pulmonar precapilar, y que empeora la evolución y el pronóstico de los pacientes que lo padecen.

Lo que se pretende con este estudio es intentar poder identificar el tipo de hipertensión pulmonar mediante la determinación en una analítica sanguínea de unas sustancias proteicas que conocemos como biomarcadores. Este hallazgo complementaría a las técnicas diagnósticas invasivas habituales y contribuiría a planificar y seleccionar un tratamiento más adecuado para esta patología.

El presente estudio, diseñado como un estudio observacional prospectivo está dirigido a pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca avanzada, a los que se tenga que realizar un cateterismo cardíaco derecho por indicación clínica. Los pacientes serán seleccionados desde la Unidad de Insuficiencia Cardiaca y Trasplante del Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Para participar en el estudio, lo único que se necesitamos de su parte es que firme el consentimiento que encontrará en la última de estas hojas.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Como se acaba de indicar en el apartado anterior, está dirigido a pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca avanzada, a los que se tenga que realizar un cateterismo cardíaco derecho por indicación clínica y no por el hecho de participar en el estudio. Por ello, no es esperable ningún riesgo adicional derivado de la participación en el estudio, puesto que la toma de muestras sanguíneas se realiza durante el mismo procedimiento de cateterización cardiaca, sin requerir ninguna instrumentación adicional del paciente y alargando mínimamente la exploración (menos de 1 minuto).

Del mismo modo, no es esperable ningún beneficio inmediato por la participación en el estudio. Las muestras se almacenan congeladas hasta reunir el número suficiente para su estudio y el análisis de los resultados conlleva su tiempo, por lo que pueden pasar varios años antes de que un hallazgo médicamente interesante pueda ser llevado a la práctica clínica habitual.

5. N° DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dr. Melero en el número de teléfono 489338

6. CONFIDENCIALIDAD:

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio o colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. El acceso a su historia clínica ha de ser sólo en lo relativo al estudio.

7. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto.

8. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la mediación en estudio o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación

recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad.

IX. REFERENCIAS

- 1) Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, et al; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2009 Oct;30(20):2493-537.
- 2) McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al; American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents; American Heart Association; American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc; Pulmonary Hypertension Association. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 28;53(17):1573-619
- 3) Cappola TP, Felker GM, Kao WH, Hare JM, Baughman KL, Kasper EK. Pulmonary hypertension and risk of death in cardiomyopathy: patients with myocarditis are at higher risk. *Circulation*. 2002;105:1663–1668.
- 4) Kjaergaard J, Akkan D, Iversen KK, Kjoller E, Køber L, Torp-Pedersen C, Hassager C. Prognostic importance of pulmonary hypertension in patients with heart failure. *Am J Cardiol*. 2007;99:1146–1150.
- 5) Fang JC, DeMarco T, Givertz MM, et al. World Health Organization Pulmonary Hypertension Group 2: Pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult population. Summary statement from the Pulmonary Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:913–33.
- 6) Guazzi M, Borlaug BA. Pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circulation* 2012;126:975–90.

- 7) Ghio S, Gavazzi A, Campana C, et al. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:183–8
- 8) Meyer P, Filippatos GS, Ahmed MI, et al Effects of right ventricular ejection fraction on outcomes in chronic systolic heart failure. *Circulation*. 2010;121:252–258.
- 9) Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics–2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125:e2–e220.
- 10) Chen J, Normand SL, Wang Y, Krumholz HM. National and regional trends in heart failure hospitalization and mortality rates for Medicare beneficiaries, 1998-2008. *JAMA*. 2011;306:1669–1678.
- 11) Krum H, Teerlink JR. Medical therapy for chronic heart failure. *Lancet*. 2011;378:713–721.
- 12) Lam CS, Roger VL, Rodeheffer RJ, Borlaug BA, Enders FT, Redfield MM. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1119–26.
- 13) Bursi F, McNallan SM, Redfield MM, et al. Pulmonary pressures and death in heart failure: a community study. *J Am Coll Cardiol* 2012;17: 222–31.
- 14) Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S43-54
- 15) Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D34-41.
- 16) Rosenkranz S, Bonderman D, Buerke M, et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease: updated recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011. *Int J Cardiol* 2011; 154: Suppl. 1, S34–S44.
- 17) Hoeper MM. Definition, classification, and epidemiology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009;30:369–375.

- 18) Kovacs G, Olschewski A, Berghold A, Olschewski H. Pulmonary vascular resistances during exercise in normal subjects: a systematic review. *Eur Respir J*. 2012;39:319–328.
- 19) Vachiéry JL, Adir Y, Barberà JA, et al. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D100-8.
- 20) Naeije R, Vachiery JL, Yerly P, Vanderpool R. The transpulmonary pressure gradient for the diagnosis of pulmonary vascular disease. *Eur Respir J*. 2013 Jan;41(1):217-23.
- 21) Provencher S, Hervé P, Sitbon O, Humbert M, Simonneau G, Chemla D. Changes in exercise haemodynamics during treatment in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2008 Aug;32(2):393-8
- 22) Rapp AH, Lange RA, Cigarroa JE, Keeley EC, Hillis LD. Relation of pulmonary arterial diastolic and mean pulmonary arterial wedge pressures in patients with and without pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 2001 Oct 1;88(7):823-4.
- 23) Magne J, Lancellotti P, Piérard LA. Exercise pulmonary hypertension in asymptomatic degenerative mitral regurgitation. *Circulation*. 2010 Jul 6;122(1):33-41.
- 24) Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, et al. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates—2006. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:1024–1042.
- 25) Goland S, Czer LS, Kass RM, et al. Pre-existing pulmonary hypertension in patients with end-stage heart failure: impact on clinical outcome and hemodynamic follow-up after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:312–318.
- 26) Mikus E, Stepanenko A, Krabatsch T, Dandel M, Lehmkuhl HB, Loforte A, Hetzer R, Potapov EV. Left ventricular assist device or heart transplantation: impact of transpulmonary gradient and pulmonary vascular resistance.
- 27) Moraes DL, Colucci WS, Givertz MM. Secondary pulmonary hypertension in chronic heart failure: the role of the endothelium in pathophysiology and management. *Circulation*. 2000;102:1718–1723.ç

- 28) Leung CC, Moondra V, Catherwood E, Andrus BW. Prevalence and risk factors of pulmonary hypertension in patients with elevated pulmonary venous pressure and preserved ejection fraction. *Am J Cardiol.* 2010;106:284–286.
- 29) Damy T, Goode KM, Kallvikbacka-Bennett A, Lewinter C, Hobkirk J, Nikitin NP, Dubois-Randé JL, Hittinger L, Clark AL, Cleland JG. Determinants and prognostic value of pulmonary arterial pressure in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2010;31:2280–2290.
- 30) Tumminello G, Lancellotti P, Lempereur M, D’Orio V, Pierard LA. Determinants of pulmonary artery hypertension at rest and during exercise in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 2007;28:569–574.
- 31) Maréchaux S, Neicu DV, Braun S, Richardson M, Delsart P, Bouabdallaou N, Banfi C, Gautier C, Graux P, Asseman P, Pibarot P, Le Jemtel TH, Ennezat PV; Lille HFpEF Study Group. Functional mitral regurgitation: a link to pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction. *J Card Fail.* 2011;17:806–812.
- 32) Berger G, Hardak E, Obaid W, Shaham B, Carasso S, Kerner A, Yigla M, Azzam ZS. Characterization of pulmonary venous hypertension patients with reactive pulmonary hypertension as compared to proportional pulmonary hypertension. *Respiration.* 2012;83:494–498.
- 33) Tatebe S, Fukumoto Y, Sugimura K, Miyamichi-Yamamoto S, Aoki T, Miura Y, Nochioka K, Satoh K, Shimokawa H. Clinical significance of reactive post-capillary pulmonary hypertension in patients with left heart disease. *Circ J.* 2012;76:1235–1244.
- 34) Redfield MM, Jacobsen SJ, Borlaug BA, Rodeheffer RJ, Kass DA. Age and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study. *Circulation.* 2005;112:2254–2262.
- 35) Stevenson LW, Zile M, Bennett TD, et al. Chronic ambulatory intracardiac pressures and future heart failure events. *Circ Heart Fail.* 2010;3:580–587.
- 36) Zile MR, Bennett TD, St John Sutton M, et al. Transition from chronic compensated to acute decompensated heart failure: pathophysiological

- insights obtained from continuous monitoring of intracardiac pressures. *Circulation*. 2008;118:1433–1441.
- 37) Aronson D, Eitan A, Dragu R, Burger AJ. Relationship between reactive pulmonary hypertension and mortality in patients with acute decompensated heart failure. *Circ Heart Fail*. 2011;4:644–650.
- 38) Braunwald E, Braunwald NS, Ross J Jr, Morrow AG. Effects of mitral valve replacement on the pulmonary vascular dynamics of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1965;273:509–514.
- 39) Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J*. 2012;33:2451–2496.
- 40) Schrier RW, Bansal S. Pulmonary hypertension, right ventricular failure, and kidney: different from left ventricular failure? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:1232–1237.
- 41) Heath D, Edwards JE. Histological changes in the lung in diseases associated with pulmonary venous hypertension. *Br J Dis Chest*. 1959;53:8–18.
- 42) Chazova I, Loyd JE, Zhdanov VS, Newman JH, Belenkov Y, Meyrick B. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 1995;146:389–397.
- 43) Borlaug BA, Nishimura RA, Sorajja P, Lam CS, Redfield MM. Exercise hemodynamics enhance diagnosis of early heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2010;3:588–595.
- 44) Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1 suppl):S55–S66.
- 45) Shim CY, Kim SA, Choi D, et al. Clinical outcomes of exercise-induced pulmonary hypertension in subjects with preserved left ventricular ejection fraction: implication of an increase in left ventricular filling pressure during exercise. *Heart*. 2011;97:1417–1424.
- 46) Borlaug BA, Jaber WA, Ommen SR, Lam CS, Redfield MM, Nishimura RA. Diastolic relaxation and compliance reserve during dynamic exercise in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart*. 2011;97:964–969.

- 47) Tolle JJ, Waxman AB, Van Horn TL, Pappagianopoulos PP, Systrom DM. Exercise-induced pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2008;118:2183–2189.
- 48) Innes JA, De Cort SC, Kox W, Guz A. Within-breath modulation of left ventricular function during normal breathing and positive-pressure ventilation in man. *J Physiol (Lond)*. 1993;460:487–502.
- 49) Abramson SV, Burke JF, Kelly JJ Jr, et al. Pulmonary hypertension predicts mortality and morbidity in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1992; 116: 888–895.
- 50) Costard-Jäckle A, Fowler MB. Influence of preoperative pulmonary artery pressure on mortality after heart transplantation: testing of potential reversibility of pulmonary hypertension with nitroprusside is useful in defining a high risk group. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 48–54.
- 51) Grigioni F, Potena L, Galiè N, et al. Prognostic implications of serial assessments of pulmonary hypertension in severe chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1241–1246.
- 52) Stevenson LW. Are hemodynamic goals viable in tailoring heart failure therapy? Hemodynamic goals are relevant. *Circulation*. 2006;113:1020–1027; discussion 1033.
- 53) Butler J, Chomsky DB, Wilson JR. Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34: 1802–1806.
- 54) Hart SA, Krasuski RA, Wang A, et al. Pulmonary hypertension and elevated transpulmonary gradient in patients with mitral stenosis. *J Heart Valve Dis* 2010; 19: 708–715.
- 55) Alexopoulos D, Lazzam C, Borricco S, Fiedler L, Ambrose JA. Isolated chronic mitral regurgitation with preserved systolic left ventricular function and severe pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1989;14:319–322.
- 56) Silver K, Aurigemma G, Krendel S, et al. Pulmonary artery hypertension in severe aortic stenosis: incidence and mechanism. *Am Heart J* 1993; 125: 146–150.

- 57) Johnson LW, Hapanowicz MB, Buonanno C, et al. Pulmonary hypertension in isolated aortic stenosis. Hemodynamic correlations and follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95: 603–607.
- 58) Melby SJ, Moon MR, Lindman BR, et al. Impact of pulmonary hypertension on outcomes after aortic valve replacement for aortic valve stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141: 1424–1430.
- 59) Khandhar S, Varadarajan P, Turk R, Sampat U, Patel R, Kamath A, Pai RG. Survival benefit of aortic valve replacement in patients with severe aortic regurgitation and pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg*. 2009;88:752–756.
- 60) Humbert M. The burden of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2007 Jul;30(1):1-2.
- 61) Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 1;173(9):1023-30.
- 62) Thenappan T, Shah SJ, Gomberg-Maitland M, et al. Clinical characteristics of pulmonary hypertension in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2011; 4: 257–265.
- 63) Guazzi M, Galiè N. Pulmonary hypertension in left heart disease. *Eur Respir Rev*. 2012 Dec 1;21(126):338-46.
- 64) Jambrik Z, Monti S, Coppola V, Agricola E, Mottola G, Miniati M, Picano E. Usefulness of ultrasound lung comets as a nonradiologic sign of extravascular lung water. *Am J Cardiol*. 2004 May 15;93(10):1265-70.
- 65) Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen HA, et al. Doppler tissue imaging: a noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1527–1533.
- 66) Bhella PS, Pacini EL, Prasad A, et al. Echocardiographic indices do not reliably track changes in left-sided filling pressure in healthy subjects or patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Cardiovasc Imaging* 2011; 4: 482–489.
- 67) Ristow B, Ali S, Ren X, Whooley MA, Schiller NB. Elevated pulmonary artery pressure by Doppler echocardiography predicts hospitalization for heart failure

- and mortality in ambulatory stable coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:43–49.
- 68) Temporelli PL, Scapellato F, Eleuteri E, Imparato A, Giannuzzi P. Doppler echocardiography in advanced systolic heart failure: a noninvasive alternative to Swan-Ganz catheter. *Circ Heart Fail.* 2010;3:387–394.
- 69) Lanzarini L, Fontana A, Lucca E, Campana C, Klersy C. Noninvasive estimation of both systolic and diastolic pulmonary artery pressure from Doppler analysis of tricuspid regurgitant velocity spectrum in patients with chronic heart failure. *Am Heart J.* 2002;144:1087–1094.
- 70) Stein JH, Neumann A, Preston LM, Costanzo MR, Parrillo JE, Johnson MR, Marcus RH. Echocardiography for hemodynamic assessment of patients with advanced heart failure and potential heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1765–1772.
- 71) McClanahan A, Guglin M. Right ventricular dysfunction compromises accuracy of echocardiographic diagnosis of pulmonary hypertension in heart failure. *J Card Fail.* 2011;17:1023–1027.
- 72) Abbas AE, Fortuin FD, Schiller NB, Appleton CP, Moreno CA, Lester SJ. A simple method for noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1021–1027.
- 73) Farzaneh-Far R, McKeown BH, Dang D, Roberts J, Schiller NB, Foster E. Accuracy of Doppler-estimated pulmonary vascular resistance in patients before liver transplantation. *Am J Cardiol.* 2008;101:259–262.
- 74) Roule V, Labombarda F, Pellissier A, Sabatier R, Lognoné T, Gomes S, Bergot E, Milliez P, Grollier G, Saloux E. Echocardiographic assessment of pulmonary vascular resistance in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Ultrasound.* 2010;8:21.
- 75) Bhatt DD, Manoj R, Mahajan R. Estimation of pulmonary vascular resistance: correlation between echocardiography and catheterization data in patients with congenital heart disease. *Echocardiography.* 2012;29:478–483.

- 76) Hoeper MM, Barberà JA, Channick RN, et al. Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: Suppl. 1, S85–S96.
- 77) Ryan JJ, Rich JD, Thiruvoipati T, et al. Current practice for determining pulmonary capillary wedge pressure predisposes to serious errors in the classification of patients with pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2012; 163: 589–594.
- 78) Champion HC, Michelakis ED, Hassoun PM. Comprehensive invasive and noninvasive approach to the right ventricle-pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circulation* 2009; 120: 992–1007.
- 79) Haddad F, Kudelko K, Mercier O, et al. Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies. *Prog Cardiovasc Dis* 2011; 54:154–167.
- 80) Loh E, Stamler JS, Hare JM, et al. Cardiovascular effects of inhaled nitric oxide in patients with left ventricular dysfunction. *Circulation* 1994; 90: 2780–2785.
- 81) Kieler-Jensen N, Lundin S, Ricksten SE. Vasodilator therapy after heart transplantation: effects of inhaled nitric oxide and intravenous prostacyclin, prostaglandin E1, and sodium nitroprusside. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 436–443.
- 82) Argenziano M, Choudhri AF, Moazami N, et al. Randomized, double-blind trial of inhaled nitric oxide in LVAD recipients with pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 340–345.
- 83) Hare JM, Shernan SK, Body SC, et al. Influence of inhaled nitric oxide on systemic flow and ventricular filling pressure in patients receiving mechanical circulatory assistance. *Circulation* 1997; 95:2250–2253.
- 84) Yui Y, Nakajima H, Kawai C, et al. Prostacyclin therapy in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1982; 50: 320–324.
- 85) Haraldsson A, Kieler-Jensen N, Nathorst-Westfelt U, et al. Comparison of inhaled nitric oxide and inhaled aerosolized prostacyclin in the evaluation of heart transplant candidates with elevated pulmonary vascular resistance. *Chest* 1998; 114: 780–786.

- 86) Sueta CA, Gheorghiade M, Adams KF Jr, et al. Safety and efficacy of epoprostenol in patients with severe congestive heart failure. Epoprostenol Multicenter Research Group. *Am J Cardiol* 1995; 75:34A–43A.
- 87) Califf RM, Adams KF, McKenna WJ, et al. A randomized controlled trial of epoprostenol therapy for severe congestive heart failure: the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J* 1997; 134: 44–54.
- 88) Sütsch G, Kiowski W, Yan XW, et al. Short-term oral endothelin receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98:2262–2268.
- 89) Kalra PR, Moon JC, Coats AJ. Do results of the ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure) study spell the end for non-selective endothelin antagonism in heart failure? *Int J Cardiol* 2002; 85: 195–197.
- 90) Alaeddini J, Uber PA, Park MH, et al. Efficacy and safety of sildenafil in the evaluation of pulmonary hypertension in severe heart failure. *Am J Cardiol* 2004; 94: 1475–1477.
- 91) Guazzi M, Tumminello G, Di Marco F, et al. The effects of phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil on pulmonary hemodynamics and diffusion capacity, exercise ventilatory efficiency, and oxygen uptake kinetics in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 2339–2348.
- 92) Guazzi M, Samaja M, Arena R, et al. Long-term use of sildenafil in the therapeutic management of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2136–2144.
- 93) Lewis GD, Shah R, Shahzad K, et al. Sildenafil improves exercise capacity and quality of life in patients with systolic heart failure and secondary pulmonary hypertension. *Circulation* 2007; 116:1555–1562.
- 94) Behling A, Rohde LE, Colombo FC, et al. Effects of 59-phosphodiesterase four-week long inhibition with sildenafil in patients with chronic heart failure: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Card Fail* 2008; 14: 189–197.

- 95) Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, et al. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a target of phosphodiesterase-5 inhibition in a 1-year study. *Circulation* 2011; 124: 164–174.
- 96) Guazzi M, Vicenzi M, Arena R. Phosphodiesterase 5 inhibition with sildenafil reverses exercise oscillatory breathing in chronic heart failure: a long-term cardiopulmonary exercise testing placebo-controlled study. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 82–90.
- 97) Stasch JP, Pacher P, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation*. 2011 May 24;123(20):2263-73.
- 98) Ghofrani HA, Galiè N, Grimminger F, et al.; PATENT-1 Study Group. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013 Jul 25;369(4):330-40
- 99) Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, et al.; CHEST-1 Study Group. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 2013 Jul 25;369(4):319-29
- 100) Bonderman D, Ghio S, Felix SB, et al ; Left Ventricular Systolic Dysfunction Associated With Pulmonary Hypertension Riociguat Trial (LEPHT) Study Group. Riociguat for patients with pulmonary hypertension caused by systolic left ventricular dysfunction: a phase IIb double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-ranging hemodynamic study. *Circulation*. 2013 Jul 30;128(5):502-11
- 101) Fawzy ME, Hegazy H, Shoukri M, et al. Long-term clinical and echocardiographic results after successful mitral balloon valvotomy and predictors of long-term outcome. *Eur Heart J* 2005; 26:1647–1652
- 102) Mubeen M, Singh AK, Agarwal SK, et al. Mitral valve replacement in severe pulmonary arterial hypertension. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2008; 16: 37–42.
- 103) Costanzo MR, Augustine S, Bourge R, Bristow M, O'Connell JB, Driscoll D, Rose E. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. A statement for health professionals from the Committee on Heart Failure and

- Cardiac Transplantation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:3593–3612.
- 104) Kittleson MM, Kobashigawa JA. Management of advanced heart failure: the role of heart transplantation. *Circulation*. 2011;123:1569–1574.
- 105) Costard-Jäckle A, Fowler MB. Influence of preoperative pulmonary artery pressure on mortality after heart transplantation: testing of potential reversibility of pulmonary hypertension with nitroprusside is useful in defining a high risk group. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:48–54.
- 106) Drakos SG, Kfoury AG, Gilbert EM, Horne BD, Long JW, Stringham JC, Campbell BA, Renlund DG. Effect of reversible pulmonary hypertension on outcomes after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:319–323.
- 107) Haddad H, Elabbassi W, Moustafa S, Davies R, Mesana T, Hendry P, Masters R, Mussivand T. Left ventricular assist devices as bridge to heart transplantation in congestive heart failure with pulmonary hypertension. *ASAIO J*. 2005;51:456–460.
- 108) Martin J, Siegenthaler MP, Friesewinkel O, Fader T, van de Loo A, Trummer G, Berchtold-Herz M, Beyersdorf F. Implantable left ventricular assist device for treatment of pulmonary hypertension in candidates for orthotopic heart transplantation—a preliminary study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25:971–977.
- 109) Salzberg SP, Lachat ML, von Harbou K, Zünd G, Turina MI. Normalization of high pulmonary vascular resistance with LVAD support in heart transplantation candidates. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27:222–225.
- 110) Zimpfer D, Zrunek P, Sandner S, Schima H, Grimm M, Zuckermann A, Wolner E, Wieselthaler G. Post-transplant survival after lowering fixed pulmonary hypertension using left ventricular assist devices. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31:698–702.
- 111) John R, Liao K, Kamdar F, Eckman P, Boyle A, Colvin-Adams M. Effects on pre- and posttransplant pulmonary hemodynamics in patients with continuous-

- flow left ventricular assist devices. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;140:447–452.
- 112) Nair PK, Kormos RL, Teuteberg JJ, Mathier MA, Bermudez CA, Toyoda Y, Dew MA, Simon MA. Pulsatile left ventricular assist device support as a bridge to decision in patients with end-stage heart failure complicated by pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:201–208.
- 113) Torre-Amione G, Southard RE, Loebe MM, Youker KA, Bruckner B, Estep JD, Tierney M, Noon GP. Reversal of secondary pulmonary hypertension by axial and pulsatile mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:195–200.
- 114) Shalaby A, Voigt A, El-Saed A, Saba S. Usefulness of pulmonary artery pressure by echocardiography to predict outcome in patients receiving cardiac resynchronization therapy heart failure. *Am J Cardiol.* 2008;101:238–241.
- 115) Adhyapak SM. Effect of right ventricular function and pulmonary pressures on heart failure prognosis. *Prev Cardiol.* 2010;13:72–77.
- 116) Khush KK, Tasissa G, Butler J, McGlothlin D, De Marco T; ESCAPE Investigators. Effect of pulmonary hypertension on clinical outcomes in advanced heart failure: analysis of the Evaluation Study of Congestive Heart Failure and Pulmonary Artery Catheterization Effectiveness (ESCAPE) database. *Am Heart J.* 2009;157:1026–1034.
- 117) Abraham WT, Adamson PB, Bourge RC, et al; CHAMPION Trial Study Group. Wireless pulmonary artery haemodynamic monitoring in chronic heart failure: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2011;377:658–666.
- 118) Guazzi M. Alveolar gas diffusion abnormalities in heart failure. *J Card Fail.* 2008;14:695–702.
- 119) West JB, Mathieu-Costello O. Vulnerability of pulmonary capillaries in heart disease. *Circulation* 1995; 92: 622–631.
- 120) Kurdak SS, Namba Y, Fu Z, et al. Effect of increased duration of high perfusion pressure on stress failure of pulmonary capillaries. *Microvasc Res* 1995; 50: 235–248.

- 121) Tsukimoto K, Mathieu-Costello O, Prediletto R, et al. Ultrastructural appearances of pulmonary capillaries at high transmural pressures. *J Appl Physiol* 1991; 71: 573–582.
- 122) Negrini D, Passi A, de Luca G, Miserocchi G. Pulmonary interstitial pressure and proteoglycans during development of pulmonary edema. *Am J Physiol*. 1996;270(6 pt 2):H2000–H2007.
- 123) Palestini P, Calvi C, Conforti E, Botto L, Fenoglio C, Miserocchi G. Composition, biophysical properties, and morphometry of plasma membranes in pulmonary interstitial edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L1382–L1390.
- 124) Delgado JF, Conde E, Sánchez V, López-Ríos F, Gómez-Sánchez MA, Escribano P, Sotelo T, Gómez de la Cámara A, Cortina J, de la Calzada CS. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension due to chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:1011–1016.
- 125) Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2004;109:159–165.
- 126) Cooper CJ, Jevnikar FW, Walsh T, Dickinson J, Mouhaffel A, Selwyn AP. The influence of basal nitric oxide activity on pulmonary vascular resistance in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1998;82:609–614.
- 127) Ooi H, Colucci WS, Givertz MM. Endothelin mediates increased pulmonary vascular tone in patients with heart failure: demonstration by direct intrapulmonary infusion of sitaxsentan. *Circulation*. 2002;106:1618–1621
- 128) Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, et al. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85: 504–509.
- 129) Rodeheffer RJ, Lerman A, Heublein DM, et al. Increased plasma concentrations of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin Proc* 1992; 67: 719–724.
- 130) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732–1739.

- 131) Olson TP, Snyder EM, Frantz RP, Turner ST, Johnson BD. Repeat length polymorphism of the serotonin transporter gene influences pulmonary artery pressure in heart failure. *Am Heart J.* 2007;153:426–432.
- 132) Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.* 1987 Mar;18(3):234-9
- 133) Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3527-61.
- 134) Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med.* 2003 Apr;31(4 Suppl):S221-30.
- 135) Stevens T, Rosenberg R, Aird W, et al. NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Nov;281(5):C1422-33.
- 136) Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(5):463-78. Review.
- 137) Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood.* 2008 Jun 1;111(11):5271-81
- 138) Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol.* 1998 Nov 19;82(10A):3S-4S.
- 139) Verdejo París J. Endothelial function. *Arch Cardiol Mex.* 2006 Apr-Jun;76 Suppl 2:S164-9
- 140) Chordá C, Páramo JA. The vascular endothelium: physiopathology and participation in thrombogenesis. *Sangre (Barc).* 1995 Dec;40(6):491-8.
- 141) Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):27-9
- 142) Souvignet C, Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Bessard G. Are isoprostanes a clinical marker for antioxidant drug investigation? *Fundam Clin Pharmacol.* 2000 Jan-Feb;14(1):1-10
- 143) Inouye M, Mio T, Sumino K. Dicarboxylic acids as markers of fatty acid peroxidation in diabetes. *Atherosclerosis.* 2000 Jan;148(1):197-202.

- 144) Borcea V, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, et al. Alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med*. 1999
- 145) Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol*. 1997 Nov;20(11 Suppl 2):II-11-
- 146) McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):539-45
- 147) Rojas A, Figueroa H, Re L, Morales MA. Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects. *Arch Med Res*. 2006 May;37(4):436-48.
- 148) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002 Apr 9;105(14):1656-62.
- 149) Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 26;105(12):1429-35.
- 150) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87:315– 424.
- 151) Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:662– 680.
- 152) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994 Feb 1;120(3):227-37
- 153) Anggård E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 1994 May 14;343(8907):1199-206
- 154) Macleod CL, Kakuda DK. Regulation of CAT: cationic amino acid transporter gene expression. *Amino Acids*. 1996;11:171–191.

- 155) Greene B, Pacitti AJ, Souba WW. Characterization of L-arginine transport by pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* 1993;264:L351–L356.
- 156) Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 (Pt 2):249-58.
- 157) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615
- 158) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
- 159) Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J.* 1997 Mar;10(3):699-707
- 160) Stühlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab.* 2005 Feb;6(1):3-14
- 161) Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13527-32.
- 162) Murad F. Shattuck Lecture: nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* 2006;355:2003–2011.
- 163) Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci.* 2009;14:1–18.
- 164) Hobbs AJ, Stasch JP. Soluble guanylate cyclase: allosteric activation and redox regulation. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology.* 2nd ed. New York, NY: Academic Press; 2010:301–326.
- 165) Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5: 755–768.
- 166) Stasch JP, Hobbs AJ. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;277–308.

- 167) Schmidt HHHW, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and heme-independent sGC activators. In: Hofmann F, ed. cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 2009:309–339.
- 168) Martin F, Baskaran P, Ma X, Dunten PW, Schaefer M, Stasch JP, Beuve A, van den Akker F. Structure of cinaciguat (BAY 58–2667) bound to nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem*. 2010;285:22651–22657.
- 169) Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, et al. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; 238:249.
- 170) Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2004;61:227-237.
- 171) Remuzzi G, Benigni A. Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *Lancet* 1993;342:589-593.
- 172) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2864-2867.
- 173) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.
- 174) Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-363.
- 175) Fukunaga M, Fujiwara Y, Ochi S, et al. Stimulatory effect of thrombin on endothelin-1 production in isolated glomeruli and cultured mesangial cells of rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17 Suppl 7:411-413.
- 176) Morawietz H, Talanow R, Szibor M, et al. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 2000;525 Pt 3:761-770.
- 177) Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102:2434.

- 178) Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998; 97:752.
- 179) Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, et al. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:666-673.
- 180) Jozsef L, Khreiss T, Fournier A, Chan JS, Filep JG. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol* 2002;135:1167-1174.
- 181) Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988;255(4 Pt 2): 970-973.
- 182) Ergul A. Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists as potential cardiovascular therapeutic agents. *Pharmacotherapy* 2002;221:54-65.
- 183) Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* 2001;2;90-101.
- 184) Brevetti G, Martone VD, de Cristofaro T, Corrado S, Silvestro A, Di Donato AM, Bucur R, Scopacasa F. High levels of adhesion molecules are associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost.* 2001 Jan;85(1):63-6.
- 185) Aird WC. Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Crit Care Med.* 2002;30:S180–S185.
- 186) Cool CD, Stewart JS, Werahera P, et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers: evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol.* 1999;155: 411–419.
- 187) Tudor RM, Chacon M, Alger L, et al. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol.* 2001;195:367–374.

- 188) Tudor RM, Cool CD, Yeager M, et al. The pathobiology of pulmonary hypertension: endothelium. *Clin Chest Med.* 2001;22:405–418.
- 189) Bull TM, Golpon H, Hebbel RP, et al. Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost.* 2003;90:698–703.
- 190) Tozzi CA, Poiani GJ, Harangozo AM, et al. Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium. *J Clin Invest.* 1989;84:1005–1012.
- 191) Rabinovitch M. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am J Physiol.* 1999;277:L5–L12. 10.
- 192) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension.* 2001;37:322–327.
- 193) Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest.* 1999;103:291–299
- 194) Chin-Dusting JPF, Kaye DM. Restoration of nitric oxide function in human hyperlipidaemia, congestive heart failure and liver cirrhosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:645– 652.
- 195) Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1995;333:214–221.
- 196) Mason NA, Springall DR, Burke M, et al. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *J Pathol.* 1998;185:313–318.
- 197) Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ, Chin-Dusting JP. In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. *Circulation.* 2000 Nov 28;102(22):2707-12.
- 198) Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, et al. L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J ClinInvest.* 1992;90:1248 –1253.

- 199) Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, et al. L-Arginine availability determines the duration of acetylcholine- induced systemic vasodilation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:710–717.
- 200) Eddahibi S, Adnot S, Carville C, et al. L-Arginine restores endothelium dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol.* 1992;263:L194–L200.
- 201) Tiefenbacher CP, Bleeke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kübler W. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation.* 2000 Oct 31;102(18):2172-9.
- 202) Gladwin MT. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116:2330–2332.
- 203) Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* 2006;116:2552–2561.
- 204) Thoonen R, Buys E, Sips P, Nimmegeers S, Van den Hemel M, Hochepeid T, Van de Voorde J, Brouckaert P. Targeting the NO-cGMP pathway: phenotyping of NO-insensitive sGCbeta1 H105F knockin mice. *BMC Pharmacol.* 2007;7:P60.
- 205) Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999 Jun 22;99(24):3092-5.
- 206) Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1925–1932.
- 207) Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1992;327:70–75.

- 208) Li H, Chen SJ, Chen YF, et al. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol*. 1994;77:1451–1459.
- 209) Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1999;276:L304–L310.
- 210) Bauer M, Wilkens H, Langer F, et al. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation*. 2002;105:1034–1036.
- 211) Katugampola SD, Davenport AP. Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT(1) receptor antagonist losartan. *Br J Pharmacol*. 2001;134:1385–1392.
- 212) Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, et al. Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension: effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1493–1499.
- 213) Le Cras TD, Markham NE, Tuder RM, et al. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:L555–L562.
- 214) Tuder RM, Groves B, Badesch DB, et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 1994;144:275–285.
- 215) Fartoukh M, Emilie D, Le Gall C, et al. Chemokine macrophage inflammatory protein-1_α mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 1998;114:50S–51S.
- 216) Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1628–1631.
- 217) Voelkel NF, Tuder RM, Wade K, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J Clin Invest*. 1996;97: 2491–2498.

- 218) Farber HW, Loscalzo J. Prothrombotic mechanisms in primary pulmonary hypertension. *J Lab Clin Med.* 1999;134:561–566.
- 219) Sakamaki F. [Coagulation and fibrinolytic abnormality related to endothelial injury in pulmonary arterial hypertension]. *Nippon Rinsho.* 2001;59:1053–1058.
- 220) Lopes AA, Maeda NY, Goncalves RC, et al. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J.* 2000;139:618–623
- 221) Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest.* 1998 Apr 1;101(7):1530-7.
- 222) Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000 Nov;43(11):1435-8.
- 223) Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001 Mar 6;103(9):1282-8.
- 224) Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):817-26.
- 225) Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl.* 2003 Dec;4(4):41-51
- 226) Hassoun PM, Yu FS, Shedd AL, et al. Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension. *Am J Physiol.* 1994;266:L163–L171.
- 227) Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, et al. Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia: role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:299–305.

- 228) Sun R, Wang A, Yan Y, et al. The role of activated neutrophils and free radical in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Chin Med Sci J.* 1993;8:15–19.
- 229) Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, et al. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol.* 2001;90:1299–1306.
- 230) Grünig E, Barner A, Bell M, Claussen M, et al. Non-invasive diagnosis of pulmonary hypertension: ESC/ERS Guidelines with Updated Commentary of the Cologne Consensus Conference 2011. *Int J Cardiol.* 2011 Dec;154 Suppl 1:S3-12.
- 231) Morice AH, Pepke-Zaba J, Brown MJ, Thomas PS, Higenbottam TW. Atrial natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1990 Sep;3(8):910-3.
- 232) Wiedemann R, Ghofrani HA, Weissmann N, Schermuly R, Quanz K, Grimminger F, Seeger W, Olschewski H. Atrial natriuretic peptide in severe primary and nonprimary pulmonary hypertension: response to iloprost inhalation. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Oct;38(4):1130-6.
- 233) Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 2000 Aug 22;102(8):865-70.
- 234) Sztrymf B, Souza R, Bertoletti L, Jaïs X, Sitbon O, Price LC, Simonneau G, Humbert M. Prognostic factors of acute heart failure in patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2010 Jun;35(6):1286-93.
- 235) Giannakoulas G, Dimopoulos K, Bolger AP, et al. Usefulness of natriuretic Peptide levels to predict mortality in adults with congenital heart disease. *Am J Cardiol.* 2010 Mar 15;105(6):869-73.
- 236) Nagaya N, Ando M, Oya H, Ohkita Y, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N. Plasma brain natriuretic peptide as a noninvasive marker for efficacy of pulmonary thromboendarterectomy. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jul;74(1):180-4;
- 237) Kucher N, Printzen G, Doernhoefer T, Windecker S, Meier B, Hess OM. Low pro-brain natriuretic peptide levels predict benign clinical outcome in acute pulmonary embolism. *Circulation.* 2003 Apr 1;107(12):1576-8

- 238) Leuchte HH, Neurohr C, Baumgartner R, Holzapfel M, Giehl W, Vogeser M, Behr J. Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Aug 15;170(4):360-5
- 239) Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, et al. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*. 2008 Jun 10;117(23):3010-9
- 240) Leuchte HH, El Nounou M, Tuerpe JC, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest*. 2007 ;131 (2): 402 - 409 .
- 241) Mauritz G-J, Rizopoulos D, Groepenhoff H, et al. Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension . *Am J Cardiol* . 2011; 108(11): 1645- 1650.
- 242) McLaughlin VV, Benza RL, Rubin LJ, et al . Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. *J Am Coll Cardiol* . 2010 ; 55 (18): 1915 - 1922 .
- 243) Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, et al. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension . *Circulation*. 2003; 108 (7): 844 - 848.
- 244) Filusch A, Giannitsis E, Katus HA, Meyer FJ. High-sensitive troponin T: a novel biomarker for prognosis and disease severity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2010 ; 119 (5): 207 - 213 .
- 245) Bassingthwaite JB, Noodleman L, van der Vusse G, Glatz JF. Modeling of palmitate transport in the heart. *Mol Cell Biochem*. 1989 Jun 27-Jul 24;88(1-2):51-8.
- 246) Kaczyńska A, Pelsers MM, Bochowicz A, Kostrubiec M, Glatz JF, Pruszczyk P. Plasma heart-type fatty acid binding protein is superior to troponin and myoglobin for rapid risk stratification in acute pulmonary embolism. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):117-23

- 247) Puls M, Dellas C, Lankeit M, et al. Heart-type fatty acid-binding protein permits early risk stratification of pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2007 Jan;28(2):224-9
- 248) Lankeit M, Dellas C, Panzenböck A, et al. Heart-type fatty acid-binding protein for risk assessment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2008 May;31(5):1024-9.
- 249) Niizeki T, Takeishi Y, Arimoto T, et al. Persistently increased serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure. *Circ J*. 2008 Jan;72(1):109-14.
- 250) Cabiati M, Caselli C, Caruso R, et al. High peripheral levels of h-FABP are associated with poor prognosis in end-stage heart failure patients with mechanical circulatory support. *Biomark Med*. 2013 Jun;7(3):481-92
- 251) Hayabuchi Y, Inoue M, Watanabe N, Sakata M, Ohnishi T, Kagami S. Serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein in children and adolescents with congenital heart disease. *Circ J*. 2011;75(8):1992-7.
- 252) Matsui K, Takano Y, Yu ZX, Hi JE, Stetler-Stevenson WG, Travis WD, Ferrans VJ. Immunohistochemical study of endothelin-1 and matrix metalloproteinases in plexogenic pulmonary arteriopathy. *Pathol Res Pract*. 2002;198(6):403-12.
- 253) Shah R. Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med*. 2007 Jul;18(4):272-82.
- 254) Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2001 Nov;120(5):1562-9.
- 255) Staniloae C, Dupuis J, White M, et al. Reduced pulmonary clearance of endothelin in congestive heart failure: a marker of secondary pulmonary hypertension. *J Card Fail*. 2004 Oct;10(5):427-32.
- 256) Taylor BJ, Mojica CR, Olson TP, Woods PR, Frantz RP, Johnson BD. A possible role for systemic hypoxia in the reactive component of pulmonary hypertension in heart failure. *J Card Fail*. 2013 Jan;19(1):50-9.

- 257) Montani D, Souza R, Binkert C, Fischli W, Simonneau G, Clozel M, Humbert M. Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2007 Jan;131(1):101-8.
- 258) Kuc RE, Carlebur M, Maguire JJ, Yang P, Long L, Toshner M, Morrell NW, Davenport AP. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. *Life Sci*. 2014 Feb 26. pii: S0024-3205(14)00262-8.
- 259) Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res*. 2006 Apr 28;98(8):1014-23.
- 260) Fiedler U, Krissl T, Koidl S, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem*. 2003 Jan 17;278(3):1721-7.
- 261) Kümpers P, Nickel N, Lukasz A, et al. Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2010 Sep;31(18):2291-300
- 262) Heresi GA, Aytekin M, Newman J, DiDonato J, Dweik RA. Plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol and outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182 (5): 661-668.
- 263) Pugh ME, Robbins IM, Rice TW, West J, Newman JH, Hemnes AR. Unrecognized glucose intolerance is common in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30 (8): 904-911.
- 264) Kakishita M, Nishikimi T, Okano Y, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1999; 96 (1): 33-39.
- 265) Yndestad A, Larsen K-O, Oie E, et al . Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. *J Appl Physiol*. 2009 ; 106 (4): 1356 - 1364.
- 266) Alastalo T-P, Li M, Perez V de J, et al. Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest*. 2011; 121 (9): 3735 - 3746.

- 267) Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 Apr;37(4):489-92.
- 268) Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, et al. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (7): 1414 - 1418.
- 269) Skoro-Sajer N, Mittermayer F, Panzenboeck A, et al. Asymmetric dimethylarginine is increased in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176 (11): 1154 - 1160 .
- 270) Sanli C, Oguz D, Olgunturk R, Tunaoglu FS, Kula S, Pasaoglu H, Gulbahar O, Cevik A. Elevated homocysteine and asymmetric dimethyl arginine levels in pulmonary hypertension associated with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 2012 Dec;33(8):1323-31
- 271) Shao Z, Wang Z, Shrestha K, Thakur A, et al. Pulmonary hypertension associated with advanced systolic heart failure: dysregulated arginine metabolism and importance of compensatory dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Mar 27;59(13):1150-8
- 272) Amabile N, Heiss C, Real WM, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177 (11): 1268 - 1275.
- 273) Diehl P, Aleker M, Helbing T, et al. Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis*. 2011; 31 (2): 173 - 179.
- 274) Amabile N, Heiss C, Chang V, et al. Increased CD62e (1) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant*. 2009; 28 (10): 1081 - 1086
- 275) Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, et al. Comparison of endothelial biomarkers according to reversibility of pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 2010; 31 (5): 657 - 662.

- 276) Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, et al. Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation*. 2009 ; 119 (3): 374 - 381
- 277) Martínez-Sales V, Sánchez-Lázaro I, Vila V, Almenar L, Contreras T, Reganon E. Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Dis Markers*. 2011;31(2):75-82.
- 278) Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, Sato N, Oya H, Nakanishi N. Increase in thrombomodulin concentrations after pulmonary thromboendarterectomy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 2003; 124 (4): 1305 - 311 .
- 279) Bonderman D, Turecek PL, Jakowitsch J, et al. High prevalence of elevated clotting factor VIII in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost*. 2003; 90 (3): 372 - 376.
- 280) Kawut SM, Horn EM, Berekashvili KK, Widlitz AC, Rosenzweig EB, Barst RJ. Von Willebrand factor independently predicts long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2005 Oct;128(4):2355-62.
- 281) Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, Wolf M, Sitbon O, Simonneau G, Girma JP, Meyer D. Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2000 Nov 14;102(20):2460-2.
- 282) Vila V, Martínez-Sales V, Almenar L, Lázaro IS, Villa P, Reganon E. Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2008 Nov 12;130(2):276-7.
- 283) Labarrere CA, Zaloga GP. C-reactive protein: from innocent bystander to pivotal mediator of atherosclerosis. *Am J Med*. 2004 Oct 1;117(7):499-507
- 284) Quarck R, Nawrot T , Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53(14): 1211- 1218.
- 285) Sánchez-Lázaro IJ, Almenar L, Reganon E, et al. Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class. *Int J Cardiol*. 2008 Oct 13;129(3):388-93.

- 286) Damås JK, Otterdal K, Yndestad A, et al. Soluble CD40 ligand in pulmonary arterial hypertension: possible pathogenic role of the interaction between platelets and endothelial cells . *Circulation* . 2004 ; 110 (8): 999 - 1005 .
- 287) Cella G, Vianello F, Cozzi F, et al. Effect of bosentan on plasma markers of endothelial cell activity in patients with secondary pulmonary hypertension related to connective tissue diseases. *J Rheumatol*. 2009; 36 (4): 760 - 767 .
- 288) Soon E, Holmes AM, Treacy CM, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010; 122 (9): 920 - 927.
- 289) Selimovic N, Bergh C-H, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B . Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009 ; 34 (3): 662 - 668 .
- 290) Dolenc J, Sebeštjen M, Vrtovec B, Koželj M, Haddad F. Pulmonary hypertension in patients with advanced heart failure is associated with increased levels of interleukin-6. *Biomarkers*. 2014 Aug;19(5):385-90.
- 291) Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, et al. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Aug;297(2):L238-50.
- 292) Lorenzen JM, Nickel N, Krämer R, et al. Osteopontin in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Chest*. 2011;139 (5): 1010 - 1017 .
- 293) Nickel N, Jonigk D, Kempf T, et al . GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Respir Res*. 2011 ; 12 : 62 .
- 294) Nickel N, Kempf T, Tapken H, et al. Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178 (5): 534 - 541 .
- 295) Schumann C, Lepper PM, Frank H, et al. Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension. *Biomarkers*. 2010; 15 (6): 523 - 532.

- 296) Hoepfer MM, Hohlfeld JM, Fabel H. Hyperuricaemia in patients with right or left heart failure. *Eur Respir J.* 1999; 13 (3): 682 - 685 .
- 297) Voelkel MA, Wynne KM, Badesch DB, Groves BM, Voelkel NF. Hyperuricemia in severe pulmonary hypertension. *Chest* 2000; 117 (1): 19 – 24.
- 298) Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, et al. Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(2): 487 - 492.
- 299) Cracowski J-L, Degano B, Chabot F, et al. Independent association of urinary F2-isoprostanes with survival in pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2012; 142 (4): 869 - 876 .
- 300) Zhang R, Sun ML, Fan YF, et al. Plasma 15-F2t-isoprostane in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol.* 2014 Aug 1;175(2):268-73
- 301) Polidori MC, Praticó D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail.* 2004 Aug;10(4):334-8.
- 302) Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Takano H, Katsuki T, Ikeda U, Shimada K. Increased urinary 15-F2t-isoprostane concentrations in patients with non-ischaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. *Heart.* 2003 Aug;89(8):871-4.
- 303) Marrugat J, Vila J, Pavesi M, Sanz F. Estimación del tamaño de la muestra en la investigación clínica y epidemiológica. *Med Clin* 1998; 111:267-76).
- 304) Wu CJ et al.. *Protein Microarray for Disease Analysis.* Humana Press; 2011 edition
- 305) Korf U et al. *Protein Microarrays: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology).* Humana Press; 2011 edition
- 306) Calvert, P. Inkjet Printing for Materials and Devices. *Chemistry of Materials* 13. 2001. (10): 3299–3305
- 307) DNA Microarrays: Techniques. Arabidopsis.info.

- 308) RayBio. L-Series Human Antibody Array 1000 Protocol. RayBiotech Inc.
- 309) Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clin. Chem.* 51 (12): 2415–8.
- 310) Leng S, McElhaney J, Walston J, Xie D, Fedarko N, Kuchel G (October 2008). "Elisa and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research". *J Gerontol a Biol Sci Med Sci* 63 (8): 879–84.
- 311) Ibe T, Wada H, Sakakura K, et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease: The prognostic implications of diastolic pulmonary vascular pressure gradient. *J Cardiol.* 2015 Aug 20.
- 312) Takeda Y, Takeda Y, Tomimoto S, et al. Bilirubin as a prognostic marker in patients with pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med.* 2010 Apr 22;10:2222.
- 313) Alastalo T-P, Li M, Perez V de J, et al. Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest.* 2011; 121 (9): 3735 - 3746.
- 314) Kim J. Apelin-APJ signaling: a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Mol Cells.* 2014 Mar;37(3):196-201.
- 315) Xia Y, Yang XR, Fu Z, et al. Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Hypertension.* 2014 Jan;63(1):173-80. doi:
- 316) Ding Y, Winters A, Ding M, et al. Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *J Biol Chem.* 2011 Sep 9;286(36):31799-809. doi:
- 317) Kunichika N, Landsberg JW, Yu Y, et al. Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Nov 15;170(10):1101-7.
- 318) Villalta PC, Townsley MI. Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. *r Pulm Circ.* 2013 Dec;3(4):802-15.
- 319) Yoshida T, Hayashi M. Role of Krüppel-like factor 4 and its binding proteins in vascular disease. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(5):402-13.

- 320) Shatat MA, Tian H, Zhang R, et al. Endothelial Krüppel-like factor 4 modulates pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Mar;50(3):647-53
- 321) Anjum F, Lazar J, Soh et al. Dysregulation of ubiquitin-proteasome pathway and apolipoprotein metabolism in sickle cell disease-related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 2013 Dec;3(4):851-5.
- 322) Wang YY, Luan Y, Zhang X, et al. Proteasome inhibitor PS-341 attenuates flow-induced pulmonary arterial hypertension. *Clin Exp Med.* 2014 Aug;14(3):321-9
- 323) Le Jan S, Amy C, Cazes A, et al. Angiotensin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1521-8.
- 324) Zhou L1, Wang LM, Song HM, et al. Expression profiling analysis of hypoxic pulmonary disease. *Genet Mol Res.* 2013 Oct 7;12(4):4162-70.
- 325) Baldoli E, Castiglioni S, Maier JA. Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function. *PLoS One.* 2013;8(3)
- 326) Zeng Z, Inoue K, Sun H, et al. TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014
- 327) Williams H, Johnson JL, Jackson CL, et al. MMP-7 mediates cleavage of N-cadherin and promotes smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2010 Jul 1;87(1):137-46
- 328) Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* 2006 Feb;27(1):47-72.
- 329) Moffatt P, Thomas G, Sellin K, et al. Osteocrin is a specific ligand of the natriuretic Peptide clearance receptor that modulates bone growth. *J Biol Chem.* 2007 Dec 14;282(50):36454-62. Epub 2007 Oct 19.
- 330) Liu A, Gao X, Zhang Q, Cui L. Cathepsin B inhibition attenuates cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction by inhibiting the NLRP3 pathway. *Mol Med Rep.* 2013 Aug;8(2):361-6

- 331) Zhang L, Fu XH, Yu Y, Shui RH, Li C, Zeng HY, Qiao YL, Ni LY, Wang Q. m) Treatment with CA-074Me, a Cathepsin B inhibitor, reduces lung interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of polymyositis. *Lab Invest.* 2015 Jan;95(1):65-77.
- 332) Lillpopp L, Tzikas S, Ojeda F, Zeller T, Baldus S, Bickel C, Sinning CR, Wild PS, Genth-Zotz S, Warnholtz A, Lackner KJ, Münzel T, Blankenberg S, Keller T. Prognostic information of glycogen phosphorylase isoenzyme BB in patients with suspected acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2012 Nov 1;110(9):1225-30.
- 333) Schroen B, Heymans S, Sharma U, et al. Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy". *Circ Res* 2004 Apr: 95 (5): 515–22.
- 334) Schroen B, Leenders JJ, van Erk A, et al. Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J Exp Med* 2007 May: 204 (5): 1227–3
- 335) West EE, Kashyap M1, Leonard WJ. TSLP: A Key Regulator of Asthma Pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2012 Dec 1;9(3-4)
- 336) Knight D. Leukaemia inhibitory factor (LIF): a cytokine of emerging importance in chronic airway inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14(3):169-76.
- 337) Hennigs JK, Baumann HJ, Lüneburg N, et al. Fibrinogen plasma concentration is an independent marker of haemodynamic impairment in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Sci Rep.* 2014 Apr 28;4:4808.
- 338) Yano T, Sogawa K, Umemura H, et al. Serum level of fibrinogen A α chain fragment increases in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J.* 2011;75(11):2675-82
- 339) Shitrit D, Bendayan D, Bar-Gil-Shitrit A, et al. Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest.* 2002 Nov;122(5):1674-8.

- 340) Kiatchosakun S, Ungkasekvina W, Wonvipaporn C, et al. D-dimer and pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *J Med Assoc Thai*. 2007 Oct;90(10):2024-9.
- 341) Case D, Irwin D, Ivester C, et al. Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jan;292(1):L154-64.
- 342) Goetze JP, Alehagen U, Flyvbjerg A, Rehfeld JF. Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease. *Biomark Med*. 2014;8(1):133-40.
- 343) Corti A, Ferrero E. Chromogranin A and the endothelial barrier function. *Curr Med Chem*. 2012;19(24):4051-8
- 344) Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, et al. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med*. 2014 Nov;20(11):1289-300
- 345) Piao L, Sidhu VK, Fang YH, et al. FOXO1-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) decreases glucose oxidation and impairs right ventricular function in pulmonary hypertension: therapeutic benefits of dichloroacetate. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Mar;91(3):333-46.
- 346) Frolova EG, Sopko N, Blech L, et al. Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *FASEB J*. 2012 Jun;26(6):2363-73.
- 347) Lankeit M, Dellas C, Panzenböck A, et al. Heart-type fatty acid-binding protein for risk assessment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2008 May;31(5):1024-9.
- 348) Cabiati M, Caselli C, Caruso R, et al. High peripheral levels of h-FABP are associated with poor prognosis in end-stage heart failure patients with mechanical circulatory support. *Biomark Med*. 2013 Jun;7(3):481-92
- 349) Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):171-80.
- 350) Sun Z. Platelet TLR4: a critical link in pulmonary arterial hypertension *Circ Res*. 2014 May 9;114(10):1551-3.

- 351) Chida A, Shintani M, Nakayama T, et al. Missense mutations of the BMPR1B (ALK6) gene in childhood idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2012;76(6):1501-8.
- 352) Vanderpool RR, El-Bizri N, Rabinovitch M, Chesler NC. Patchy deletion of Bmpr1a potentiates proximal pulmonary artery remodeling in mice exposed to chronic hypoxia. *Biomech Model Mechanobiol.* 2013 Jan;12(1):33-42.
- 353) Do e Z, Fukumoto Y, Takaki A, et al. Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2009 Sep;73(9):1731-9
- 354) Shimizu T, Fukumoto Y, Tanaka S, et al. Crucial role of ROCK2 in vascular smooth muscle cells for hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Dec;33(12):2780-91.
- 355) Ogura S, Shimosawa T, Mu S, et al. Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing the oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Jul 15;305(2):H155-62
- 356) Agarwal SK, Gourh P, Shete S, et al. Association of interleukin 23 receptor polymorphisms with anti-topoisomerase-I positivity and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009 Dec;36(12):2715-23
- 357) Voelkel NF, Gomez-Arroyo J. The role of vascular endothelial growth factor in pulmonary arterial hypertension. The angiogenesis paradox. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Oct;51(4):474-84.
- 358) Star GP, Giovinazzo M, Lamoureux E, Langleben D. Effects of vascular endothelial growth factor on endothelin-1 production by human lung microvascular endothelial cells in vitro. *Life Sci.* 2014 Nov 24;118(2):191-4.
- 359) Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L, et al. New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulm Circ.* 2012 Oct;2(4):434-42.
- 360) Voelkel NF, Cool C, Taraceviciene-Stewart L, et al. Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S251-6.

- 361) Ray L, Mathieu M, Jespers P, et al. Early increase in pulmonary vascular reactivity with overexpression of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in canine experimental heart failure. *Exp Physiol*. 2008 Mar;93(3):434-42.
- 362) El-Melegy NT, Mohamed NA. Angiogenic biomarkers in children with congenital heart disease: possible implications. *Ital J Pediatr*. 2010 Apr 20;36:32. doi: 10.1186/1824-7288-36-32.
- 363) Malhotra R, Paskin-Flerlage S, Zamanian RT, et al. Circulating angiogenic modulatory factors predict survival and functional class in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2013 Apr;3(2):369-80
- 364) Seyfarth HJ, Sack U, Gessner C, Wirtz H. Angiogenin, bFGF and VEGF: angiogenic markers in breath condensate of patients with pulmonary hypertension. *Pneumologie*. 2015 Apr;69(4):207-11
- 365) Sanders-van Wijk S, Maeder MT, Nietlispach F, et al; TIME-CHF Investigators. Long-term results of intensified, N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide-guided versus symptom-guided treatment in elderly patients with heart failure: five-year follow-up from TIME-CHF. *Circ Heart Fail*. 2014 Jan;7(1):131-9
- 366) Gandhi PU, Szymonifka J, Motiwala SR, et al. Characterization and prediction of adverse events from intensive chronic heart failure management and effect on quality of life: results from the pro-B-type natriuretic peptide outpatient-tailored chronic heart failure therapy (PROTECT) study. *J Card Fail*. 2015 Jan;21(1):9-15
- 367) Groenning BA, Raymond I, Hildebrandt PR, et al. Diagnostic and prognostic evaluation of left ventricular systolic heart failure by plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations in a large sample of the general population. *Heart*. 2004 Mar;90(3):297-303.
- 368) Kang SH, Park JJ, Choi DJ, et al. Prognostic value of NT-proBNP in heart failure with preserved versus reduced EF. *Heart*. 2015 Aug 28.
- 369) Røsjø H1, Masson S, Latini R, et al. Prognostic value of chromogranin A in chronic heart failure: data from the GISSI-Heart Failure trial. *Eur J Heart Fail*. 2010 Jun;12(6):549-56.

- 370) Seljeflot I1, Nilsson BB, Westheim AS, Bratseth V, Arnesen H. The L-arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is strongly related to the severity of chronic heart failure. No effects of exercise training. *J Card Fail.* 2011 Feb;17(2):135-42. doi: 10.1016/j.cardfail.2010.09.003. Epub 2010 Oct 28.
- 371) Ge J, Zhao G, Chen R, et al. Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2006 May;8(3):284-9.
- 372) Douvaras P, Antonatos DG, Kekou K, et al. Association of VEGF gene polymorphisms with the development of heart failure in patients after myocardial infarction. *Cardiology.* 2009;114(1):11-8
- 373) Chin BS1, Chung NA, Gibbs CR, et al. Vascular endothelial growth factor and soluble P-selectin in acute and chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 2002 Dec 1;90(11):1258-60.
- 374) Arakawa H, Ikeda U, Hojo Y, et al. Decreased serum vascular endothelial growth factor concentrations in patients with congestive heart failure. *Heart.* 2003 Feb;89(2):207-8.
- 375) Zolk O, Quattek J, Sitzler G, et al. Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation.* 1999 Apr 27;99(16):2118-23.
- 376) Goldberg IJ, Trent C, Schulze C. Lipid Metabolism and Toxicity in the Heart Cell *Metab.* 2012 June 6; 15(6): 805–812.
- 377) Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, et al. Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2003 Nov;33(11):941-8.
- 378) Zairis MN, Patsourakos NG, Tsiaousis GZ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and mortality in patients with acute decompensation of chronic heart failure. *Heart.* 2012 Jun;98(11):860-4.
- 379) Yazici M, Demircan S, Durna K, Sahin M. The relation between endothelin-1 levels and myocardial injury in chronic ischemic heart failure. *Heart Vessels.* 2005 May;20(3):95-9.

- 380) Røsjø H, Stridsberg M, Florholmen G, et al. Secretogranin II; a protein increased in the myocardium and circulation in heart failure with cardioprotective properties. *PLoS One*. 2012;7(5):e37401.
- 381) Angelone T, Mazza R, Cerra MC. Chromogranin-A: a multifaceted cardiovascular role in health and disease. *Curr Med Chem*. 2012;19(24):4042-50.
- 382) Alehagen U, Dahlström U, Lindahl TL. Elevated D-dimer level is an independent risk factor for cardiovascular death in out-patients with symptoms compatible with heart failure. *Thromb Haemost*. 2004 Dec;92(6):1250-8.
- 383) Zorlu A, Yilmaz MB, Yucel H, et al. Increased d-dimer levels predict cardiovascular mortality in patients with systolic heart failure. *J Thromb Thrombolysis*. 2012 May;33(4):322-8
- 384) Zorlu A, Akkaya E, Altay H, et al. The relationship between D-dimer level and the development of atrial fibrillation in patients with systolic heart failure. *J Thromb Thrombolysis*. 2012 May;33(4):343-8
- 385) Hsu CP, Lin SJ, Chung MY, Lu TM. Asymmetric dimethylarginine predicts clinical outcomes in ischemic chronic heart failure. *Atherosclerosis*. 2012 Dec;225(2):504-10.
- 386) Spence PA, Baylis CE, Peniston CM, Salerno TA. Right ventricular failure associated with left ventricular failure. *Cardiovasc Clin*. 1987;17(2):239-49.
- 387) Jiang R, Wang L, Zhu CT, et al. Comparative effectiveness of sildenafil for pulmonary hypertension due to left heart disease with HFrEF. *Hypertens Res*. 2015 Jul 23
- 388) Hoendermis ES, Liu LC, Hummel YM, et al. Effects of sildenafil on invasive haemodynamics and exercise capacity in heart failure patients with preserved ejection fraction and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. *Eur Heart J*. 2015 Jul 17.
- 389) Bonderman D, Pretsch I, Steringer-Mascherbauer R, et al. Acute hemodynamic effects of riociguat in patients with pulmonary hypertension associated with diastolic heart failure (DILATE-1): a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-dose study. *Chest*. 2014 Nov;146(5):1274-85.

- 390) Tampakakis E, Leary PJ, Selby VN, De Marco T, et al. The diastolic pulmonary gradient does not predict survival in patients with pulmonary hypertension due to left heart disease. *JACC Heart Fail.* 2015 Jan;3(1):9-16.

2015
Tesis Doctoral
Josep Lluís Melero Ferrer