



# **Universidad de Navarra**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**FIBROSIS MIOCÁRDICA MALIGNA EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA CON  
FRACCIÓN DE EYECCIÓN PRESERVADA DE ORIGEN HIPERTENSIVO.  
INFLUENCIA DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.**

**ROCÍO EIROS BACHILLER**

**DIRECTORES DE LA TESIS:**

**DR. JAVIER DÍEZ MARTÍNEZ**

**DR. JUAN JOSÉ GAVIRA GÓMEZ**

**PAMPLONA 2020**

FIBROSIS MIOCÁRDICA MALIGNA EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA CON  
FRACCIÓN DE EYECCIÓN PRESERVADA DE ORIGEN HIPERTENSIVO.  
INFLUENCIA DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

Memoria presentada por D<sup>a</sup> Rocío Eiros Bachiller para aspirar al grado de Doctor por la  
Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Área de Enfermedades  
Cardiovasculares en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y autorizo su  
presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 15 de marzo de 2020.



Dr. Javier Díez Martínez

FIBROSIS MIOCÁRDICA MALIGNA EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA CON  
FRACCIÓN DE EYECCIÓN PRESERVADA DE ORIGEN HIPERTENSIVO.  
INFLUENCIA DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

Memoria presentada por D<sup>a</sup> Rocío Eiros Bachiller para aspirar al grado de Doctor por la  
Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Área de Insuficiencia  
Cardiaca en la Clínica Universidad de Navarra y autorizo su presentación ante el  
Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 15 de marzo de 2020.



Dr. Juan José Gavira Gómez

# *Onmia in bonum*

*Beato Álvaro del Portillo*

# **AGRADECIMIENTOS**

A los pacientes, porque “no hay enfermedades si no enfermos”, ellos son el motor de cada día y de cada esfuerzo.

A mi director de Tesis, el Dr. Javier Díez Martínez, que desde el principio apostó con fuerza por este proyecto, y sin su apoyo no hubiera sido posible desarrollarlo, por ofrecerme la oportunidad de trabajar con él y transmitirme su interés y compromiso con la investigación.

A mi subdirector de Tesis, el Dr. Gavira por su inestimable ayuda en cada de una de las etapas de desarrollo del presente proyecto y sus sabios consejos.

A todo el personal del Centro de Investigación Medica Aplicada que ha colaborado en este proyecto, en especial a Susana, Begoña y Arantxa por su paciencia y constancia.

A todo y cada uno de las personas de la Clínica Universidad de Navarra, por su desinteresada y generosa colaboración, es un gran equipo al cual este proyecto debe infinito. Gracias de manera especial a cada uno.

Al Dr. Carlos Ruiz, mi Mentor en la Cardiología, mi Maestro, un regalo. A Esperanza, siempre cuidó de mí, siempre ahí.

A mis amigos, a cada uno, ellos lo saben, por su confianza y apoyo tanto en el ámbito profesional como en el personal.

A mi familia, en especial mi madre y mi padre, ellos han sido los verdaderos artífices de esta tesis, gracias a ellos este proyecto finaliza, gracias a ellos continuó en los momentos complicados y gracias a ellos soy médico. Ojalá algún día pueda ayudar a alguien como ellos me ayudan a mí en todas mis esferas. Quería nombrar en especial a mi abuelo Fernando Bachiller Cabezón, cardiólogo y neumólogo excepcional con el cual disfrutaría muchísimo discutir cada una de estas páginas y que espero compartir en el Cielo nuestra pasión por la Cardiología. En muchos momentos “le encomendé” esta tesis, es mi primer mentor.

Por último, a Álvaro, por su paciencia, comprensión y su exigencia. Por nuestro presente y futuro.

# **INDICE**

## INTRODUCCIÓN

1. Insuficiencia cardiaca.....	16
1.1 Epidemiología .....	16
1.2 Definición.....	17
1.2.1 Terminología relacionada con la fracción de eyección .....	19
1.2.2 Terminología basada en el curso de la enfermedad.....	20
1.3 Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada.....	21
2. Cardiopatía hipertensiva .....	23
2.1 Hipertensión arterial.....	23
2.2 Definición de cardiopatía hipertensiva.....	24
2.3 Alteraciones de los miocardiocitos .....	25
2.4 Alteraciones en el espacio intersticial .....	25
2.5 Alteraciones en la microcirculación coronaria.....	26
3. Fibrosis miocárdica .....	27
3.1 Alteración de los fibroblastos.....	27
3.1.1 Alteración de la red de colágeno .....	27
3.1.2 Síntesis de las moléculas de depósito.....	30
3.1.3 Formación y depósito de las fibras de colágeno.....	32
3.1.4 Degradación de la fibra de colágeno tipo I.....	34
4. Diagnóstico no invasivo de la fibrosis miocárdica.....	36
4.1 Definición de biomarcador.....	36
4.2 Criterios para la utilización clínica de biomarcadores .....	36
4.3 Biomarcadores de fibrosis miocárdica .....	39



4.3.1 Biopsia endomiocárdica .....	40
4.3.2 Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I.....	41
4.3.3 Cociente CITP:MMP1.....	42
4.3.4 Fibrosis miocárdica maligna .....	42
5. Influencia de la enfermedad renal crónica en la insuficiencia cardíaca.....	43
HIPÓTESIS.....	47
OBJETIVOS .....	49
Interes.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS .....	52
1. Diseño del estudio.....	53
1.1 Población del estudio.....	53
2. Estudios clínicos.....	56
2.1 Evaluación clínica general.....	56
2.2 Estudio ecocardiográfico .....	56
2.2.1 Índice de función ventricular sistólica.....	57
2.2.2 Morfología de ventrículo izquierdo.....	58
2.2.3 Índices de función ventricular diastólica.....	58
2.2.4 Volumen de aurícula izquierda.....	62
3. Estudios bioquímicos .....	63
3.1 Obtención y procesado de muestras .....	63
3.2 Determinación de las concentraciones en sangre de los péptidos y moléculas implicadas en el metabolismo del colágeno tipo I.....	63
3.2.1 Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP).....	63

3.2.2 Telopéptido del colágeno tipo I (CITP) .....	63
3.2.3 Metaloproteinasa de matriz tipo I (MMP-1) .....	64
3.2.4 Cociente del telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I y metaloproteinasa de matriz tipo I (CITP: MMP-1) .....	64
3.2.5 NT-proBNP .....	64
3.3 Análisis estadístico.....	65
RESULTADOS.....	67
1. Hallazgos en los pacientes clasificados según la ausencia de IC o la presencia de IC-FE....	68
1.1 Características demográficas .....	68
1.2 Parámetros ecocardiográficos .....	71
1.3 Parámetros analíticos.....	73
1.4 Análisis de asociaciones.....	75
2. Hallazgos en pacientes clasificados según la presencia o ausencia de ERC y subcategorizados según la ausencia de IC o la presencia de IC-FEP .....	80
DISCUSIÓN .....	95
1. Fibrosis miocárdica en pacientes con hipertensión arterial.....	96
1.1 Formación de la fibra del colágeno tipo I.....	96
1.2 Degradación de la molécula de colágeno tipo I.....	97
1.3 Combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica en pacientes con IC-FEP .....	97
1.4 Relevancia clínica.....	99
2. La influencia de la enfermedad renal crónica en la aparición de fibrosis miocárdica en pacientes con hipertensión arterial .....	100
2.1 Factores pro-fibróticos asociados a ERC .....	101
2.1.1 La osteopontina .....	101

3. Perspectivas futuras.....	102
4. Limitaciones.....	103
CONCLUSIONES .....	105
REFERENCIAS .....	108
ANEXO.....	125

## **ABREVIATURAS**

<b>AHA</b>	American Heart Association
<b>ARA II</b>	Antagonista del receptor de la angiotensina II
<b>CITP</b>	Telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I
<b>CH</b>	Cardiopatía hipertensiva
<b>C<sub>1</sub>VF</b>	Fracción de volumen de colágeno tipo 1
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>ESC</b>	European Society of Cardiology
<b>FEVI</b>	Fracción de eyección de VI
<b>FVC</b>	Fracción de volumen de colágeno miocárdico
<b>FVCI</b>	Fracción de volumen de colágeno miocárdico tipo I
<b>FVCIII</b>	Fracción de volumen de colágeno miocárdico tipo III
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HVI</b>	Hipertrofia del ventrículo izquierdo
<b>IC</b>	Insuficiencia cardíaca
<b>IC-FER</b>	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida
<b>IC- FEP</b>	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada
<b>IECA</b>	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas
<b>MVI</b>	Masa ventricular izquierda
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica

<b>PCP</b>	Proteinasa carboxi-terminal del procolágeno
<b>PCPE</b>	PCP “enhancer”
<b>PICP</b>	Propéptido carboxi-terminal
<b>PNP</b>	Endopeptidasa amino-terminal del procolágeno tipo I
<b>PP</b>	Pared posterior
<b>SIV</b>	Septo interventricular
<b>SRAA</b>	Sistema renina angiotensina aldosterona
<b>VD</b>	Ventrículo derecho
<b>VI</b>	Ventrículo izquierdo
<b>VTD</b>	Volumen telediastólico
<b>VTS</b>	Volumen telesistólico
<b>TIMPs</b>	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

# **INTRODUCCION**

# **1. Insuficiencia cardiaca**

## **Epidemiología**

La insuficiencia cardiaca (IC) se ha convertido en los países desarrollados en una de las epidemias cardiovasculares del siglo XXI debido al aumento de su prevalencia y a las múltiples hospitalizaciones que condiciona esta entidad (1,2). Las principales razones que han contribuido a estos hechos son: el envejecimiento paulatino de la población (3), la mayor supervivencia ligada a los avances médicos aplicables a los pacientes con cardiopatía isquémica e hipertensión arterial (HTA) principales causas de IC que contribuyen a su desarrollo y la mejora en los tratamientos de la propia enfermedad (4). Sin embargo, el conocimiento exacto de la evolución de la epidemiología de la misma está limitado por la carencia de buenos criterios diagnósticos (5). En los primeros estudios sólo se utilizaron criterios clínicos relativamente inespecíficos, que subestimaban los casos de disfunción ventricular asintomática y podían incluir sujetos con síntomas debidos a otros procesos patológicos (6). Además, el desconocimiento inicial, la controversia sobre los criterios diagnósticos y la dificultad para el diagnóstico de IC con fracción de eyección (FE) preservada, dejaron esta entidad al margen de la mayoría de los estudios tendentes a descubrir su realidad epidemiológica.

En la actualidad, se estima una prevalencia entre el 1% - 3% de la población adulta en los países desarrollados (7), y que es mayor del 10% entre los mayores de 70 años (8). A nivel nacional, el estudio PRICE (9) realizado entre 2004 y 2005, revelaba una prevalencia global en toda la geografía española en torno al 7% en los pacientes mayores de 45 años, similar en varones y mujeres, y del 16% en mayores de 75 años. Estos datos, comparables con los de la bibliografía internacional (10,11), confirman la tendencia creciente de la prevalencia de la IC en las últimas décadas, lo que conduce a un incremento en la tasa de hospitalizaciones derivada de ella. Según estudios europeos, este incremento se prevé incluso mayor para los próximos años, y se estima para el año 2020 un aumento del 31% para varones y 17% para mujeres respecto del año 2000 (12). En España, se producen alrededor de 80.000 ingresos hospitalarios cada año, y es al igual que en otros países desarrollados, la primera causa de hospitalización en mayores de 65 años, por delante de la enfermedad coronaria y cerebrovascular. Esto supone el 5% de



todas las hospitalizaciones y representa aproximadamente un 2% del gasto sanitario (13). La incidencia aumenta con la edad y alcanza el 1% al año en los mayores de 65 años. Es dos veces más frecuente en los sujetos hipertensos que en los normotensos y cinco veces más frecuente en los pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio (14).

En términos de supervivencia, se estima una mortalidad alrededor del 50% a los 5 años del diagnóstico, y es mayor en los pacientes ancianos, en aquellos que se encuentran en estadios avanzados y en pacientes con importante comorbilidad. La IC se considera la tercera causa de muerte cardiovascular en España, por detrás de cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular (15).

## **Definición**

La IC es un síndrome clínico caracterizado por síntomas típicos y/o signos, reflejados en el cuadro 1, causados por una anomalía cardíaca estructural y/o funcional, lo que conduce a un gasto cardíaco reducido y/o presiones intracardíacas elevadas en reposo o durante el estrés (16). Para el diagnóstico de la IC se utilizan una serie de manifestaciones clínicas, además de la evidencia objetiva del daño estructural o funcional del corazón en reposo (17).

**Cuadro 1.** Síntomas y signos de insuficiencia cardiaca.

<b>Síntomas</b>	<b>Signos</b>
<i>Típicos</i>	<i>Específicos</i>
Disnea Ortopnea Disnea paroxística nocturna Cansancio Edema en extremidades inferiores.	Elevación de la presión yugular Reflejo hepatoyugular positivo Tercer ruido (ritmo de galope) Desplazamiento lateral del impulso apical
<i>Menos típicos</i>	<i>Menos específicos</i>
Tos nocturna Sibilancia Sensación de hinchazón Pérdida del apetito Confusión (especialmente en los ancianos) Depresión Palpitaciones Mareos Síncope Bendopnea	Aumento de peso (> 2 kg / semana) Pérdida de peso (en IC avanzada) Caquexia Soplo cardíaco Edema periférico Crepitantes pulmonares Derrame pleural Taquicardia irregular Taquipnea Respiración de “Cheyne Stokes” Hepatomegalia Ascitis Extremidades frías Oliguria Presión de pulso estrecho

Para cuantificar el grado de limitación funcional que se produce en la IC se suele emplear más comúnmente la clasificación de la “New York Heart Association” (NYHA). Este sistema divide a los pacientes en cuatro clases según el grado de esfuerzo necesario para que aparezcan los síntomas de IC (18) (Tabla 2)

**Tabla 1.** Clasificación de la clase funcional en la IC según la NYHA\*

<b>Clase</b>	<b>Actividad y síntomas</b>
Clase I	Sin limitación a la actividad
Clase II	Ligera limitación a la actividad física. Sin síntomas en reposo
Clase III	Acusada limitación a la actividad física. Sin síntomas en reposo
Clase IV	Incapacidad de realizar actividad física. Síntomas en reposo

\*NYHA: New York Heart Association

### 1.2.1 Terminología relacionada con la fracción de eyección

Históricamente, la principal terminología para definir IC ha estado basada en la medición de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Ésta se define como el volumen sistólico [diferencia entre volumen telediastólico (VTD) y volumen telesistólico (VTS)] dividido por el volumen telediastólico del ventrículo izquierdo, expresado como porcentaje medida generalmente con ecocardiografía.

La importancia de este término radica en que, en la mayoría de los estudios y ensayos clínicos, se incluyeron pacientes con FE reducida (IC-FER) (principalmente FEVI <40%) siendo hasta la fecha en estos pacientes donde se ha demostrado la eficacia de los tratamientos. Arbitrariamente, se considera FE normal >50%. Los pacientes con FEVI entre 40-50% una “zona gris” denominada ahora “rango intermedio”.

Sin embargo, existe un amplio grupo de pacientes con signos y síntomas típicos de IC con FE >50% o preservada (IC-FEP). El diagnóstico de IC-FEP es más desafiante que el diagnóstico de IC-FER. Los pacientes con IC-FEP generalmente no tienen un VI dilatado, sino que a menudo presentan un aumento en el grosor de la pared del ventrículo izquierdo y/o un aumento en el tamaño de la aurícula izquierda como signo de un incremento de las presiones de llenado. La mayoría muestra "evidencia" adicional de incapacidad de succión o llenado del ventrículo izquierdo, denominada como disfunción diastólica, que generalmente se acepta como la causa probable de insuficiencia cardíaca en estos pacientes (de ahí el término de "insuficiencia cardíaca diastólica"). Sin embargo, la mayoría de los pacientes con IC-FER (anteriormente denominada "insuficiencia cardíaca sistólica") también tienen disfunción diastólica y se han observado alteraciones sutiles de la función sistólica en pacientes con IC-FEP. De ahí la preferencia por establecer la FEVI preservada o reducida sobre la denominación de "función sistólica" o "diastólica". Por ello, se han propuesto desde hace más de una década, diversos criterios para definir a este grupo de pacientes. Algunos incluyen algoritmos complejos, que a menudo requieren determinaciones hemodinámicamente invasivas, lo que los hacen poco útiles en la práctica clínica diaria (19,20). En la actualidad, en las Guías de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) de 2016 (16) con el fin de facilitar este aspecto, se han simplificado los criterios necesarios para el diagnóstico de IC-FEP que se expondrán ampliamente en la sección 1.3.

### **1.2.2 Terminología basada en el curso de la enfermedad**

Actualmente, se entiende la fisiopatología de la IC como un "continuum" cardiovascular sin retorno. Sobre una predisposición genética con una base molecular y celular, los factores de riesgo cardiovasculares clásicos como son HTA, diabetes, dislipemia, tabaquismo y obesidad inician un proceso de estrés oxidativo, disfunción endotelial, inflamación y remodelado vascular que

culminarán a lo largo de décadas en daño tisular, enfermedad aterosclerótica, hipertrofia ventricular e isquemia miocárdica.

La “American Heart Association” (AHA) (21), describe los distintos grados de IC basados en cambios estructurales y síntomas. En esta clasificación se incorpora un estadio A, en el que no hay síntomas ni signos de IC ni cardiopatía estructural o funcional en reposo, y que incluye a pacientes con factores de riesgo para desarrollar la enfermedad. Este estadio sirve para enfatizar la importancia que los aspectos preventivos tienen en la patología cardiovascular. Posteriormente, si aparecen alteraciones estructurales o funcionales el paciente ha progresado a un estadio B, aunque no existen ni signos ni síntomas de insuficiencia cardíaca. A medida que la enfermedad avanza, el paciente presenta signos y/o síntomas, y es clasificado como estadio C. Cuando estos síntomas o signos son permanentes, apareciendo en reposo a pesar de estar en tratamiento óptimo para IC, el paciente se encuentra en estadio D.

### **Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada**

La IC con FE preservada, conocida previamente como IC diastólica, es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas clínicos de IC con una FE normal, mayor o igual al 50%. Para el diagnóstico de la IC-FEP deben cumplirse los criterios específicos definidos por la ESC. Así, para mejorar la especificidad del diagnóstico de IC-FEP, los síntomas clínicos deben ser respaldados por medidas objetivas de la disfunción cardíaca en reposo o durante el ejercicio. El diagnóstico de IC-FEP requiere que se cumplan las siguientes condiciones:

- La presencia de síntomas y / o signos de insuficiencia cardíaca.
- Una FE "conservada" (definida como FEVI  $\geq$ 50%)
- Niveles elevados de péptido natriurético (BNP  $>$ 35 pg / ml y / o NT-proBNP  $>$ 125 pg / ml)
- Evidencia objetiva de otras alteraciones estructurales y funcionales cardíacas subyacentes a la insuficiencia cardíaca. (Cuadro 2).

- En caso de incertidumbre, puede ser necesario realizar una prueba de esfuerzo o medir una presión de llenado del VI elevada de forma invasiva para confirmar el diagnóstico.

**Cuadro 2.** Alteraciones estructurales y funcionales en la IC-FEP.

Alteraciones estructurales	Alteraciones funcionales
<p>Aumento de masa indexada del ventrículo izquierdo</p> <p><math>\geq 95 \text{ g/m}^2</math> para mujeres</p> <p><math>\geq 115 \text{ g/m}^2</math> para hombres</p> <p>y/o</p> <p>Aumento del volumen indexado de la aurícula izquierda</p> <p><math>\geq 34 \text{ ml/m}^2</math></p>	<p><math>E/e' \geq 13</math></p> <p>y</p> <p><math>E' \text{ medial y } e' \text{ lateral} &lt; 9 \text{ cm/s}</math></p>

El aumento de la prevalencia de la IC-FEP se puede atribuir a diferentes factores que incluyen el aumento de la expectativa de vida en los países desarrollados, el incremento de comorbilidades cardíacas (la enfermedad arterial coronaria y la fibrilación auricular) y no cardíacas (la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes), y la mayor eficiencia de su diagnóstico clínico. Los datos publicados sobre la mortalidad de la IC-FEP en comparación con la IC-FER son discordantes y varían en función del diseño del estudio y de los criterios de inclusión utilizados (22,23). En algunos estudios se observa una mortalidad similar entre los dos grupos de pacientes (8) y en otros se objetiva una mortalidad menor en los sujetos con IC-FEP con respecto a aquellos con IC-FER (24). Se ha descrito que la principal causa de muerte en los pacientes con IC-FEP es de origen cardiovascular (60%) y las causas mayoritarias son la muerte súbita y la propia IC (25). Sin embargo, los pacientes con IC-FEP muestran, con respecto a aquellos con IC-FER, una mayor mortalidad causada por eventos no cardiovasculares, principalmente

enfermedades renales, respiratorias, infecciones, sepsis y cáncer, entre otras (25), mientras que la mortalidad debida a muerte súbita e IC es menor.

## **2. Cardiopatía hipertensiva**

### **2.1 Hipertensión arterial**

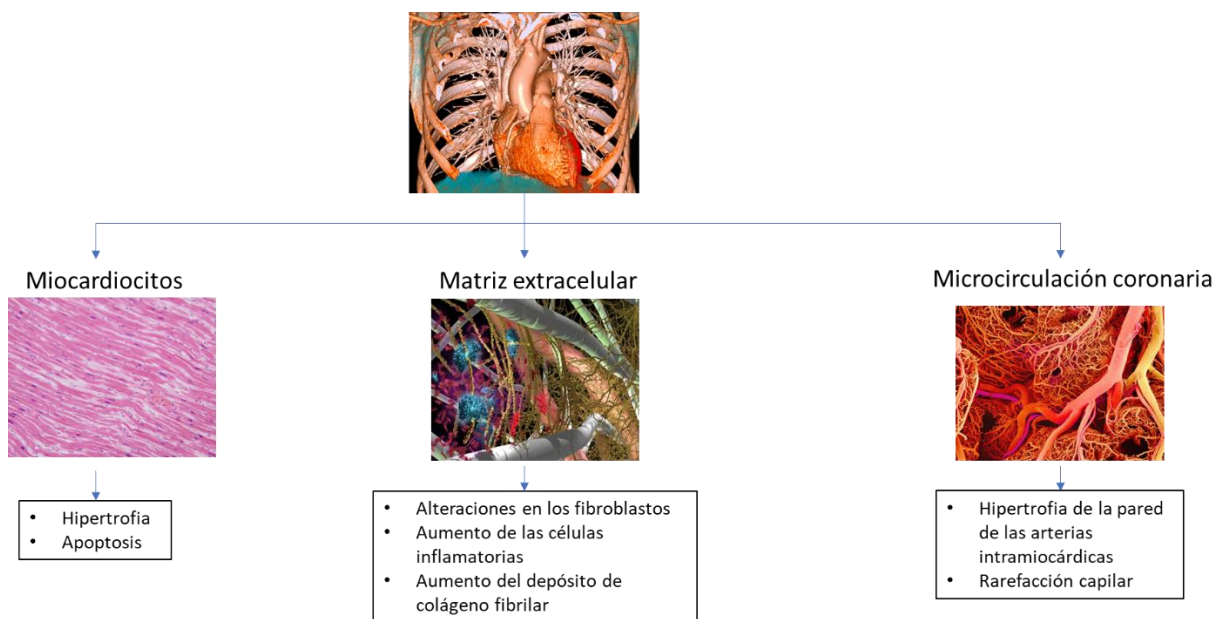
La HTA se define como una presión arterial sistólica (PAS) (presión máxima en sístole)  $\geq 130$  mmHg y/o una presión arterial diastólica (PAD) (presión mínima en diástole)  $\geq 90$  mmHg (26). En el 95% de los casos la elevación de las cifras de la presión arterial (PA) no tiene una causa específica que la origine, sino que se trata de un desorden multifactorial, condicionado por factores genéticos y/o ambientales: es la denominada HTA esencial, definida como aquella PA elevada de manera patológica que no está asociada a enfermedades que cursan secundariamente con hipertensión ( enfermedad renovascular, feocromocitoma, hiperaldosteronismo...) o con un trastorno monogénico hipertensivo (síndrome de Liddle, aldosteronismo corregible con glucocorticoides, déficit de 11 beta-hidroxilasa etc...).

La HTA está asociada con un mayor riesgo de desarrollar IC; la terapia antihipertensiva reduce marcadamente la incidencia de insuficiencia cardíaca (con la excepción de los bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos, que son menos efectivos que otros antihipertensivos para prevenir la insuficiencia cardíaca). Un reciente estudio prospectivo de cohortes documentó que en una población con IC, la presencia de mayores niveles basales de presión sistólica, diastólica y de pulso se asociaron con una mayor tasa de eventos adversos, lo que confirma la importancia del control optimizado de la presión arterial en esta población (27). El control de la presión arterial es un elemento del manejo holístico de pacientes con insuficiencia cardíaca.

## 2.2 Definición de cardiopatía hipertensiva

La cardiopatía hipertensiva (CH) se define por la presencia de hipertrofia ventricular izquierda (HVI), disfunción sistólica o diastólica del VI, y sus manifestaciones clínicas como arritmias e IC que aparecen en pacientes con hipertensión arterial (28,29).

A nivel tisular, el conjunto de las alteraciones que se producen reciben el nombre de remodelado miocárdico y afectan tanto a los cardiomiocitos (hipertrofia y apoptosis), al intersticio (alteraciones en los fibroblastos, aumento de las células inflamatorias y aumento del depósito de colágeno fibrilar) y a la vasculatura intramiocárdica (hipertrofia de la pared de las arterias intramiocárdicas, y rarefacción capilar), y contribuyen al deterioro de la morfología y función característico de esta patología.



**Figura 1.** Distintas alteraciones presentes en el remodelado miocárdico.

A nivel estructural, en el VI se observa un remodelado geométrico en el que clásicamente se defendía la aparición de hipertrofia ventricular izquierda como respuesta



del organismo al aumento de la postcarga debido a la hipertensión arterial. Pero existen pacientes que no desarrollan HVI, por lo que la CH es no sólo una cuestión de HVI sino el resultado de complejas alteraciones miocárdicas, celulares y tisulares, que conducen a cambios tanto en la forma o el tamaño del VI como en su función, que dan lugar además a alteraciones en otras cámaras cardíacas.

### **2.3 Alteraciones de los miocardiocitos**

En el miocardio de los pacientes con CH se objetiva la presencia de hipertrofia de los cardiomiocitos independientemente de la manifestación ecocardiográfica de HVI. Este aspecto del remodelado miocárdico se debe a la capacidad de éstos para responder a estímulos externos que promueven su crecimiento tales como factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, aunque el principal estímulo el aumento del estrés mecánico debido a la sobrecarga hemodinámica producida por la HTA (28,30,31).

De manera paralela se produce una pérdida de miocardiocitos lo cual se puede atribuir a diferentes procesos de muerte celular tales como la apoptosis, la necrosis y la autofagia, que a su vez están interconectados entre sí. Todo ello puede contribuir a una disfunción del ventrículo izquierdo mediante diversos mecanismos que conllevan a un desarraigo de la unión celular, un adelgazamiento de la pared ventricular y una dilatación de las cámaras cardíacas (28).

### **2.4 Alteraciones en el espacio intersticial**

El intersticio del miocardio de la CH está expandido debido al aumento de elementos celulares y no celulares. Por una parte se detecta una hiperplasia de los fibroblastos (32,33) que a su vez está favorecida por la apoptosis de los cardiomiocitos. Así mismo se ha documentado un aumento de los mastocitos (inducido por los linfocitos sanguíneos). Es importante reseñar que recientemente se ha objetivado que la inflamación y la activación de la inmunidad son factores determinantes importantes en la patogénesis del daño estructural producido por la hipertensión arterial (34–36).

En el intersticio de un paciente con CH se produce un aumento de la matriz extracelular fundamentalmente debido a un exceso de colágeno tipo I y tipo III. En las primeras etapas predomina un depósito de fibras de colágeno de tipo III en torno a las arterias intramiocárdicas, que se extiende desde ahí al intersticio. Posteriormente se depositan fibras de colágeno tipo I sin seguir un patrón específico de distribución.

En cuanto al espesor miocárdico, fundamentalmente se produce una fibrosis del miocardio subendocárdico debido al gradiente de presión que tiene que soportar la pared del miocardio (37).

## **2.5 Alteraciones en la microcirculación coronaria**

El lecho vascular intramiocárdico también resulta afectado, lo que contribuye al remodelado miocárdico. La vascularización miocárdica presenta una hipertrofia de la capa media con una disminución del diámetro de la luz. Como consecuencia, sufre un remodelado vascular con una disminución del diámetro externo del vaso. Todo ello contribuye a la disminución de la perfusión del miocardio (38). Además, en el espacio perivascular de arterias y arteriolas se observaba una infiltración de células inflamatorias y una acumulación de colágeno alrededor de los vasos o fibrosis perivascular.

Junto a estas alteraciones estructurales, la vasculatura intramiocárdica también puede presentar alteraciones funcionales, principalmente una disfunción endotelial. Ello conlleva una vasodilatación deficiente y un aumento de la permeabilidad del vaso, con la consecuente filtración de células inflamatorias que participan en el remodelado miocárdico (39).

### **3. Fibrosis miocárdica**

La fibrosis miocárdica difusa, o acumulación exagerada de colágeno en la matriz extracelular, es una de las características anatomopatológicas definitorias del remodelado miocárdico en la cardiopatía hipertensiva (40). Constituye un proceso complejo que se inicia con la activación de los fibroblastos y éstos producen a su vez una alteración en la red de colágeno. De una manera global traduce el resultado de un desequilibrio en el metabolismo del colágeno entre la producción y la degradación de éste, y se produce una disminución de su degradación y un aumento de su producción.

#### **3.1 Alteración de los fibroblastos**

Las alteraciones de los fibroblastos, presentes en el intersticio miocárdico, desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la fibrosis miocárdica (41). Los fibroblastos se activan, proliferan y se transdiferencian a miofibroblastos (42) en respuesta a estímulos como la hipoxia, el estiramiento mecánico, la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), factores de crecimiento (por ejemplo el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  [TGF- $\beta 1$ ]) y a citoquinas (por ejemplo la interleuquina-1 y -6, [IL-1 y IL-6]) (43,44). Estas últimas son las principales productoras de colágeno y proteínas matricelulares en condiciones patológicas.

##### **3.1.1 Alteración de la red de colágeno**

La red de colágeno fibrilar, sintetizada fundamentalmente por los fibroblastos y los miofibroblastos (44), provee la estructura de anclaje para los cardiomiocitos y los vasos coronarios, y confiere al tejido cardíaco propiedades físicas como la rigidez y la resistencia a la deformación del miocardio (40,45).

El colágeno es una proteína estructural de la matriz extracelular que contiene una estructura de triple hélice (46), formada por tres cadenas polipeptídicas ( $\alpha$ -cadenas). Se han identificado 28 tipos distintos de colágeno (47). Los tipos de colágeno ( reflejados en el cuadro 3) pueden clasificarse en dos grupos basados en su estructura primaria y su

organización supramolecular: el colágeno formador de fibras (o fibrilar) y el colágeno no fibrilar (48).

El colágeno fibrilar, es el responsable del mantenimiento de la alineación de los cardiomiocitos durante el ciclo cardíaco, y de dar soporte estructural a los vasos coronarios en su recorrido en el intersticio. Está compuesto por los colágenos tipo I, II, III, V y XI. El colágeno tipo I es la proteína más abundante en el organismo humano, presente en una gran cantidad de tejidos. El segundo en frecuencia es constituye el colágeno tipo III, el cual se encuentra en asociación con el colágeno tipo I. Respecto al miocardio, se ha descrito que el principal tipo de colágeno presente es el tipo I, que constituye aproximadamente el 80% de las fibras de colágeno, seguido del colágeno tipo III (49).

Se ha demostrado que la composición de la matriz extracelular en los pacientes con CH se caracteriza principalmente por un aumento de la expresión del colágeno de tipo I, que llega a suponer hasta un 80-90% del colágeno de la matriz extracelular, mientras que el aumento del colágeno de tipo III es cuantitativamente menos relevante (49). En la Tabla 4 se reflejan los diferentes tipos de colágenos.

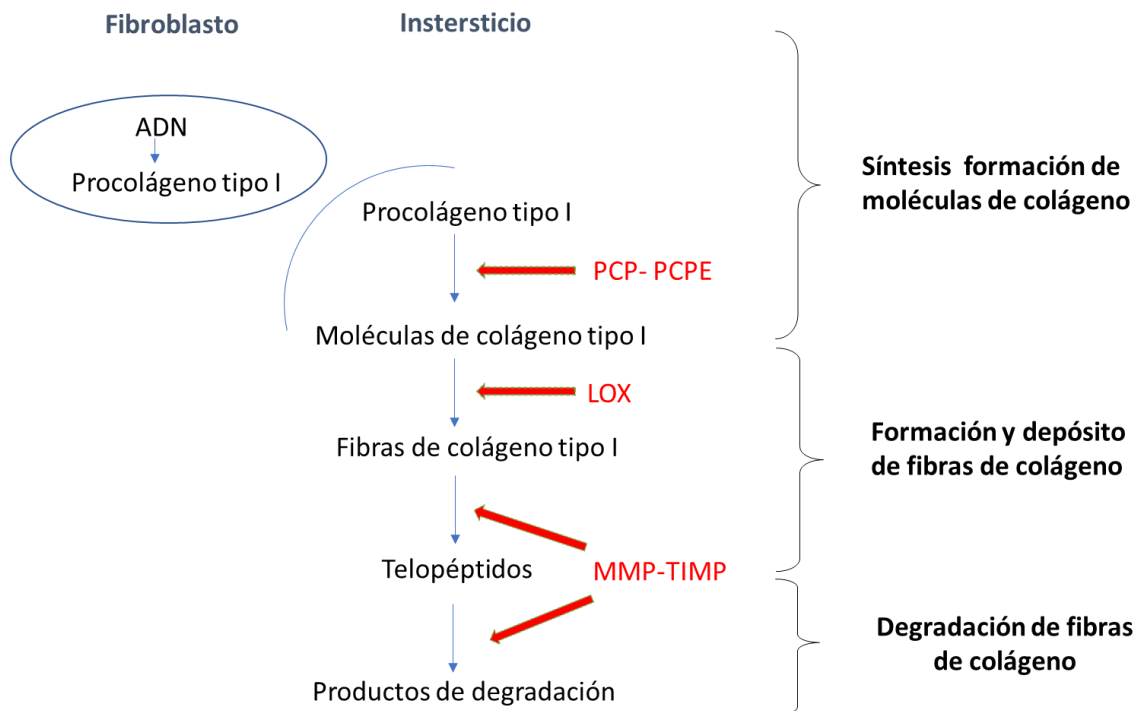
**Cuadro 3.** Diferentes tipos de colágeno, cadenas  $\alpha$  predominantes y su apariencia estructural.

<b>Tipo</b>	<b>Cadena <math>\alpha</math> predominante</b>	<b>Apariencia estructural</b>
I	COL 1A1, COL 1A2	Fibrilar, constituye fibras peri y epimisiales
III	COL3A1	Fibrilar, constituye fibras peri y epimisiales
IV	COL4A1, COL4A6	Membrana basal
VI	COL6A1, COL6A3	No-fibrilar, adhesión

El mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular, se debe a un equilibrio entre la síntesis y la degradación de su principal componente, el colágeno fibrilar tipo I (32). En condiciones patológicas se produce una alteración de dicho equilibrio a favor de la síntesis de las fibras de colágeno, y se mantiene invariada o disminuye su degradación por las metaloproteinasas (MMPs) de matriz (50). Se trata, por lo tanto, de un proceso complejo regulado a diferentes niveles cuyo funcionamiento defectuoso deriva en alteraciones estructurales y funcionales del miocardio (51).

Este proceso se puede dividir conceptualmente en tres fases (Figura 2):

- Síntesis y formación de la molécula de colágeno tipo I
- Formación y depósito de la fibra de colágeno tipo I
- Degradación de la fibra de colágeno tipo I



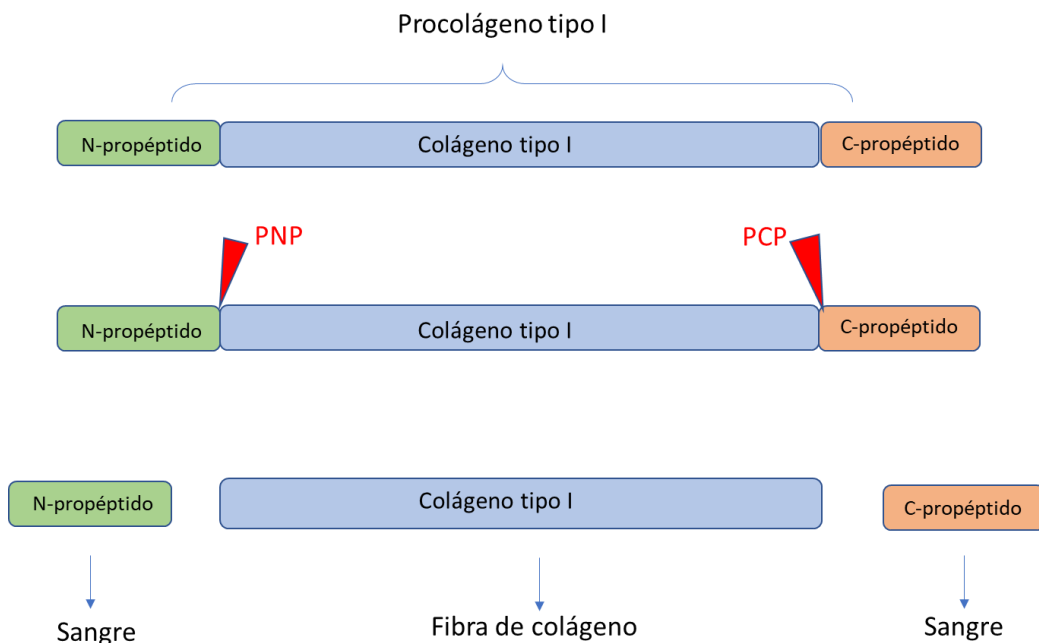
PCP; proteinasa C del procolágeno, PCPE; enhancer de la PCP, LOX; lisil-oxidasa, MMP-TIMP; sistema de metaloproteinasas y sus inhibidores.

**Figura 2:** Diagrama representativo del ciclo del colágeno fibrilar tipo I.

### 3.1.2 Síntesis de las moléculas de depósito

Diferentes células presentes en el miocardio humano (fibroblastos, células musculares lisas o endoteliales) pueden sintetizar colágeno, aunque la principal fuente de este son los fibroblastos. La síntesis del colágeno tipo I sigue el patrón normal de la síntesis proteica, pero cabe considerar que las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , que son las cadenas  $\alpha$  que conforman el colágeno I y cuyos genes se localizan en los cromosomas 7 y 17, inicialmente se sintetizan intracelularmente, para posteriormente sufrir un gran número de modificaciones post-traduccionales como la hidroxilación de residuos de prolina y la glicosilación de residuos de hidrolisina. Tras estas modificaciones, las cadenas  $\alpha$  se ensamblan para formar una molécula de triple hélice, denominada procolágeno I, siendo éste secretado al espacio extracelular (52).

Una vez en el espacio extracelular, el procolágeno I sufre modificaciones para posteriormente ser ensamblado y conformar estructuras supramoleculares. En todo este proceso, los dos propéptidos situados en los extremos terminales del procolágeno I (amino- y carboxi-) son hidrolizados y liberados por proteinasas específicas (52,53) (Figura 3). Tanto el propéptido carboxi-terminal o PICP, de 100 KDa, y la endopeptidasa amino-terminal del procolágeno tipo I (PNP) tienen que ser necesariamente eliminados por acción de la proteinasa carboxi-terminal del procolágeno (PCP) (Figura 3). La actividad de esta enzima se regula a varios niveles, y entre otros mecanismos puede verse incrementada, por una glicoproteína que actúa como potenciador denominado PCP “enhancer” (PCPE). Ésta se une al PICP e induce un cambio conformacional, que deja más accesible la zona de hidrólisis en la que actúa la PCP (54), lo que favorece su actividad catalítica hasta 10 veces (54).



PCP, proteinasa carboxi-terminal del procolágeno; PNP, proteinasa amino-terminal del procolágeno.

**Figura 3:** Formación de la molécula de colágeno tipo I.

En condiciones patológicas, como en la HTA, se produce tanto un aumento de la síntesis de procolágeno I por parte de los fibroblastos y miofibroblastos, como una activación de este sistema enzimático, el PCPE (55).

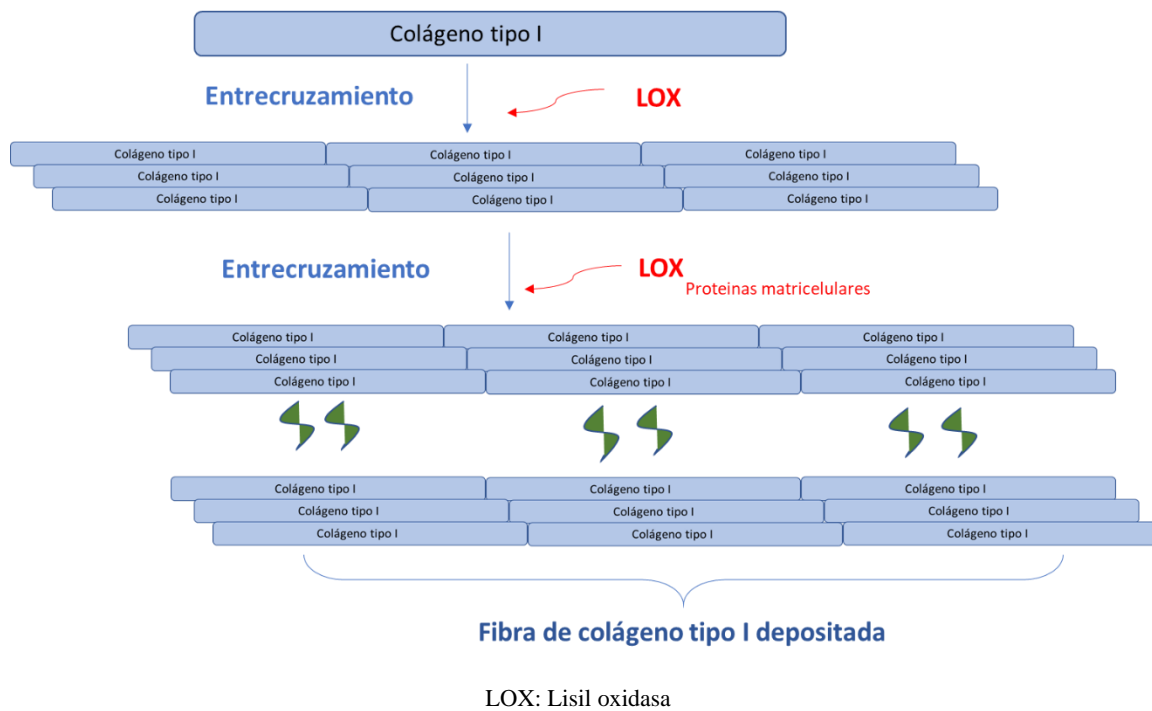
La función de los propéptidos de los extremos terminales, el PICP y el PNP, se desconoce en la actualidad, pero se postula que actúen como moduladores del ensamblaje fibrilar o regulen retroactivamente la síntesis de precursores (56). Lo que sí se ha objetivado es que los propéptidos abandonan el espacio intersticial a través de los conductos linfáticos o cruzando la pared endotelial, y pueden alcanzar el torrente sanguíneo (28). Es estrictamente necesario que el PICP se escinda para obtener la molécula madura de colágeno tipo I, por lo que por cada molécula de colágeno que se forma, se libera una molécula de PICP con una relación 1:1. Por otra parte, la escisión del extremo aminoterminal (PINP) no es estrictamente necesaria y puede permanecer unido a la molécula del colágeno (56).

### **3.1.3 Formación y depósito de las fibras de colágeno**

Tras la síntesis de las moléculas de colágeno tipo I en el intersticio celular, se produce su ensamblaje entre sí mediante enlaces covalentes, de manera que se forman cadenas polipeptídicas de colágeno tipo I. Este proceso se denomina entrecruzamiento y como consecuencia las fibras de colágeno se vuelven menos solubles y más resistentes a las enzimas proteolíticas (57), proceso reflejado en la Figura 4.

Existen dos tipos diferentes de entrecruzamiento: enzimático y no enzimático. El primero es dependiente de la enzima denominada lisil oxidasa (LOX), mientras que el segundo está mediado por las proteínas matricelulares (58) así como por los productos finales de la glicosilación avanzada (59). La LOX es una amino-oxidasa extracelular dependiente de cobre, cuyo objetivo es la formación de los grupos aldehído mediante la catalización de la oxidación de los grupos amino en los residuos lisina e hidroxilisina de las moléculas de colágeno (60,61). Estos grupos posteriormente forman enlaces covalentes entre sí o con otros grupos  $\epsilon$ -amino, se produce así el entrecruzamiento y, por tanto, la formación y el depósito de las fibras de colágeno insoluble.





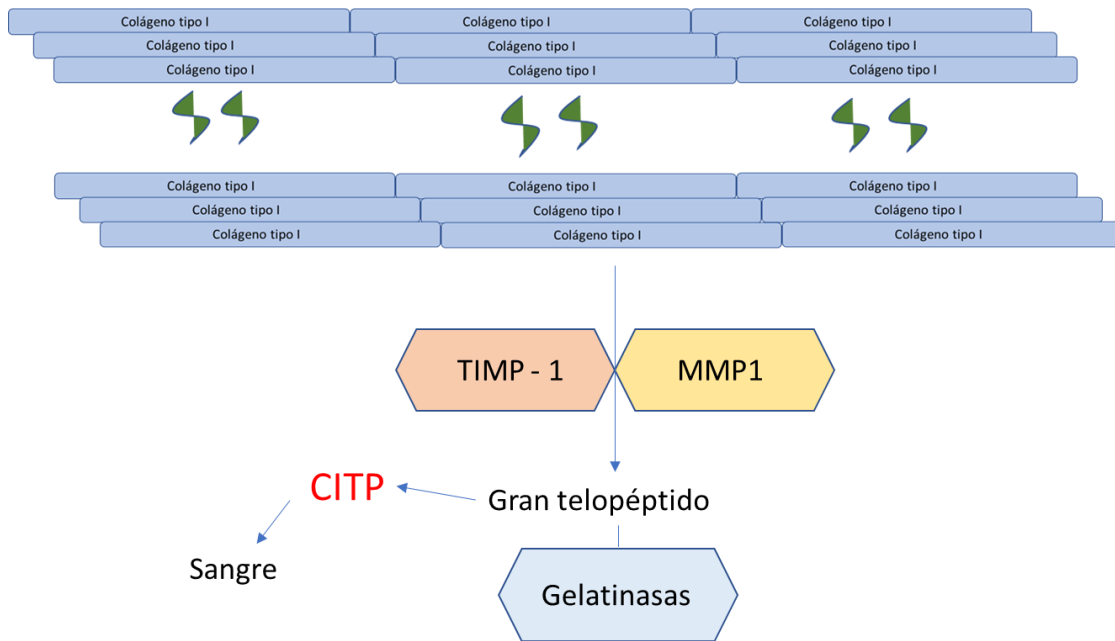
**Figura 4.** Proceso de entrecruzamiento de las moléculas de colágeno tipo I para la formación de las fibras de colágeno tipo I.

En condiciones patológicas, la enzima LOX es sintetizada, tanto por los fibroblastos como por los cardiomiocitos como un precursor inactivo (62) denominado prolil-LOX, el cual es transformado posteriormente a su forma activa LOX. Esta transformación desde su metabolito inactivo hasta la enzima activa es regulada por la PCP (61). Por consiguiente, la formación de moléculas de colágeno tipo I, la posterior formación de fibras de colágeno y su depósito está supeditada al PCP y al PCPE.

Se ha descrito un aumento de la expresión miocárdica de la LOX en pacientes con IC-FEP (63). Además, nuestro grupo ha sugerido que el exceso de entrecruzamiento del colágeno mediado por la LOX, facilita el aumento de la rigidez del VI con la consiguiente elevación de las presiones de llenado en pacientes con IC de origen hipertensivo en estadio C (64).

### **3.1.4. Degradación de la fibra de colágeno tipo I**

Una vez pasados 100-110 días las fibras de colágeno tipo I depositadas son degradadas por la colagenasa o MMP-1, una enzima que pertenece a la familia de las MMPs. Esta enzima se sintetiza como un precursor zimogénico inactivo, que requiere una escisión proteolítica para ser activada. La colagenasa activa se puede inhibir por la interacción con inhibidores tisulares específicos de las MMPs (TIMPs), principalmente con el TIMP-1 (65). Por consiguiente, la actividad de la colagenasa depende del equilibrio entre su síntesis, su activación y su proporción con respecto a los TIMPs. La MMP-1 activa hidroliza las moléculas de colágeno tipo I en dos fragmentos: un telopéptido grande equivalente al 75% de la molécula y un telopéptido pequeño equivalente al 25% restante, denominado CITP o telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (Figura 5). El péptido de mayor tamaño es degradado a su vez por otras MMPs, las gelatinasas, que dan lugar a pequeños productos de degradación. El CITP posteriormente se filtra a la sangre a través de los capilares y los vasos linfáticos (Figura 5).



CITP, telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I; MMP-1, metaloproteínasa de matriz-1; TIMP-1, inhibidor tisular de metaloproteínasas 1

**Figura 5:** Proceso de degradación de las fibras de colágeno tipo I.

Dado que la enzima MMP-1, principal encargada de iniciar la degradación de las fibras de colágeno en el corazón está regulada principalmente por la presencia del TIMP-1, el uso del cociente entre ambas moléculas se podría considerar un índice parcial de la activación de la MMP-1 y, consecuentemente, de la degradación de colágeno tipo I. El TIMP interfiere tanto en la conversión en la forma activa como en la inhibición directa de la actividad del MMP-1. Por lo tanto, la actividad neta de la MMP-1, depende tanto su concentración relativa de la forma activa de la enzima, como de la concentración de su inhibidor tisular. Se ha objetivado que este cociente está disminuido en pacientes con IC-FEP y se ha asociado a un mayor entrecruzamiento (66). Así mismo los niveles circulantes de TIMP-1 presentan una buena sensibilidad y especificidad para detectar la presencia de disfunción diastólica e IC-FEP en sujetos con CH (67). En un estudio reciente realizado por nuestro grupo, se observa que el exceso de TIMP-1 sérico se asocia con la elevación de las presiones de llenado del VI en sujetos hipertensos con IC con FE normal (68).

## **4. Diagnóstico no invasivo de la fibrosis miocárdica**

En la progresión de la IC, intervienen múltiples procesos biológicos desde el inicio de la enfermedad que pueden inducir alteraciones moleculares y celulares que alteran la estructura, geometría y función del ventrículo que da lugar como resultado final a lo que se conoce como remodelado ventricular.

De la complejidad de este síndrome, así como de su progresivo conocimiento, surge el creciente interés por la investigación de sustancias bioquímicas circulantes, los llamados biomarcadores, que reflejen los distintos aspectos fisiopatológicos de la IC.

De esta manera, las concentraciones de moléculas que participan en los diferentes procesos patológicos presentes en la IC podrían ser biomarcadores en teoría. Sin embargo, no todas estas moléculas son válidas para tal fin, sino que deben reunir ciertas condiciones.

### **4.1 Definición de biomarcador**

Se ha definido como “una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”(69). En la IC, estos pueden tener relación con las características demográficas, las pruebas de imagen cardíaca o incluso con la determinación de un polimorfismo genético específico. Sin embargo, generalmente se usa el término biomarcador para referirse a sustancias circulantes que pueden determinarse mediante análisis que quedan fuera de las pruebas estándar de bioquímica y hematología usadas en el manejo clínico habitual(69).

### **4.2 Criterios para la utilización clínica de biomarcadores**

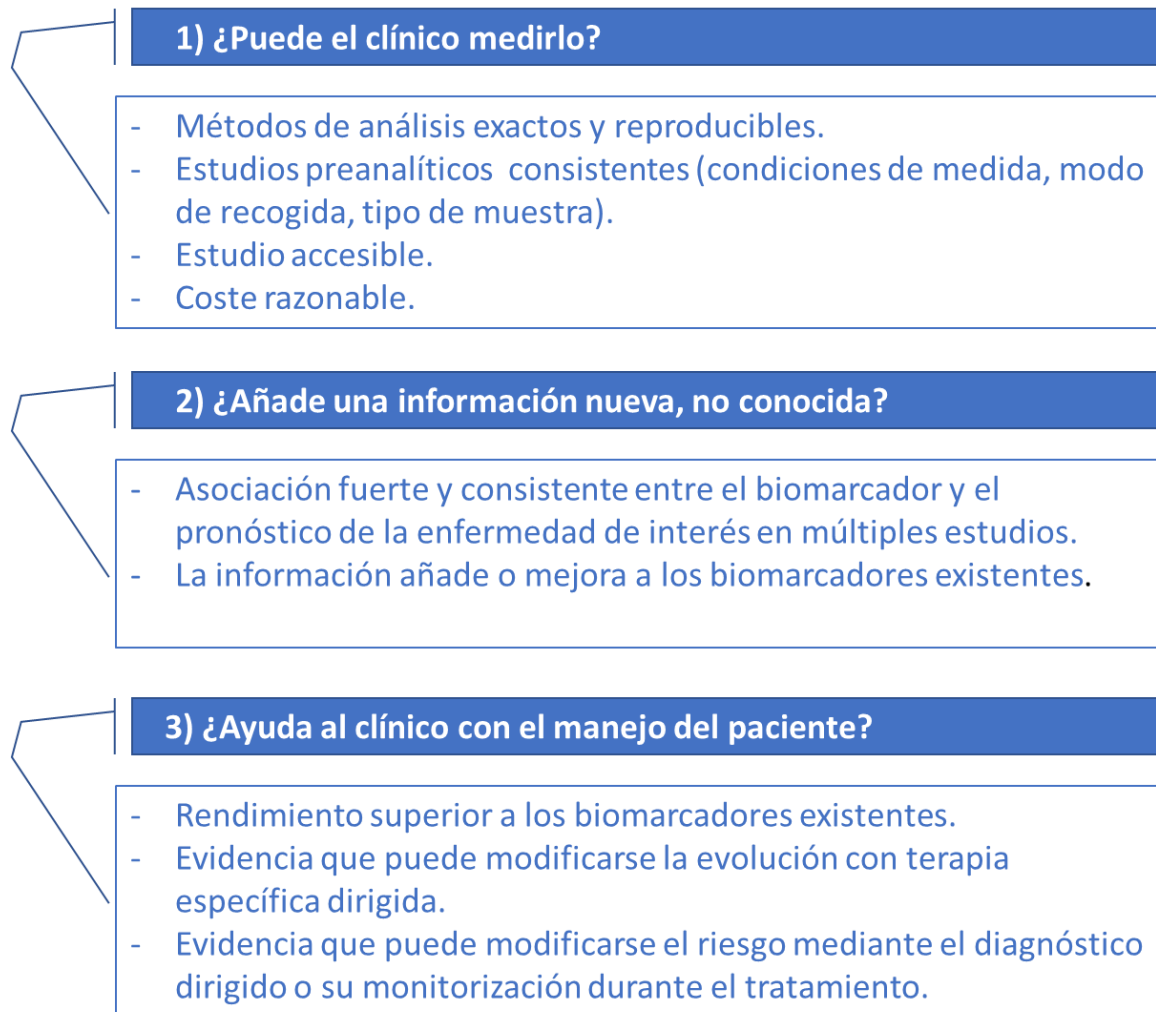
Se han definido criterios (Figura 6) para valorar la utilidad clínica de los biomarcadores (70), que se han simplificado en tres preguntas:

- a) ¿Puede el clínico medirlo?
- b) ¿Añade una información nueva, no conocida?
- c) ¿Ayuda al clínico con el manejo del paciente?

El primero de ellos, “¿Puede el clínico medirlo?” conlleva que los métodos de análisis deben ser exactos y reproducibles y estar bien fundamentados, con estudios preanalíticos (condiciones de medida, modo de recogida, tipo de muestra). El producto analizado en el suero o el plasma debe ser lo suficientemente estable para evitar una degradación excesiva tras la obtención de la muestra. La prueba analítica utilizada debe estar disponible, aceptada y tener un coste económico razonable.

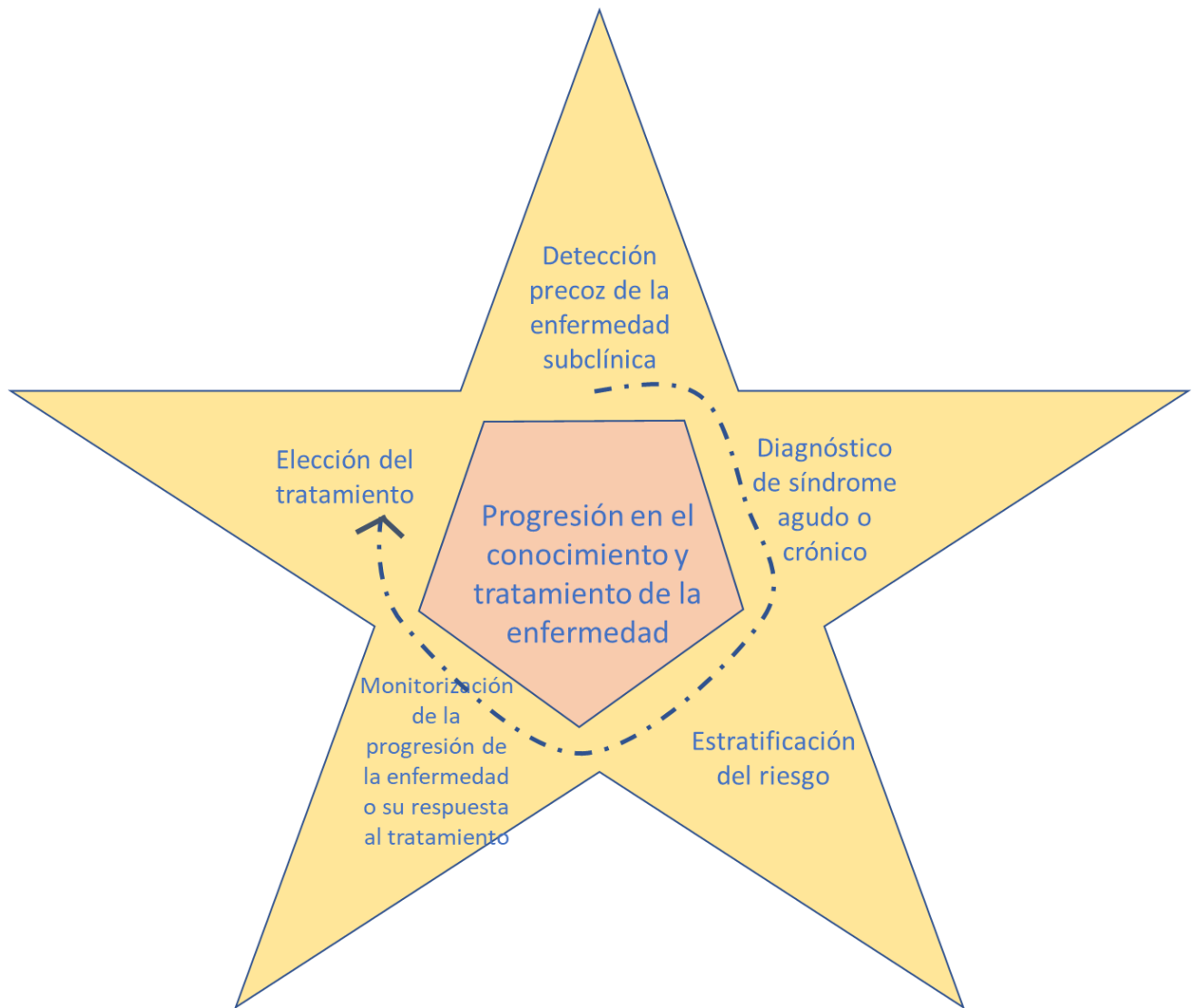
En segundo lugar “¿Añade una información nueva, no conocida?” el marcador debería dar información de la que no se pueda disponer de otro modo. Su valor añadido depende de la consistencia y la fuerza de la asociación entre el biomarcador y el resultado o la enfermedad de interés, y la medida en que es una mejora en las herramientas establecidas (ya sea que se agreguen o reemplacen). Una validación externa es fundamental y un paso crítico para la integración en la vía clínica.

El último y más importante “¿Ayuda al clínico con el manejo del paciente?” implica que la determinación debería mejorar la certeza diagnóstica o la estratificación del riesgo clínico respecto a lo alcanzado con las técnicas actuales, facilitar el manejo clínico y mejorar el pronóstico, el añadir valor a las pruebas existentes hasta el momento.



**Figura 6:** Criterios de evaluación de los biomarcadores.

En resumen, se pueden usar para (1) la detección precoz de la patología o en su defecto de la enfermedad subclínica; (2) evaluación diagnóstica de un síndrome clínico agudo o crónico; (3) estratificación del riesgo de pacientes con un diagnóstico sospechado o confirmado; (4) selección de una intervención terapéutica apropiada; y (5) monitorización la respuesta a la terapia, tal como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7:** Utilidad de los biomarcadores en la progresión del conocimiento y tratamiento de la enfermedad

### 4.3 Biomarcadores de fibrosis miocárdica

De entre la multitud de biomarcadores investigados en fibrosis miocárdica, son pocos los que han llegado a satisfacer estos criterios y pueden utilizarse en la práctica clínica diaria. Sin embargo, esto no reduce la importancia de la perspectiva fisiopatológica proporcionada por su investigación (67).

#### **4.3.1. Biopsia endomiocárdica**

Los biomarcadores candidatos de fibrosis miocárdica se deben comparar con el actual “gold standard” para el diagnóstico de la fibrosis miocárdica, que es el análisis histopatológico del tejido miocárdico, cuya muestra se adquiere mediante biopsia miocárdica. La fibrosis miocárdica es un concepto anatomopatológico, por ello el estudio histológico de muestras de tejido miocárdico mediante técnicas capaces de identificar el depósito exagerado de los distintos componentes de la matriz extracelular (MEC), constituye el patrón de referencia para su detección. En este contexto, la identificación de una molécula circulante que se definirá como un verdadero biomarcador de la fibrosis miocárdica requiere la demostración de que sus niveles sanguíneos se correlacionan directamente con los parámetros cuantitativos utilizados para definir la fibrosis en muestras de biopsias endomiocárdicas.

El porcentaje de tejido miocárdico total ocupado por fibras de colágeno o fracción de volumen de colágeno miocárdico (FVC) se puede determinar con sistemas de análisis de imágenes automatizados en los que se utiliza una tinción específica de colágeno. De forma similar, el uso de anticuerpos monoclonales contra el colágeno tipo I y colágeno tipo III permite la determinación del FVC miocárdico ocupado por fibras de colágeno tipo I (FVCI) o colágeno tipo III (FVCIII), respectivamente. Por lo tanto, la fibrosis miocárdica se caracteriza por valores anormalmente altos de FVC, FVCI y FVCIII y/o de la proporción de FVCI: FVCIII.

Debido a la distribución gradual de la fibrosis miocárdica, la principal limitación de la biopsia miocárdica es el error en el muestreo. Por lo tanto, el análisis de varios fragmentos de tejido es importante para la exactitud e interpretación del diagnóstico. Una biopsia del VI puede parecer que tenga más rendimiento diagnóstico que una biopsia del ventrículo derecho en algunas cardiomiopatías. Sin embargo, Pearlman et al. (71) describieron que la fibrosis miocárdica (evaluada como FVC) es un proceso generalizado que afecta de manera similar tanto al VI como al ventrículo derecho (VD). Recientemente se ha demostrado que la fibrosis miocárdica (evaluada con el FVC) presente en las muestras de biopsia del lado derecho del tabique interventricular es similar a la fibrosis presente en la pared libre del ventrículo izquierdo en pacientes con IC de



origen hipertensivo (72). Es necesario reseñar que la biopsia endomiocárdica es un procedimiento seguro con un porcentaje de complicaciones totales de 9,7% siendo el riesgo de perforación cardíaca con taponamiento del 0,97% (73).

#### **4.3.2 Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I**

Como se ha expuesto anteriormente, el propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I es un producto que se produce tras la hidrólisis en el espacio extracelular del procolágeno tipo I en colágeno tipo I realizado mediante la PCP. Este péptido escisionado es vertido a la sangre con una relación 1:1 con el número de moléculas de colágeno tipo I formadas, es decir, por cada molécula de procolágeno tipo I convertida en molécula de colágeno tipo I, una molécula del propéptido C-terminal del procolágeno tipo I pasa a sangre.

En pacientes con CH se ha hallado de forma consistente una asociación directa entre la concentración sanguínea del PICP y la FVC miocárdica determinada mediante biopsias endomiocárdica (74); así mismo, esto se ha observado en pacientes sin IC (75). Se ha encontrado una correlación robusta entre los niveles séricos de PICP y FVCI en pacientes con CH e IC (64). En pacientes con IC-FEP los niveles de PICP se encuentran aumentados con respecto a sujetos control y se asocian con el deterioro de la función diastólica (68). Es interesante añadir que los niveles séricos de PICP y FVC se modificaron de forma paralela tras el tratamiento con losartán en los pacientes con CH sin IC clínica (76) y en respuesta al tratamiento con torasemida en pacientes con CH e IC (77). Así mismo, recientemente se ha hallado que los valores de PICP elevados presentan un valor pronóstico desde el punto de vista clínico (78). Todo ello hace que el PICP sea un biomarcador que cumple todos los criterios para ser biomarcador de fibrosis miocárdica.

### **4.3.3 Cociente CITP:MMP1**

Se ha observado que no sólo la cantidad de colágeno es lo que determina la fibrosis miocárdica sino que también el grado de entrecruzamiento de sus fibras de colágeno caracteriza la fibrosis miocárdica. Tal como se ha expuesto previamente, el grado de entrecruzamiento determina la resistencia de las fibras de colágeno a la degradación por metaloproteinasa de matriz (MMP) -1, lo que resulta en la escisión disminuida de un pequeño telopéptido C-terminal de la fibra (CITP en el caso de las fibras de colágeno tipo I, donde representa uno de los dos principales sitios de enlaces cruzados) y un gran telopéptido amino terminal. Por ello niveles bajos de CITP (corregido por la disponibilidad total o libre de MMP-1) podrían reflejar la reducción de la degradación de colágeno tipo I debido al incremento del entrecruzamiento. Se ha visto así mismo que un menor cociente se asocia a mayor disfunción diastólica (68). Se ha demostrado que un cociente bajo de CITP:MMP1 está asociado de manera independiente al grado de entrecruzamiento en pacientes con IC de origen hipertensivo (66) y además este biomarcador es un factor pronóstico en el desarrollo de IC (66).

### **4.3.4 Fibrosis miocárdica maligna**

Debido a la naturaleza heterogénea de la fibrosis miocárdica, es poco probable que un único biomarcador oferte un rendimiento suficiente para su uso como prueba de detección pronóstica independiente. Por ello, la combinación de biomarcadores puede resultar más efectiva. Recientemente se ha observado que la confluencia de alta cantidad de colágeno con elevado grado de entrecruzamiento de sus fibras de colágeno se asocia con un fenotipo maligno de fibrosis miocárdica caracterizada por un mayor riesgo de hospitalización por IC o mortalidad (79). Este fenotipo complejo puede ser identificado en pacientes con cardiopatía hipertensiva en estadio C mediante la baja relación sérica de CITP: MMP-1 y el incremento del PICP sérico según recientes estudios (79). De esta manera la combinación de estos dos biomarcadores predijo el riesgo de hospitalización por insuficiencia cardíaca o mortalidad (cardiovascular o por todas las causas) así como fibrilación auricular (80) independientemente de varios factores de riesgo relevantes, incluida la FEVI.

## **5. Influencia de la enfermedad renal crónica en la insuficiencia cardiaca**

El estudio y tratamiento del paciente desde un equipo multidisciplinar constituye una de las principales características de la actual asistencia a pacientes cardiopatas. Aunque parezca la recuperación de un concepto clásico en medicina asistencial, la investigación básica y clínica de los últimos años nos indica que la atención a estas patologías debe ser un ejemplo de integración del conocimiento multidisciplinar. De hecho, en su estudio han de contemplarse no sólo aspectos relacionados de forma directa con el órgano a estudio, sino también, con la afectación de otros sistemas con los que su enfermedad se halla vinculada de forma directa o indirecta, y de cuya investigación pueda refinarse el proceso diagnóstico y terapéutico (81). La enfermedad renal crónica (ERC) en las enfermedades cardiovasculares en general –y, en particular, en la insuficiencia cardiaca– es un ejemplo donde se plasma la reflexión previa.

La ERC es definida, según las guías de práctica clínica de 2017, como las alteraciones de la estructura renal o su función, presente durante > 3 meses, con implicaciones para la salud (82,83). Reconocemos que ERC y la enfermedad cardíaca discurren de tal forma que el progresivo deterioro de una suele acompañar una afectación mayor de la otra, y que hay la relación "bidireccional" entre ambas patologías (renal y cardiovascular) que ya fue descrita por Ronco et al en 2008 (84); mientras que la IC promueve la ERC, la ERC acelera la IC. Esta relación bidireccional entre la IC y la ERC está ampliamente descrita (85), así como su independencia de otras variables (21). Además, se han identificado mediadores, hemodinámicos y hormonales, que explican esta doble relación fisiopatológica (86), que desarrollaremos posteriormente. Por otro lado, en la práctica clínica, la valoración de la función renal es un elemento determinante en el abordaje diagnóstico de pacientes con cardiopatía y presenta múltiples implicaciones pronósticas y terapéuticas cuya identificación es preciso determinar para optimizar el abordaje de estos pacientes(85).

Según los datos de US Renal Data System, en 2016 la prevalencia de IC en pacientes con ERC de 65 años o más era cercana al 26%, en comparación con un 6% en los pacientes sin ERC (87). Tal como se expuso previamente, la incidencia a nivel mundial

de IC de novo en la población general no excede el 1% (14), mientras que la incidencia de la ERC se sitúa entre un 17 % a un 24% (88).

El mecanismo de daño y disfunción en pacientes con IC y ERC aparte de ser bidireccional se solapa de manera considerable. En pacientes con ERC, los factores de riesgo para desarrollar IC incluyen: un aumento de la postcarga debido a un aumento crónico de HTA y por lo tanto el desarrollo de rigidez vascular y una precarga excesiva debido a la retención de sal y agua. Así mismo, hay factores no hemodinámicos como la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) sistémico y local y del simpático, la producción de citoquinas inflamatorias que determinan un estado de inflamación sistémica, la disminución del metabolismo del hierro, la disfunción de la médula ósea y la anemia que completan un círculo vicioso que deteriora de forma progresiva tanto la función cardíaca como la renal.

El término miocardiopatía urémica hace referencia a las alteraciones cardíacas que se objetivan en la ERC (89). El primer signo de afectación cardíaca en pacientes con ERC es la presencia de hipertrofia de ventrículo izquierdo, que es, a su vez, el mayor predictor independiente de mortalidad cardiovascular en estos pacientes (89). Desde el punto de vista histológico la hipertrofia del ventrículo izquierdo incluye la hipertrofia de los cardiomiocitos, el engrosamiento de las arteriolas intramiocárdicas, la reducción de la densidad de los capilares y la presencia de fibrosis miocárdica (90). Recientemente se ha propuesto que la fibrosis miocárdica es un hallazgo casi constante en autopsias de pacientes con ERC en diferentes estadios, pudiendo ser el mayor responsable de la disfunción cardíaca (91). Inicialmente la fibrosis miocárdica aumenta la rigidez del VI y disminuye la relajación pasiva del VI lo cual altera el llenado pasivo (disfunción diastólica); en estadios avanzados se produce una afectación en la disposición de los miocardiocitos que produce alteraciones de la contractilidad lo cual conlleva a la disfunción sistólica (92). Existe evidencia científica robusta de que las alteraciones de la estructura y función del VI están presentes en estadios tempranos de ERC (93), de manera que lo que hasta la fecha era conocida como “cardiomiopatía urémica”, quizás deberíamos acuñarlo como cardiomiopatía asociada a la ERC (89).

Como previamente se ha dicho, la presencia de ERC está asociada a mayor mortalidad en pacientes con IC, pero es importante reseñar que aquellos con IC- FEP presentan un mejor pronóstico (94) que pacientes con IC-FER. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que la ERC está en relación con un aumento del remodelado cardíaco, una

mayor disfunción diastólica y un peor pronóstico en los pacientes con IC-FEP, de los cuales > 80% eran hipertensos (95). Diversos estudios han confirmado la relación directa entre ERC y mortalidad en pacientes con IC. De la base de datos del estudio CHARM (86), se deduce una relación entre diferentes niveles de la tasa de filtrado glomerular y la combinación de mortalidad de origen cardiovascular, así como necesidad de hospitalización por empeoramiento de la IC, tanto en el grupo de pacientes con IC con función sistólica deprimida (FEVI < 40 %) como preservada (FEVI > 40 %), aunque la asociación fue más fuerte en los pacientes con función deprimida. En el conjunto de pacientes incluidos en este estudio, se observó una relación lineal entre la mortalidad cardiovascular, la hospitalización por IC y quintiles de tasa de filtrado glomerular, con un progresivo incremento de la mortalidad desde el grupo con tasa de filtrado glomerular > 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> hasta el grupo con un filtrado estimado < 45 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

La relación firme e independiente de la función renal con el pronóstico, tras ajuste para diversas variables, indica que la función renal es un importante predictor del pronóstico de pacientes con IC, en parte debido a que constituye un indicador de enfermedad vascular aterosclerótica o hipertensiva. Además, podría sugerir que la mejora de la función renal en pacientes con IC e ERC podría ser un indicador de mejoría pronóstica en este grupo de pacientes. Y, desde un punto de vista clínico, la monitorización de la evolución de la función renal podría constituir un buen elemento en el seguimiento de los mismos. Además de la asociación entre la ERC y el riesgo cardiovascular en pacientes con IC, la presencia de ERC se ha identificado como un importante determinante de inestabilización de pacientes con IC con función sistólica preservada. En un análisis realizado en un grupo de mujeres (96), se constató que un deterioro progresivo de la función renal incrementaba de forma proporcional el riesgo de hospitalización por IC descompensada, y la disminución de la función renal fue el determinante decisivo para predecir la necesidad de hospitalizaciones durante el seguimiento. Por lo tanto, la presencia de ERC identificaría a un subgrupo de pacientes con mayor morbilidad y mortalidad cardiovascular, en los que debería llevarse a cabo un riguroso proceso diagnóstico y, salvo contraindicaciones formales, aplicar las estrategias terapéuticas que han demostrado prolongar la vida y reducir las complicaciones, en particular hospitalizaciones.

En conclusión, la IC en pacientes con ERC supone un síndrome complejo que representa un gran reto que llama a profundizar en su conocimiento con urgencia. Hasta

el momento existen algunas contribuciones que han explorado la presencia de fibrosis miocárdica en pacientes en estadio final de su ERC con biomarcadores de colágeno circulantes (97,98), pero no hay información hasta donde hemos sido capaces de revisar en PíCP sérico y CíTP: MMP1 sérico en pacientes con ERC e IC.

# **HIPÓTESIS**

Dado que la ERC facilita la fibrosis miocárdica y la disfunción diastólica y empeora el pronóstico de la IC, parece razonable investigar sobre la influencia de la ERC en la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna en pacientes con fracción de eyección preservada.

Conocemos que aquellos pacientes con CH en estadio C que presentan fibrosis miocárdica maligna (alta cantidad y alto grado de entrecruzamiento) presentan peor evolución clínica, mayor mortalidad y mayor índice de hospitalizaciones. Nuestro trabajo se fundamenta en la hipótesis de que las alteraciones de los marcadores séricos del metabolismo del colágeno tipo I (PICP y C1P:MMP1) tanto de forma individual como combinada junto con su asociación con la disfunción diastólica reflejan el desarrollo de la fibrosis miocárdica maligna en los pacientes hipertensos desde estadios tempranos de IC. Así mismo, la presencia de ERC favorece las alteraciones individuales y combinadas de ambos biomarcadores, y refuerza su asociación con la disfunción diastólica en los pacientes con CH durante la progresión de la IC.



## **OBJETIVOS**

Para verificar esta hipótesis se ha diseñado el presente estudio con los siguientes objetivos:

1. Analizar la evolución del PICP, el cociente CITP: MMP-1 y la combinación de PICP aumentado y cociente CITP: MMP-1 disminuido en pacientes hipertensos con IC-FEP y sin IC.
2. Evaluar la asociación del PICP, el cociente CITP: MMP-1 y la combinación de PICP aumentado y cociente CITP: MMP-1 disminuido con la disfunción diastólica evaluada mediante ecocardiograma en pacientes hipertensos con IC-FEP y sin IC.
3. Identificar si la presencia de ERC se asocia con el PICP, el cociente CITP: MMP-1 y con la combinación de PICP aumentado y cociente CITP : MMP-1 disminuido así como evaluar si la ERC modifica la evolución de los mismos en pacientes hipertensos con IC-FEP y sin IC.
4. Delimitar si la presencia de ERC influencia la posible asociación del PICP, el cociente CITP: MMP-1 y la combinación de PICP aumentado y cociente CITP: MMP-1 disminuido con la disfunción diastólica evaluada mediante ecocardiograma en pacientes hipertensos con IC-FEP y sin IC.

## **Interés**

El interés científico-médico del estudio se fundamenta en dos líneas argumentales:

De un lado tratar de esclarecer el papel de la fibrosis miocárdica en pacientes con HTA desde estadios tempranos de la enfermedad. Acorde con ello se pretende detectar aquellos pacientes con peor pronóstico clínico de manera que pueda proporcionar potenciales dianas terapéuticas que modifiquen el sustrato estructural de las alteraciones de la función ventricular presentes en la CH.

Por otra parte, analizar la posible interacción de la ERC en la progresión de fibrosis miocárdica y en la disfunción diastólica en pacientes hipertensos. De esta manera en la práctica clínica nos permitiría profundizar en la historia natural de la enfermedad, así como monitorizar los efectos derivados de estrategias terapéuticas diseñadas de forma específica o genérica para modificar la fibrosis miocárdica.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. Diseño del estudio

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de la Clínica Universidad de Navarra (Pamplona). Todos los sujetos incluidos fueron informados sobre las características del estudio y firmaron un documento consintiendo en su participación en el mismo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (99). La inclusión, así como los estudios clínicos y ecocardiográficos se llevaron a cabo en la Clínica Universidad de Navarra (Pamplona).

### Población del estudio

El periodo de reclutamiento se desarrolló entre el 9 de octubre de 2014 y el 4 de abril de 2017.

Un total de 411 pacientes diagnosticados de hipertensión arterial crónica fueron reclutados en la Clínica de la Universidad de Navarra. De ellos en 20 pacientes reclutados no se disponía de muestras de sangre y 26 presentaban valores de PICP, CITP o MMP-1 indetectables o por encima del rango (determinado por las curvas estándar respectivas). Por lo tanto, se obtuvieron determinaciones válidas de los biomarcadores de fibrosis miocárdica en 365 pacientes. Estos se dividieron en 2 grupos, según la ausencia de IC (N = 232) o la presencia de IC-FEP (N = 133).

La IC-FEP fue definida como la presencia síntomas o signos de IC (en la actualidad o en el pasado) asociado a valores de FE igual o mayor al 50 %, junto con cardiopatía estructural [definida como la presencia de hipertrofia ventricular izquierda ( $IMVI \geq 115 \text{ g/m}^2$  hombres y  $\geq 95 \text{ g/m}^2$  en mujeres) y/o dilatación de la aurícula izquierda (volumen aurícula izquierda indexado [LAVI]  $>34 \text{ mL/m}^2(100)$ ] y/o disfunción diastólica [definida como la presencia de  $E/e \geq 13$  y la media de la  $e'$  septal y lateral de las paredes del ventrículo izquierdo  $< 9 \text{ cm/s}$  (101)] que también presentaban un valor de NT-proBNP sérico  $\geq 125 \text{ pg/ml}$ .

Los criterios de exclusión del estudio fueron los siguientes tal y como se refleja en el cuadro 4:

- Pacientes con una fracción de eyección menor del 50%, medida mediante el método de Simpson.
- Pacientes EPOC > Gold B
- Pacientes con cardiopatía isquémica o patología valvular severa
- Situaciones asociadas con niveles elevados del PICP en sangre periférica como (74):
  - Hepatopatía crónica.
  - Osteopatía metabólica.
  - Insuficiencia renal crónica en estadio 5 (eGFR <15 mL/min·1.73m<sup>2</sup>)
  - Hipertiroidismo.

**Cuadro 4.** Criterios de inclusión y exclusión

<b>Pacientes sin IC *</b>	<b>Pacientes con ICFEP *</b>
<p><b><i>Criterios de inclusión</i></b></p> <p>Hipertensión arterial esencial + Hipertrofia ventricular izquierda (IMVI <math>\geq 115</math> g/m<sup>2</sup> hombres y <math>\geq 95</math> g/m<sup>2</sup> en mujeres <b>y/o</b> Dilatación de la aurícula izquierda Volumen aurícula izquierda indexado (LAVI) <math>&gt;34</math> mL/m<sup>2</sup> <b>y/o</b> Disfunción diastólica<sup>†</sup></p>	<p><b><i>Criterios de inclusión</i></b></p> <p>Hipertensión arterial esencial + Signos y síntomas clínicos de IC (actuales o previos) + FEVI <math>&gt;50\%</math> + Hipertrofia ventricular izquierda (IMVI <math>\geq 115</math> g/m<sup>2</sup> hombres y <math>\geq 95</math> g/m<sup>2</sup> en mujeres <b>y/o</b> Dilatación de la aurícula izquierda Volumen aurícula izquierda indexado (LAVI) <math>&gt;34</math> mL/m<sup>2</sup> <b>y/o</b> Disfunción diastólica<sup>†</sup> + (NT-proBNP <math>&gt;125</math> pg/mL)</p>
<p><b><i>Criterios de exclusión</i></b></p> <p>FEVI <math>&lt;50\%</math> Signos y síntomas clínicos de IC (actuales o previos) eGFR <math>&lt;30</math> mL/min·1.73m<sup>2</sup> Pacientes EPOC <math>&gt;</math> Gold B Enfermedad hepática, Child-plug <math>\geq 7</math> Pacientes con osteoporosis severa Pacientes infecciosos Enfermedad valvular severa</p>	<p><b><i>Criterios de exclusión</i></b></p> <p>FEVI <math>&lt;50\%</math> eGFR <math>&lt;15</math> mL/min·1.73m<sup>2</sup> Pacientes EPOC <math>&gt;</math> Gold B Enfermedad hepática, Child-plug <math>\geq 7</math> Pacientes con osteoporosis severa Pacientes infecciosos Enfermedad valvular severa</p>

\* Según 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (16).

† Criterios de disfunción diastólica: Se deben cumplir los dos criterios:

- $E/e' \geq 13$
- $E'$  en pared media y septal  $< 9$  cm/s

## 2. Estudios clínicos

### 2.1 Evaluación clínica general

A cada paciente se le realizó una anamnesis y una exploración física completa, así como exámenes complementarios consistentes en: analítica (incluyendo hemograma, bioquímica sanguínea, pruebas de función hepática y renal), y electrocardiograma convencional.

La PAS y PAD se determinó en posición sentada tras la exploración ecocardiográfica (al menos dos medidas con un intervalo de 1 a 2 minutos entre medidas), con un esfigmomanómetro de mercurio. Se definió HTA como PAS  $\geq$  a 140 mmHg y/o PAD  $\geq$  a 90 mmHg y/o necesidad de tratamiento antihipertensivo.

Se definieron las siguientes comorbilidades:

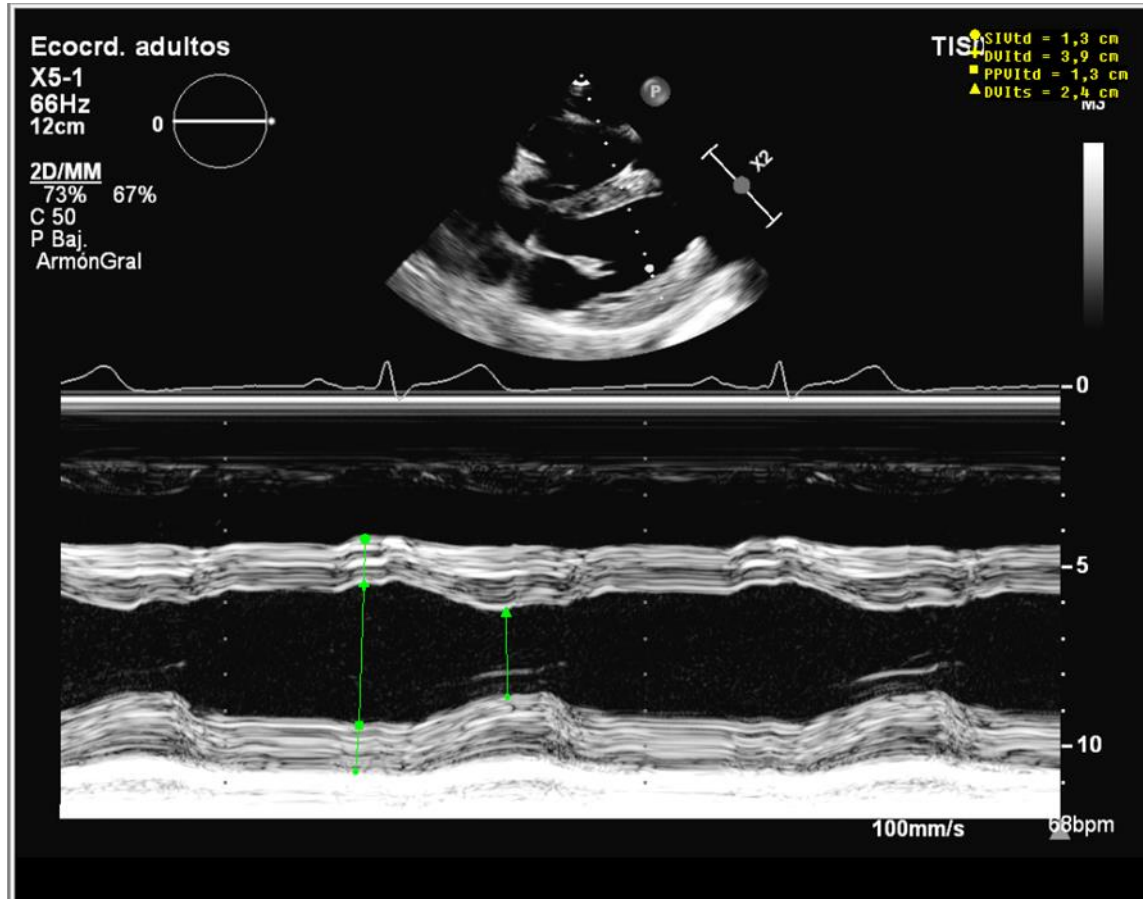
- a) Obesidad: definida como índice de masa corporal  $>30$  kg/m<sup>2</sup>
- b) Dislipemia: colesterol total mayor o igual a 200 mg/dL y/o triglicéridos mayores o igual a 150 mg/dL.
- c) Diabetes tipo 2: diagnosticada clínicamente por un médico, junto con el uso de hipoglucemiantes orales o insulina.
- d) Síndrome de apnea-hipopnea: índice de apnea-hipopnea  $\geq 4,7$ .
- e) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: ratio de volumen espirado forzado tras el broncodilatador en un segundo y la capacidad vital forzada  $< 0,7$ .
- f) Anemia: hemoglobina  $< 13$  g/dL en varones y  $< 12$  g/dL en mujeres.
- g) Insuficiencia renal crónica: filtrado glomerular menor de 60 ml/min /1,73 m<sup>2</sup>.

### 2.2 Estudio ecocardiográfico

La exploración ecocardiográfica se llevó a cabo en todos los pacientes de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Europea de Ecocardiografía (102). Las dimensiones en modo-M del ventrículo izquierdo se obtuvieron a partir del eje largo paraesternal izquierdo. El grosor del septo interventricular (SIV), el diámetro interno del ventrículo izquierdo (DVI) y el grosor de la pared posterior (PP) se recogieron en tele-



diástole (d) a nivel de los músculos papilares, tal y como se muestra en la Figura 8. Los volúmenes tanto tele-diastólicos como tele-sistólicos se recogieron en un plano cuatro cámaras y dos cámaras.



**Figura 8:** Modo M del eje paraesternal largo con las medidas grosor del SIV, DVI y el PP.

### 2.2.1 Índice de función ventricular sistólica

#### *Fracción de eyección*

La FE se calculó como la relación del volumen sistólico y el volumen telediastólico expresado como porcentaje. Estos índices se derivaron según el método de Simpson, según recomiendan las Guías de la Sociedad Europea de Ecocardiografía (103).

### 2.2.2 Morfología del ventrículo izquierdo

#### *Masa de ventrículo izquierdo*

Como parámetros de masa se midieron la masa del ventrículo izquierdo (MVI) y el grosor relativo de pared (GPR). La MVI se calculó con la fórmula de Cube según la cual:

$$\text{MVI} = 0,8 \times 1,04 \times [(\text{SIV} \times \text{PP} \times \text{DVI})^3 - (\text{DVI})^3] + 0,6 \text{ g. (102)}$$

La MVI indexada se obtuvo dividiendo la MVI por la superficie corporal. El GPR se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{GPR} = (2 \times \text{PP}) / (\text{DVI}).$$

La presencia de hipertrofia de VI (HVI) se estableció según las Guías Europeas de Ecocardiografía en las cuales definen valores iguales o mayores de 115g/m<sup>2</sup> para varones y valores mayores o iguales de 95 g/m<sup>2</sup> para mujeres. Según el GPR se definirá la hipertrofia de manera que aquellos menores de 0,42 son excéntrica y mayor o igual a 0,42 es concéntrica (100).

### 2.2.3 Índices de función ventricular diastólica

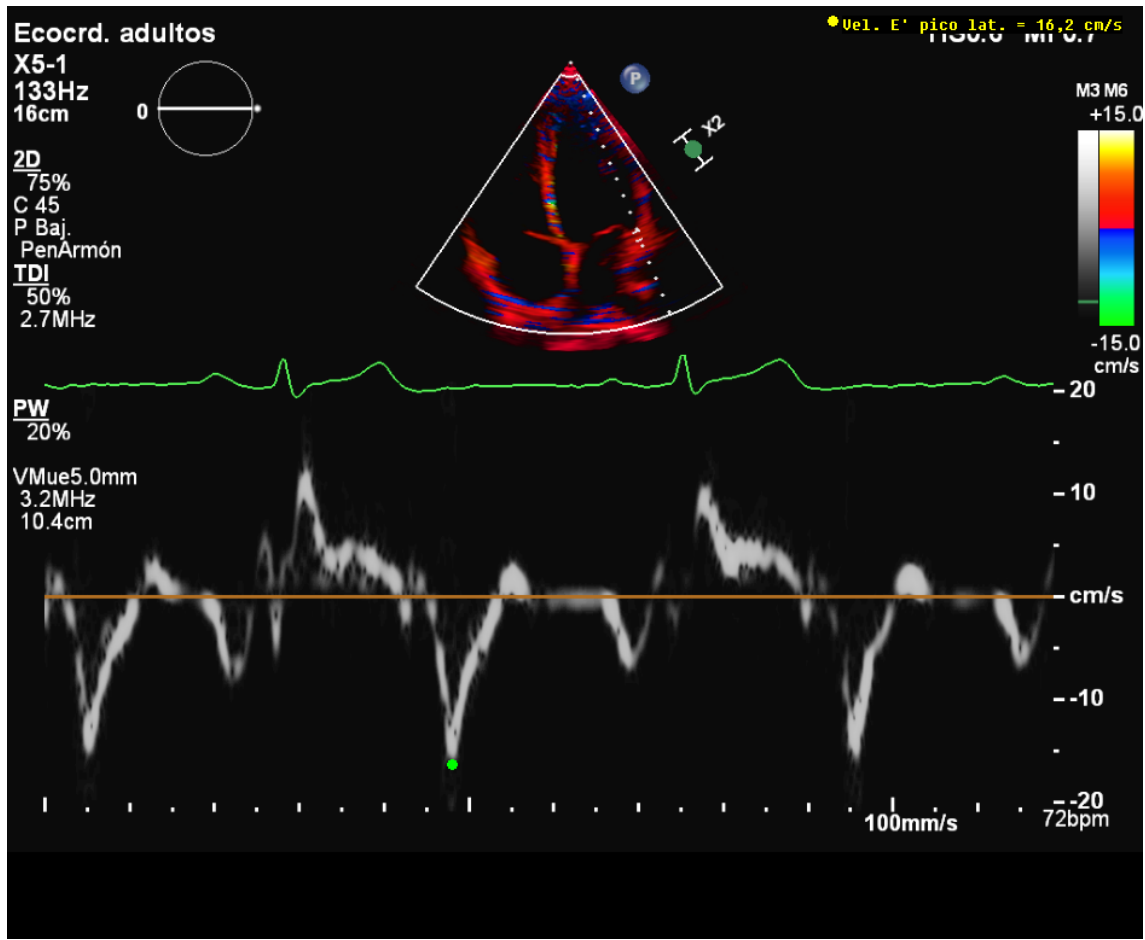
El flujo diastólico mitral se evaluó con el transductor en la ventana apical, en el plano de cuatro cámaras, con el volumen muestra posicionado a nivel de los bordes libres de la válvula mitral (Figuras 9, 10 y 11). Las siguientes medidas Doppler se obtuvieron para evaluar la función ventricular diastólica del ventrículo izquierdo:

- Onda E o la velocidad máxima del flujo transvalvular mitral precoz (E).
- Onda A o la velocidad máxima del flujo transvalvular mitral tardío (A).
- El tiempo de deceleración de la onda de llenado ventricular precoz (TD).
- El tiempo de relajación isovolumétrica: representa la fase más precoz de la diástole y se define como el tiempo desde el cierre de la válvula aórtica (representado por el cese del flujo sistólico en el tracto de salida del ventrículo izquierdo) hasta la apertura de la válvula mitral (representada como el inicio de la onda E o precoz del llenado ventricular) (TRIV).

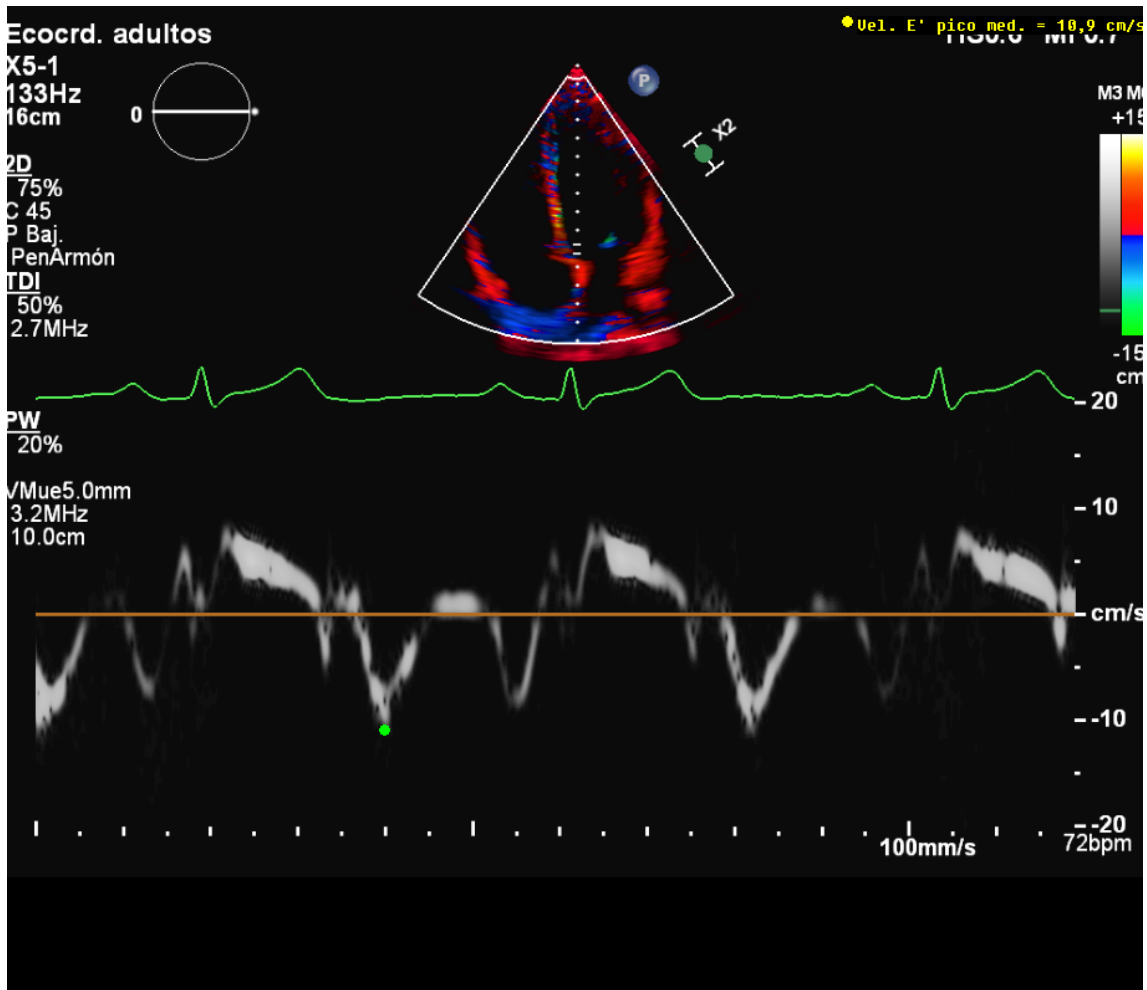
- El cociente de las ondas E/A que refleja cómo se produce el llenado rápido inicial del VI.
- El e' lateral es la velocidad máxima del anillo mitral durante la diástole, adquirida a 1 cm del nivel del anillo mitral lateral en los planos apicales.
- El e' medial es la velocidad máxima del anillo mitral durante la diástole, adquirida a 1 cm del nivel del anillo mitral medial en los planos apicales.
- El E/e' que es la velocidad de flujo mitral E sobre la media de e' medial y lateral de Doppler tisular.



**Figura 9:** Doppler continuo donde se mide E; A; TD y pendiente de deceleración del flujo mitral.



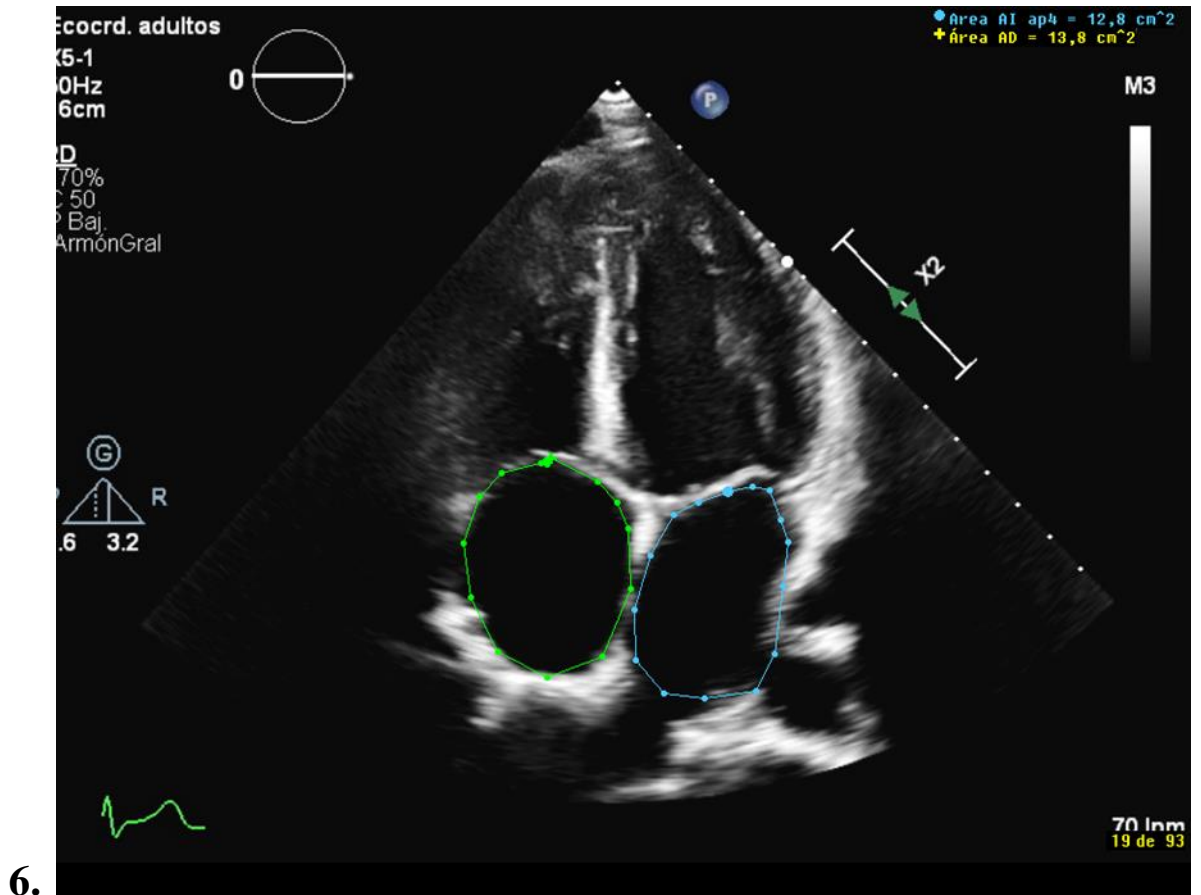
**Figura 10:** Medida de la e' lateral en Doppler tisular sobre anillo mitral lateral



**Figura 11:** Medida de la e' medial, en Doppler tisular sobre anillo mitral medial

### 2.2.4 Volumen de aurícula izquierda

Se calculó el volumen de aurícula izquierda como volumen en cuatro cámaras (Figura 12). Se indexó dividiendo el volumen entre la superficie corporal.



**Figura 12:** Volumen de aurícula izquierda (azul) y aurícula derecha (verde) en plano apical 4 cámaras

### **3. Estudios bioquímicos**

#### **3.1 Obtención y procesado de muestras**

Para determinar los distintos parámetros séricos se extrajeron muestras de sangre en ayunas, de la vena antecubital el mismo día de la realización del ecocardiograma. Las muestras se centrifugaron a 4°C y 2500 rpm durante 15 minutos, para la obtención del suero, y a 4 C y 3000 rpm durante 10 minutos, para la obtención del plasma. Tanto el suero, como el plasma se conservaron a -20°C.

#### **3.2 Determinación de las concentraciones en sangre de los péptidos y moléculas implicadas en el metabolismo del colágeno tipo I**

##### **3.2.1 Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP)**

La concentración sérica del PICP se determinó mediante técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), con el ensayo comercial de EIA MicroVue CICP (Quidel corporation, San Diego, CA, USA) en el laboratorio del Área de Fisiopatología Cardiovascular de Centro de Investigación Médica Aplicada. Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron del 12% y 8,1% respectivamente. La sensibilidad (límite inferior de detección) fue de 0,2 ng/ml.

##### **3.2.2 Telopéptido del colágeno tipo I (CITP)**

La concentración sérica del CITP se determinó mediante técnica de ELISA, con el ensayo comercial de ORION (Orion Diagnóstica, Espoo, Finlandia) en el laboratorio del Área de Fisiopatología Cardiovascular de Centro de Investigación Médica Aplicada. Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo fueron 10,3% y 8,8% respectivamente. El límite inferior de detección de 0,3 pg/ml de CITP.

### **3.2.3 Metaloproteinasa de matriz tipo I (MMP-1)**

La concentración de MMP-1 total se determinó mediante la técnica de ELISA de captura descrita por Zhang et al. (104), con un anticuerpo monoclonal específico para la MMP-1 humana, en las muestras de plasma de cada uno de los pacientes del estudio. Dicho ELISA es comercial y se distribuye por la compañía AlphaLISA (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo fueron 12,5% y 4% respectivamente. El límite de detección inferior de 82,6 pg/ml de MMP1.

### **3.2.4 Cociente del telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I y metaloproteinasa de matriz tipo I (CITP: MMP-1)**

La razón entre las concentraciones totales CITP Y MMP-1 en plasma (expresado en molaridad), se empleó como índice del balance entre la CITP y MMP-1, y por lo tanto como un indicador indirecto de la actividad de la MMP-1.

### **3.2.5 NT-proBNP**

La concentración del fragmento amino-terminal del pro-péptido natriurético cerebral (NT-proBNP), se midió en plasma mediante la técnica de ELISA descrita por Karl et al (105), con el ensayo comercial de la compañía Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo fueron menores al 10%. El límite de detección inferior de 5 pg/ml de NT- proBNP.



### 3.3 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas continuas se expresaron como media aritmética  $\pm$  error estándar, ó mediana (rango intercuartílico) y las variables categóricas como números y porcentajes. La presencia de la combinación de biomarcadores consistente en alto PICP y bajo ratio CITP:MMP1 fue determinada usando los valores de referencia previamente publicados (79) y las medianas de nuestra población. La normalidad se demostró con el test de Shapiro-Wilks ó Kolmogorov-Smirnov. Las variables que no cumplían la normalidad se estudiaron tras transformación logarítmica. Las diferencias entre dos grupos de sujetos se evaluaron aplicando el test de t de Student para variables distribuidas normalmente o mediante el test de U de Mann-Whitney en caso de no normalidad (Las variables que no cumplen normalidad son los biomarcadores que presentaban una asimetría positiva muy marcada. Las distribuciones se normalizaron tras aplicar la transformación logarítmica, y las diferencias en los biomarcadores entre grupos se analizaron con los datos log-transformados). Las comparaciones entre más de dos grupos de pacientes se realizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Fisher en presencia de normalidad, en caso de no normalidad se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por comparaciones dos a dos mediante el test de U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se compararon mediante el test de  $\chi^2$ . El modelo de regresión multivariable logístico (siendo la variable dependiente la combinación de biomarcadores) se utilizó para estudiar la asociación independiente de la presencia de comorbilidades con la presencia o ausencia de la combinación de los biomarcadores tras el ajuste por covariables relevantes identificadas mediante un proceso de eliminación “hacia atrás” (Backward Stepwise Regression) con el criterio de información de Akaike. La calibración de los modelos de regresión logística se evaluó mediante el test de bondad de ajuste de Homer-Lemeshow.

Para determinar si la asociación entre IC-FEP y la combinación de biomarcadores variaba con la presencia o ausencia de ERC, se llevó a cabo un análisis de interacción mediante un análisis de regresión logística con un modelo que incluía la combinación de biomarcadores (si/no), definiendo la combinación de marcadores como PICP alto y CITP bajo, como variable dependiente y la presencia de ERC ( si/no), de IC-FEP ( si/no) y el término del producto de ambas variables predictoras como factores independientes.

Se realizó un modelo de regresión lineal multivariable para evaluar la asociación entre la combinación de biomarcadores y el cociente de E/e', ajustando por las covariables significativas en los análisis univariados ( $p < 0,05$  en todos los pacientes con ERC y se utilizó  $p < 0,1$  en pacientes con ERC con IC-FEP para incluir en el modelo multivariable la variable "varón" con una  $p = 0,005$ ). La asunción de normalidad de los residuales fue comprobada con el test de Kolmogorov-Smirnov y un análisis de gráfico P-P. La evidencia de multicolinealidad en una variable predictora fue identificada cuando el factor de inflación de la varianza era superior a 2 ó cuando la tolerancia era inferior a 0,50. Si alguna variable mostraba evidencia de multicolinealidad era eliminada del modelo. Los valores del cociente E:e' se compararon entre los pacientes clasificados en cuatro grupos, según la presencia o ausencia de IC-FEP y de la combinación de biomarcadores por separado para pacientes con y sin ERC, mediante un análisis de la varianza ajustado por edad y sexo.

La significación estadística se definió como un valor de  $p < 0.05$  en pruebas bilaterales. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando los paquetes estadísticos SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y STATA (versión 12.1, Stata corp, College Station TX, USA).

## **RESULTADOS**

## **1. Hallazgo en los pacientes clasificados según la ausencia de IC o la presencia de IC-FEP**

En primer lugar, estudiamos las características basales de los pacientes de nuestra muestra según la presencia o ausencia de insuficiencia cardiaca.

### **1.1 Características demográficas**

Las características basales de la población se presentan en la Tabla 2. Comparando con el grupo sin IC, el grupo de pacientes con IC-FEP presentaban menor proporción de hombres, una población de mayor edad, y mayor proporción de enfermedad cerebrovascular y de fibrilación auricular.

**Tabla 2.** Características basales de la muestra poblacional según la presencia o ausencia de IC-FEP.

	Sin IC (N=232)	IC-FEP (N=133)	Valor P
Edad, años	62,3 ± 9,7	74,0 ± 7,7	<0,001
Varón, n (%)	169 (72,8)	43 (32,3)	<0,001
IMC, kg/m <sup>2</sup>	29,2 ± 4,6	29,1 ± 4,2	0,90
PAS, mmHg	135 ± 18,3	136 ± 20,3	0,58
PAD, mmHg	81,8 ± 10,4	74,9 ± 12,0	<0,001
PAM, mmHg	99,4 ± 11,5	95,2 ± 13,5	<b>0,003</b>
FC, latidos/min	66,5 ± 11,3	68,9 ± 14,9	0,12
<i>Historia cardiovascular previa, n (%)</i>			
Hospitalizado en los últimos 12 meses	0 (0,0)	46 (34,3)	
Enfermedad arterial periférica	2 (0,9)	5 (3,8)	0,10
Enfermedad cerebrovascular	2 (0,9)	9 (6,8)	<b>0,002</b>
Valvulopatías	1 (0,4)	1 (0,8)	0,69
Fibrilación auricular	8 (3,4)	48 (36,1)	<0,001
Clasificación NYHA			
I		29 (21,8)	
II		70 (52,6)	
III		34 (25,6)	

Las variables cuantitativas están expresadas como media ± desviación estándar. Las variables categóricas están expresadas como número (porcentajes). IMC = índice de masa corporal; PAS = tensión arterial sistólica; PAD = tensión arterial diastólica; PAM = tensión arterial media; FC = frecuencia cardíaca; NYHA = New York Heart Association

En relación a la prevalencia de comorbilidades (Tabla 3), los pacientes con IC-FEP presentaban mayor prevalencia de insuficiencia renal crónica respecto a los pacientes sin IC. Así mismo, presentaban mayor tasa de dislipemia y síndrome de apnea obstructiva del sueño.

**Tabla 3.** Diferentes comorbilidades documentadas de la muestra poblacional según la presencia o ausencia de IC-FEP.

	<b>Sin IC</b> <b>(N=232)</b>	<b>IC-FEP</b> <b>(N=133)</b>	<b>Valor</b> <b>P</b>
Obesidad, n (%)	92 (39,7)	51 (38,3)	0,81
Dislipemia, n (%)	110 (47,4)	87 (65,4)	<b>0,001</b>
Diabetes, n (%)	33 (14,2)	21 (15,8)	0,69
SAOS, n (%)	7 (3,0)	11 (8,3)	<b>0,041</b>
EPOC, n (%)	0 (0,0)	8 (6,0)	
Anemia, n (%)	14 (6,0)	23 (17,3)	<b>0,001</b>
ERC, n (%)	81 (34,9)	61 (45,9)	<b>0,039</b>

*Las variables categóricas están expresadas como número (porcentajes). SAOS = síndrome de apnea obstructiva del sueño; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC = enfermedad renal crónica.*

En cuanto al tratamiento, reflejado en la Tabla 4, se objetiva que los pacientes con IC-FEP recibían mayor cantidad de medicación (tanto de betabloqueantes como de IECAs /ARAII, diuréticos y antagonistas de la aldosterona).

**Tabla 4.** Relación de las pautas de tratamiento de la muestra poblacional según la presencia o ausencia de IC-FEP.

	Sin IC (N=232)	IC-FEP (N=133)	Valor P
Tratamiento, n (%)			
Betabloqueantes	40 (17,2)	101 (75,9)	<0,001
IECA/ARA II	164 (70,7)	106 (79,7)	0,06
Diuréticos	87 (37,5)	100 (75,2)	<0,001
Antagonistas de la aldosterona	9 (3,9)	50 (37,6)	<0,001
Antidiabéticos	35 (15,1)	25 (18,8)	0,36

Las variables categóricas están expresadas como número (porcentajes). IECA = inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II = antagonista del receptor de la angiotensina II

### Parámetros ecocardiográficos

Las características ecocardiográficas de los pacientes hipertensos agrupados de acuerdo con la ausencia o presencia de insuficiencia cardiaca se resumen en la Tabla 5.

Comparando con los pacientes sin IC, los pacientes con IC-FEP presentaban mayor porcentaje de hipertrofia de VI y mayor GRP tanto de manera cuantitativa como porcentual. Todo esto refleja que los pacientes con IC-FEP presentaban una mayor hipertrofia del VI y que ésta se distribuía de manera concéntrica. Como consecuencia, respecto a las dimensiones del VI, se objetivó que disminuía el volumen tele-diastólico del VI en pacientes con IC-FEP y lo mismo sucedía con el volumen tele-sistólico ante la presencia de IC-FEP en estos pacientes.

Tal y como se muestra en la Tabla 5, la FE presentaba un aumento en los pacientes con IC-FEP, sabiendo que un criterio de exclusión era el presentar una fracción de eyección reducida, todos ellos mostraban una FE mayor de 50%.

Tal como se esperaba en comparación con el grupo sin IC, los pacientes con IC-FEP presentaban un aumento del volumen auricular indexado y del cociente E:e'. El

tiempo de deceleración presentaba una tendencia a aumentar ante la presencia de IC, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,22$ ).

**Tabla 5.** Parámetros ecocardiográficos de la muestra poblacional incluida a estudio según la presencia o ausencia de IC-FEP.

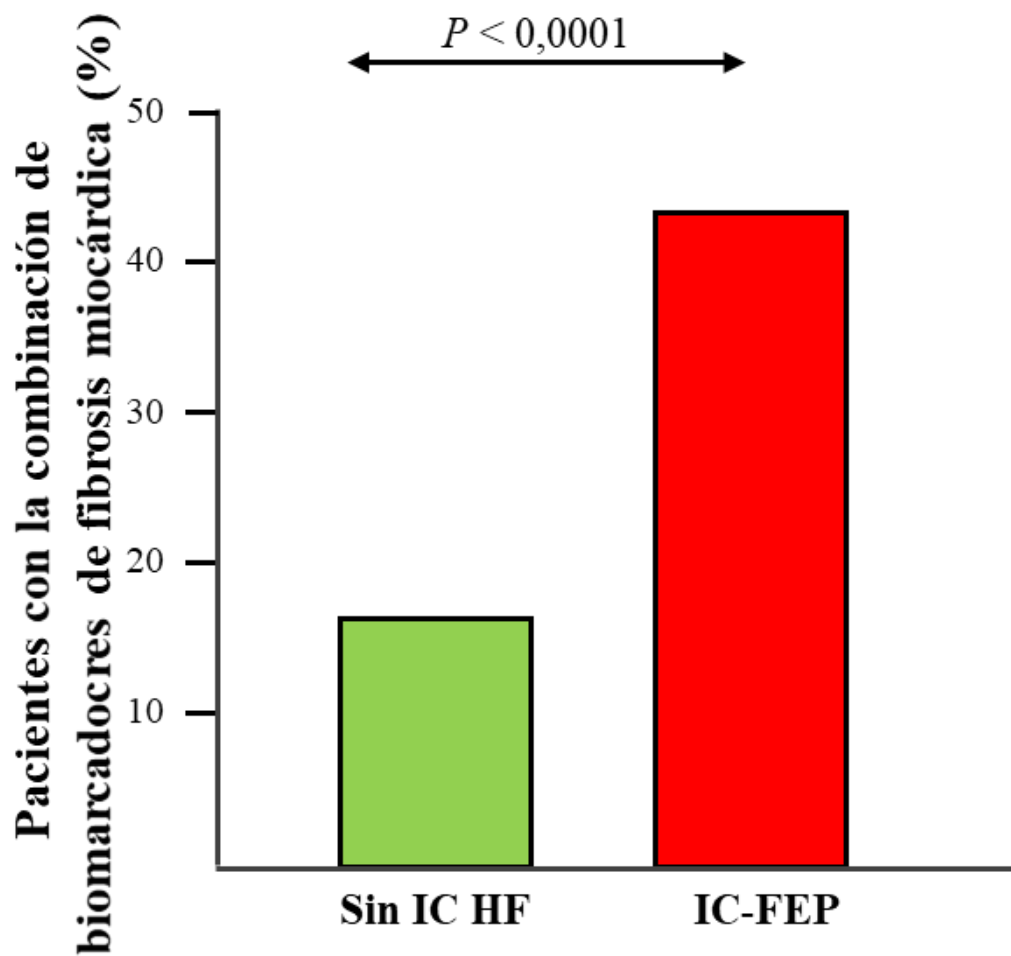
	Sin IC (N=232)	IC-FEP (N=133)	Valor P
<b>Parámetros ecocardiográficos</b>			
<b>Morfología del VI</b>			
MVli, g/m <sup>2</sup>	112 ± 30,7	119 ± 30,1	0,056
HVI, n (%)	114 (48,9)	93 (69,9)	<0,001
GRP	0,41 ± 0,08	0,47 ± 0,10	<0,001
GRP>0.45, n (%)	60 (25,9)	73 (54,9)	<0,001
VTDVI i, ml/m <sup>2</sup>	58,3 ± 19,9	40,1 ± 13,4	<0,001
VTSVI i, ml/m <sup>2</sup>	21,1 ± 8,6	14,2 ± 7,2	<0,001
<b>Función del VI</b>			
Onda E, cm/s	69,5 ± 15,9	82,8 ± 25,4	<0,001
E:A ratio	0,89 ± 0,23	0,95 ± 0,44	0,51
TD, ms	219 ± 67,4	228 ± 65,3	0,22
e' medial, cm/s	9,2 ± 2,6	7,1 ± 2,1	<0,001
E:e' ratio	8,0 ± 2,7	13,3 ± 4,3	<0,001
E: e' ratio >15, n (%)	3 (1,3)	37 (27,8)	<0,001
FEVI, %	63,6 ± 6,3	67,4 ± 8,2	<0,001
<b>Morfología de la AI</b>			
Vol AI i, ml/m <sup>2</sup>	25,4 ± 7,0	33,5 ± 12,5	<0,001
Vol AI i >34 ml/m <sup>2</sup> , n (%)	24 (10,3)	56 (42,1)	<0,001

Las variables cuantitativas están expresadas como media ± desviación estándar. Las variables categóricas están expresadas como número (porcentajes). VI= Ventrículo izquierdo; MVli = masa de ventrículo izquierdo indexada ; GRP = grosor relativo de pared; VTDVI i=volumen telediastólico de ventrículo izquierdo mediante el método de Simpson; VTSVI i= volumen telesistólico de ventrículo izquierdo mediante el método de Simpson; HVI = hipertrofia de ventrículo izquierdo; E' = pico precoz de velocidad de flujo transmitral; TD = tiempo de deceleración; FEVI = fracción de eyección de ventrículo izquierdo.; AI = Aurícula izquierda; Vol AI i = volumen indexado de aurícula izquierda;



### 1.3 Parámetros analíticos

Los valores de PICP fueron más elevados y el ratio de CITP:MMP1 más bajo en los pacientes con IC-FEP respecto a los pacientes sin IC. Cuando la presencia de la combinación de biomarcadores, definida según los puntos de corte previamente publicados (79) consistentes en alto PICP ( $\geq 111$  ng/mL) y bajo ratio CITP: MMP1 ( $\leq 1,97$ ) fue determinada, la frecuencia de pacientes que mostraban elevada esta combinación fue mayor ( $p < 0,001$ ) en el grupo con IC-FEP (10,5%) respecto al grupo sin IC (0,4%). No obstante, ya que la combinación previamente definida solo se encontraba presente en un paciente con IC-FEP, se realizaron análisis posteriores tomando como punto de corte la mediana de los biomarcadores. De esta manera tal como se muestra en la Figura 13 la frecuencia de paciente en los que se objetivó la combinación de PICP elevado ( $\geq 70,4$  ng/mL, siendo esta la mediana) y bajo ratio CITP:MMP-1 ( $\leq 3,58$ , siendo esta la mediana) fue mayor ( $p < 0,001$ ) en el grupo con IC-FEP (43,6%) que en el grupo sin IC (16,4%). En la Tabla 6 se resumen todos los parámetros analíticos comparando los pacientes sin IC y con IC-FEP.



*IC= insuficiencia cardíaca; IC-FEP = insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada;*

**Figura 13:** Pacientes con la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica categorizados en función de la presencia de insuficiencia cardíaca.

**Tabla 6.** Parámetros bioquímicos documentados en la muestra poblacional según la presencia o ausencia de IC-FEP.

	Sin IC (N=232)	IC-FEP N=133)	Valor P
eFG, ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	76,9 ± 21,5	62,7 ± 18,9	<0,001
Hemoglobina, g/dL	14,8 ± 1,4	13,2 ± 1,6	<0,001
NT-proBNP, pg/mL		332 (191-782)	
PICP, ng/mL	61,1 (50,2-79,5)	91,0 (70,6-108)	<0,001
CITP: MMP-1 ratio	4,0 (2,3-6,6)	3,0 (1,5-5,0)	<0,001

Las variables cuantitativas están expresadas como media ± desviación estándar. eFG Calculado como =  $175 \times \text{creatinina sérica} - 1.154 \times \text{edad} - 0.203 \times 0.742$  si mujer; NT-proBNP = N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PICP: Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I; CITP = Telopéptido del colágeno tipo I; MMP- 1 = Metaloproteinasa de matriz tipo I

## 1.4 Análisis de asociaciones

Tal y como se muestra en la Tabla 7, la combinación de biomarcadores que definen la fibrosis miocárdica maligna mostró una asociación directa con la edad y sexo de los pacientes. Con respecto a las comorbilidades, la combinación de biomarcadores se asoció con la presencia de dislipidemia, anemia y presencia de enfermedad renal crónica.

Respecto a la historia previa del paciente, se objetivó una asociación fuerte respecto al hecho de haber presentado una hospitalización en los 12 meses previos. También se observó una asociación con la enfermedad cardiovascular y la presencia de fibrilación auricular tal como se muestra en la Tabla 7. Se objetivó así mismo una asociación con la clase funcional según la NYHA.

Se analizó la asociación con el tratamiento (Tabla 7) que los pacientes estaban recibiendo en el momento del reclutamiento de manera que se objetivó una asociación con los betabloqueantes (p= 0,001), los diuréticos (p=0,011) y los antagonistas de la aldosterona (p= 0,003). No se objetivó una asociación estadísticamente significativa con la administración de IECA/ARAII o los antidiabéticos.

Tras estos resultados, teniendo en cuenta todas las asociaciones univariadas significativas, se realizó un modelo basal de regresión multivariable que incluyó las variables edad, sexo, enfermedad cerebrovascular, fibrilación auricular, clase de la NYHA, dislipemia, ERC, anemia y tratamiento con antagonistas de la aldosterona identificadas mediante un proceso de eliminación “hacia atrás” (Backward Stepwise Regression). El análisis multivariable mostró que la asociación de la combinación de biomarcadores con la anemia y la ERC eran independientes de las otras co-variables mencionadas previamente.

Respecto al análisis de Backward Stepwise Regression, el modelo que se presenta en el análisis multivariable de la tabla 7 es el modelo final tras introducir todas las variables (todas las que eran  $p < 0.05$  en univariante) e ir eliminando las variables con  $p$  más elevada, sucesivamente, teniendo en cuenta el AIC hasta obtener un número de variables adecuado para la  $n$  del evento con menor representación en la variable dependiente. En el modelo que contenía todas las variables, la variable betabloqueantes es la primera que se elimina por presentar el valor de  $p$  más elevado, seguida por hospitalización previa por IC y tratamiento con diuréticos, en todos los casos con reducción del AIC. El modelo final contiene el resto de las variables significativas en los análisis univariantes de tal manera que al haber 96 pacientes en el grupo 1 de la variable dependiente (presencia de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica), ósea en el evento con menor representación, tenemos un ratio 1/10 de número de casos respecto a número de predictores.

**Tabla 7.** Análisis de regresión para la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica

	Análisis Univariable		Análisis Multivariable	
	OR (95% IC)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)	Valor <i>P</i>
Edad, años	1,04 (1,02 a 1,07)	<b>0,001</b>	1,01 (0,98 a 1,04)	0,48
Varón, n (%)	0,48 (0,30 a 0,77)	<b>0,002</b>	0,64 (0,37 to 1,11)	0,11
IMC, kg/m <sup>2</sup>	0,95 (0,90 a 1,00)	0,07		
TAS, mmHg	1,00 (0,99 a 1,01)	0,96		
TAD, mmHg	0,98 (0,96 a 1,00)	0,06		
TAM, mmHg	0,99 (0,97 a 1,01)	0,25		
FC, latidos/min	0,99 (0,97 a 1,01)	0,24		
eFG, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	0,98 (0,97 a 0,99)	<b>0,001</b>		
Hemoglobina, g/dL	0,75 (0,65 a 0,87)	<b>0,0002</b>		
Historia cardiovascular previa, n (%)				
Hospitalización en últimos 12 meses	2,46 (1,30 a 4,65)	<b>0,006</b>		
Enfermedad cerebrovascular	3,52 (1,05 a 11,8)	<b>0,042</b>	1,97 (0,51 a 7,54)	0,32
Fibrilación auricular	2,45 (1,36 a 4,44)	<b>0,003</b>	1,46 (0,75 a 2,86)	0,27
NYHA (II-III)	2,86 (1,74 a 4,69)	<b>&lt;0,0001</b>	1,43 (0,74 a 2,78)	0,29
Co-morbilidades, n (%)				
Obesidad	0,71 (0,44 a 1,16)	0,17		
Dislipemia	1,81 (1,12 a 2,93)	<b>0,016</b>	1,45 (0,85 a 2,48)	0,17
Diabetes	0,77 (0,39 a 1,54)	0,46		
SAOS	2,35 (0,90 a 6,15)	0,08		
EPOC	2,88 (0,71 a 11,8)	0,14		
Anemia	2,68 (1,34 a 5,36)	<b>0,005</b>	2,24 (1,04 a 4,81)	<b>0,039</b>

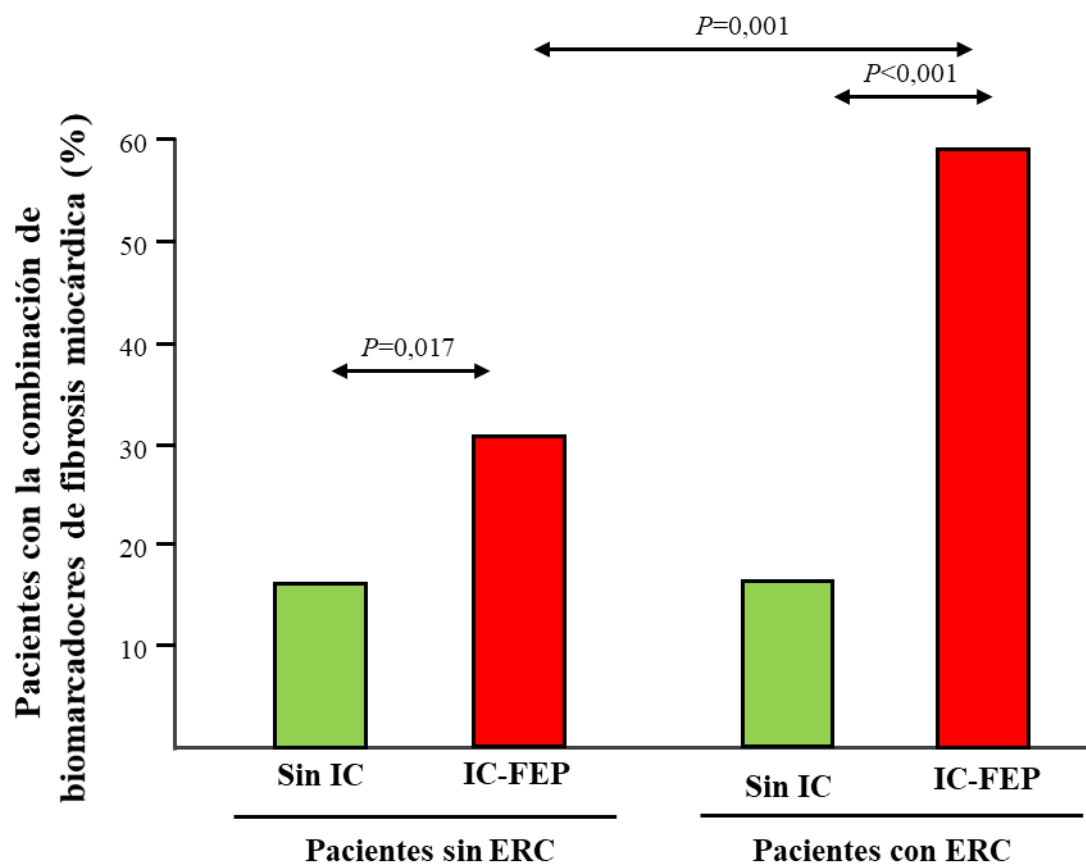
ERC	1,97 (1,23 a 3,17)	<b>0,005</b>	1,87 (1,11 a 3,15)	<b>0,018</b>
<i>Tratamientos, n (%)</i>				
Betabloqueantes	2,25 (1,40 a 3,62)	<b>0,001</b>		
IECA/ARAII	1,25 (0,73 a 2,16)	0,42		
Diuréticos	1,86 (1,16 a 3,00)	<b>0,011</b>		
Antagonistas de la aldosterona	2,43 (1,36 a 4,35)	<b>0,003</b>	1,52 (0,76 a 3,02)	<b>0,24</b>
Antidiabéticos	0,74 (0,38 a 1,44)	0,37		

OR = odds ratio; IMC = índice de masa corporal; TAS = tensión arterial sistólica; TAD = tensión arterial diastólica; TAM = tensión arterial media; FC = frecuencia cardíaca; eFG Calculado como =  $175 \times \text{creatinina sérica} - 1.154 \times \text{edad} - 0.203 \times 0.742$  si mujer; NYHA = New York Heart Association. IECA = inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II = antagonista del receptor de la angiotensina II; OR = odds ratio. SAOS = síndrome de apnea obstructiva del sueño; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC = enfermedad renal crónica; OR = odds ratio

Dado que la ERC y la anemia estaban asociadas de manera independiente con la combinación de alto PICP y bajo ratio de CITP: MMP-1 y este muestra una mayor prevalencia en pacientes con IC-FEP, se estudió si la asociación de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica con los pacientes de IC-FEP pudieran estar influenciados por la presencia de estas dos comorbilidades.

Los análisis de interacción incluyendo la combinación de alto PICP y bajo CITP: MMP -1 ratio (si/no) como variables dependientes, y la presencia de ERC (si/no), presencia de IC-FEP (si/no) y su interacción como variables factor mostraron que la asociación entre IC-FEP y la combinación de alto PICP y bajo CITP/MPP -1 ratio en pacientes con IC-FEP está aumentada por la presencia de ERC (p de interacción < 0,019). De hecho, mientras que la combinación de los biomarcadores estaba presente en un 30,6% de los pacientes con IC-FEC pero sin ERC (en comparación con un 16,% en los pacientes sin IC ni ERC), su prevalencia aumentaba hasta alcanzar un 59% en los pacientes con IC-FEP y ERC (en comparación con un 16% en los pacientes sin IC pero sí ERC) tal como se muestra en la Figura 14.

El análisis de interacción para la anemia fue no significativo (p de interacción = 0,18). Los análisis de interacción con factores demográficos y otras comorbilidades no mostraron interacciones significativas (p > 0,05).



IC= insuficiencia cardíaca; IC-FEP = insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada; ERC = enfermedad renal crónica

**Figura 14:** Representación de los pacientes con la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica con y sin ERC clasificados en subgrupos según la presencia o ausencia de IC.

## **2. Hallazgos en pacientes clasificados según la presencia o ausencia de ERC y subcategorizados según la ausencia de IC o la presencia de IC-FEP**

Los parámetros clínicos, ecocardiográficos y bioquímicos de los 4 subgrupos se presentan en la Tabla 8.

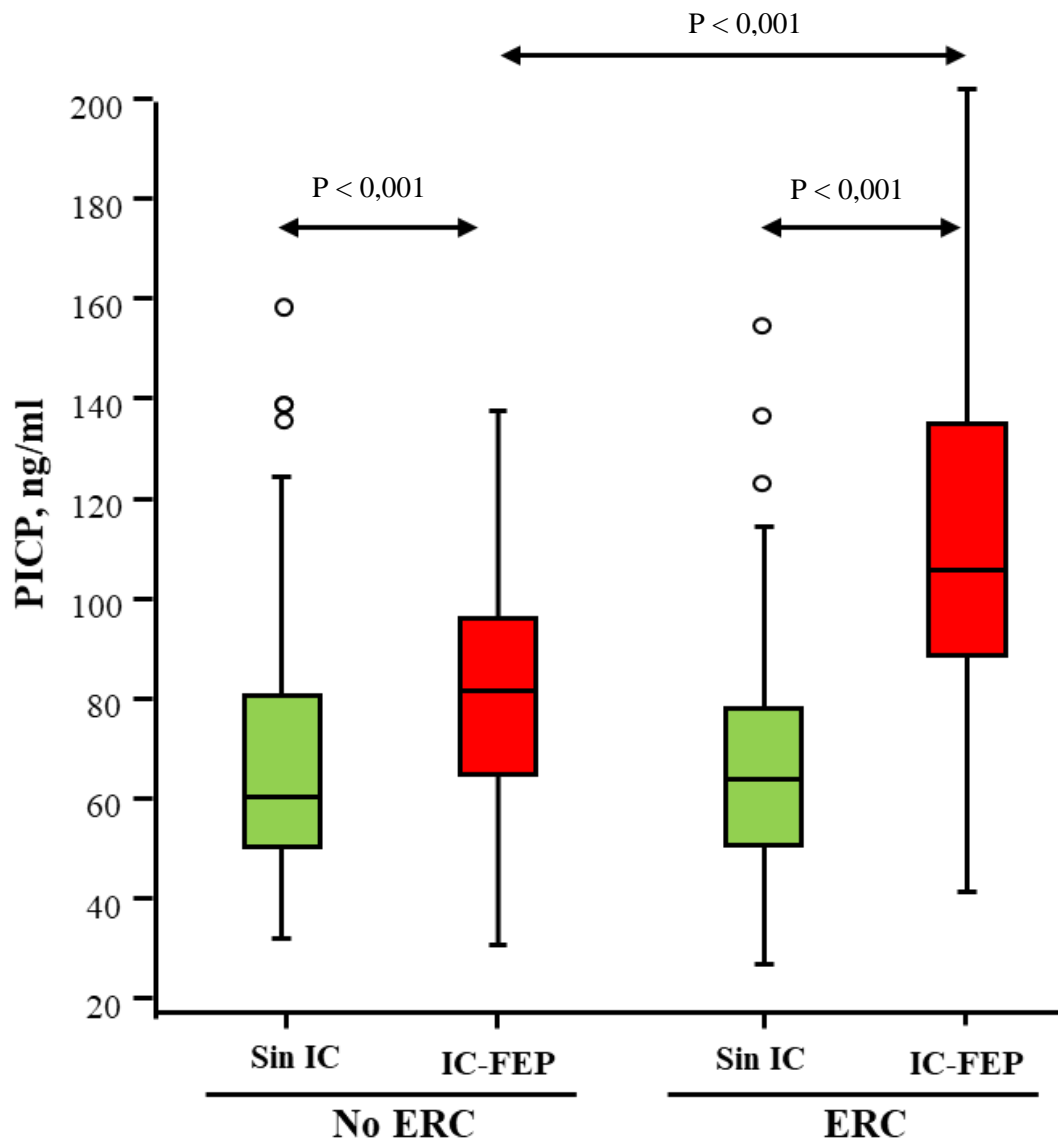
Respecto a las comorbilidades en ambos grupos (con o sin ERC, subclasificados según la ausencia o presencia de IC) sólo se objetivó una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con IC-FEP tanto con y sin ERC comparados con los pacientes sin IC en relación con la presencia de dislipemia ( $p=0,026$ ). Se objetivó así mismo diferencias en los pacientes con ERC: en comparación con los pacientes sin IC, los pacientes con IC-FEP presentaban de manera significativa mayor diabetes y anemia.

Analizando el tratamiento que recibían los pacientes se objetivó mayor proporción de diuréticos de manera significativa entre los pacientes con IC-FEP comparados con los pacientes sin IC ( $p=0,039$ ), sin documentarse otra diferencia entre el resto de tratamiento resumido en la Tabla 7.

Los valores del ratio E:e' y volumen de AI eran más altos en los pacientes con IC-FEP comparados con los pacientes sin IC independientemente de la presencia o ausencia de ERC, reflejado en la Tabla 8. De manera notoria, el aumento tanto del ratio de E:e' como del volumen de la AI era mayor en pacientes con ERC e IC-FEP en comparación con pacientes sin ERC e IC-FEP ( $p$  de interacción  $\leq 0,05$ ).

En relación a los parámetros bioquímicos los pacientes con IC-FEP independientemente de la presencia o ausencia de ERC presentaban significativamente peor filtrado glomerular ( $p < 0,001$ ) tal como se refleja en la Tabla 8. También se objetivó una diferencia significativa entre pacientes con IC-FEP comparados con los pacientes sin IC con respecto a los valores de NT pro-BNP ( $p = 0,029$ ) entre los pacientes sin ERC y con ERC. Los valores de PICP estaban aumentados en pacientes con IC-FEP en comparación con los pacientes sin IC, independientemente de la presencia o ausencia de ERC. Así mismo, el PICP era de media mayor en pacientes con ERC con IC-FEP en comparación con los pacientes si ERC con IC-FEP (Tabla 8 y Figura 15).

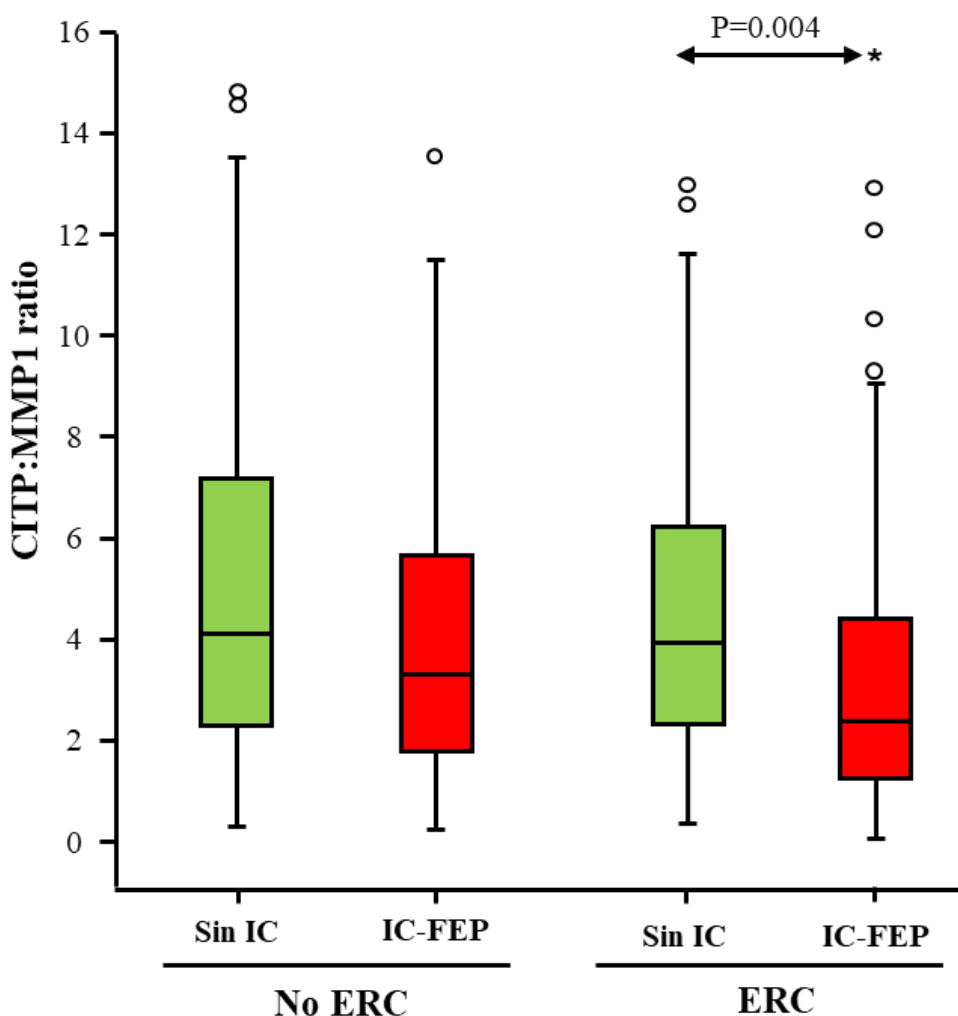




*PICP = propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I; IC-FEP = insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada; ERC = enfermedad renal crónica*

**Figura 15:** Valores de PICP según la presencia o ausencia de ERC y subcategorizados según presencia o ausencia de IC.

No se objetivaron diferencias en la ratio CITP: MMP -1 entre pacientes sin ERC con IC-FEP o sin IC ( $p=0,06$ ). Este parámetro sin embargo estaba disminuido de manera significativa en pacientes con ERC e IC-FEP en comparación con pacientes con ERC sin IC ( $p= 0,004$ ) como muestra la Figura 16. La diferencia del ratio  $P < 0,004$  MP - 1 entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,4$ ), reflejado en la Figura 16.



*CITP:MMP1 = telopéptido del colágeno tipo I; metaloproteinas de matriz tipo I; IC-FEP = insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada; ERC = enfermedad renal crónica*

**Figura 16:** Valores de CITP: MMP- 1 ratio según la presencia o ausencia de ERC y subcategorizados según presencia o ausencia de IC.

Tal como se ha mencionado previamente, la frecuencia de pacientes con la combinación de PICP elevado y bajo ratio C1TP:MMP1 era mayor ( $p < 0,001$ ) en los pacientes con ERC e IC-FEP que en los pacientes con ERC sin IC y los pacientes sin ERC y con IC-FEP (Figura 14).

**Tabla 8.** Características demográficas, comorbilidades, tratamiento, parámetros bioquímicos y ecocardiográficos según la presencia o ausencia de ERC y subcategorizados según presencia o ausencia de IC

	No-ERC (N=223)			ERC (N=142)			Valor P*
	No IC (N=151)	IC-FEP (N=72)	Valor P	No IC (N=81)	IC-FEP (N=61)	Valor P	
Edad, años	62,2 ± 9,7	73,3 ± 7,6	<0,001	62,5 ± 9,5	74,7 ± 7,8	<0,001	0,99
Varón, n (%)	95 (62,9)	23 (31,9)	<0,001	74 (91,4)	20 (32,8)	<0,001	0,92
IMC, kg/m <sup>2</sup>	28,5 ± 4,1	29,0 ± 4,1	0,99	30,4 ± 5,2	29,3 ± 4,4	0,81	0,99
PAS, mmHg	134 ± 17,6	138 ± 19,4	0,99	135 ± 19,8	133 ± 21,2	0,99	0,90
PAD, mmHg	80,6 ± 9,9	75,9 ± 11,6	<b>0,020</b>	83,9 ± 10,9	73,7 ± 12,6	<0,001	0,71
PAM, mmHg	98,5 ± 10,9	96,6 ± 12,6	0,99	101 ± 12,5	93,5 ± 14,4	<b>0,002</b>	0,87
FC, latidos/min	66,1 ± 11,3	69,8 ± 16,3	0,32	67,2 ± 11,3	67,8 ± 13,2	0,99	0,99
Historia cardiovascular previa, n (%)							
Hospitalización en últimos 12 meses	0 (0,0)	25 (34,7)		0 (0,0)	21 (34,4)		0,97
Enfermedad vascular periférica	2 (1,3)	4 (5,6)	0,09	0 (0,0)	1 (1,6)		0,37
Enfermedad cerebrovascular	2 (1,3)	3 (4,2)	0,33	0 (0,0)	6 (9,8)		0,30
Valvulopatías							
Fibrilación auricular	4 (2,6)	23 (31,9)	<0,001	4 (4,9)	25 (41,0)	<0,001	0,28

Resultados

	No-ERC (N=223)			ERC (N= 142)			Valor P
	No IC (N=151)	IC-FEP (N=72)	Valor P	No IC (N=81)	IC-FEP (N=61)	Valor P	
Clase NYHA							
I		16 (22,2)			13 (21,3)		
II		40 (55,6)			30 (49,2)		0,62
III		16 (22,2)			18 (29,5)		
Comorbilidades							
Obesidad	56 (37,1)	25 (34,7)	0,73	36 (44,4)	26 (42,6)	0,83	0,35
Dislipemia	72 (47,7)	41 (56,9)	0,20	38 (46,9)	46 (75,4)	<b>0,001</b>	<b>0,026</b>
Diabetes	25 (16,6)	11 (15,3)	0,81	8 (9,9)	10 (16,4)	0,25	0,86
SAOS	6 (4,0)	6 (8,3)	0,21	1 (1,2)	5 (8,2)	0,08	0,98
EPOC	0 (0,0)	2 (2,8)		0 (0,0)	6 (9,8)		0,09
Anemia	12 (7,9)	11 (15,3)	0,09	2 (2,5)	12 (19,7)	<b>0,001</b>	0,50
Tratamiento							
Betabloqueantes	26 (17,2)	55 (76,4)	<b>&lt;0,001</b>	14 (17,3)	46 (75,4)	<b>&lt;0,001</b>	0,90
IECA/ARA II	105 (69,5)	56 (77,8)	0,20	59 (72,8)	50 (82,0)	0,20	0,55
Diuréticos	59 (39,1)	49 (68,1)	<b>&lt;0,001</b>	28 (34,6)	51 (83,6)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,039</b>
Antagonistas de la aldosterona	7 (4,6)	25 (34,7)	<b>&lt;0,001</b>	2 (2,5)	25 (41,0)	<b>&lt;0,001</b>	0,46
Antidiabéticos	29 (19,2)	11 (15,3)	0,48	6 (7,4)	14 (23,0)	<b>0,008</b>	0,26
Parámetros bioquímicos							
eGF, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	88,0 ± 15,4	74,2 ± 15,3	<b>&lt;0,001</b>	56,3 ± 15,1	49,3 ± 13,0	<b>0,034</b>	<b>&lt;0,001</b>

Resultados

	No-ERC (N=223)			ERC (N= 142)			Valor P
	No IC (N=151)	IC-FEP (N=72)	Valor P	No IC (N=81)	IC-FEP (N=61)	Valor P	
Hemoglobina, g/dL	14,6 ± 1,4	13,2 ± 1,4	<0,001	15,1 ± 1,2	13,2 ± 1,8	<0,001	0,99
NT-proBNP, pg/mL		256 (179-502)			464 (199-928)		<b>0,029</b>
PICP, ng/mL	60,4 (50,2-81,7)	81,6 (64,6-96,6)	<0,001	63,9 (50,1-78,1)	106 (88,1-136)	<0,001	<0,001
CITP: MMP-1 ratio	4,1 (2,3-7,3)	3,3 (1,8-5,7)	0,06	4,0 (2,3-6,3)	2,4 (1,2-4,4)	<b>0,004</b>	0,40
Parámetros ecocardiográficos							
Morfología del VI							
MVI i, g/m2	111 ± 32,7	121 ± 26,9	0,08	114 ± 26,6	114 ± 28,0	0,98	0,84
HVI, n (%)	75 (49,7)	54 (75,0)	<0,001	41 (50,6)	40 (65,6)	0,08	0,26
GPR	0,40 ± 0,08	0,46 ± 0,09	<0,001	0,41 ± 0,07	0,49 ± 0,11	<0,001	<b>0,035</b>
GPR >0,45, n (%)	40 (26,5)	37 (51,4)	<0,001	20 (24,7)	36 (59,0)	<0,001	0,38
VTDVI i, ml/m2	55,8 ± 17,8	40,0 ± 14,8	<0,001	62,9 ± 22,8	40,2 ± 11,7	<0,001	0,96
VTSVI i, ml/m2	20,2 ± 8,4	14,2 ± 7,5	<0,001	22,7 ± 8,7	14,2 ± 6,9	<0,001	0,99
Función del VI							
Onda E, cm/s	71,1 ± 15,1	79,3 ± 23,1	<b>0,040</b>	66,5 ± 17,0	86,9 ± 27,4	<0,001	<b>0,028</b>
E:A ratio	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,93	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,6	0,32	0,75
TD, ms	221 ± 62,6	230 ± 64,0	0,36	214 ± 76,3	225 ± 67,1	0,33	0,69
e', cm/s	9,3 ± 2,5	7,0 ± 2,0	<0,001	9,1 ± 2,7	6,9 ± 1,7	<0,001	0,80
E:e' ratio	8,0 ± 2,2	12,5 ± 3,5	<0,001	7,8 ± 2,6	14,2 ± 4,9	<0,001	0,010

Resultados

	No-ERC (N=223)			ERC (N= 142)			Valor P
	No IC (N=151)	IC-FEP (N=72)	Valor P	No IC (N=81)	IC-FEP (N=61)	Valor P	
E:e' ratio >15, n (%)	2 (1,3)	15 (20,8)	<0,001	1 (1,2)	22 (36,1)	<0,001	0,050
FEVI, %	64,0 ± 6,3	66,7 ± 7,9	0,05	62,9 ± 6,2	68,2 ± 8,4	<0,001	0,99
Morfología de la AI							
Vol AI , ml/m <sup>2</sup>	25,6 ± 7,5	29,7 ± 9,6	0,013	25,0 ± 6,1	38,1 ± 14,1	<0,001	0,001
Vol AI >34 ml/m <sup>2</sup> , n (%)	17 (11,3)	23 (31,9)	<0,001	7 (8,6)	33 (54,1)	<0,001	0,012

Las variables cuantitativas están expresadas como media ± desviación estándar. Las variables categóricas están expresadas como número (porcentajes). IMC = índice de masa corporal; PAS = tensión arterial sistólica; PAD = tensión arterial diastólica; PAM =tensión arterial media; FC = frecuencia cardíaca; NYHA = New York Heart Association; ERC = enfermedad renal crónica; IC =insuficiencia cardíaca; ICFEP = insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada. SAOS =síndrome de apnea obstructiva del sueño; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IECA = inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II = antagonista del receptor de la angiotensina II; eFG Calculado como =  $175 \times \text{creatinina sérica} - 1.154 \times \text{edad} - 0.203 \times 0.742$  si mujer. NT-proBNP = N-terminal péptido natriurético tipo Be; PICP = Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I; C1TP = Telopéptido del colágeno tipo I; MMP- 1 = Metaloproteinasa de matriz tipo I MVli = masa de ventrículo izquierdo indexada ; GRP = grosor relativo de pared; VTDVI i = volumen telediastólico indexado de ventrículo izquierdo mediante el método de Simpson; VTSVI i = volumen telesistólico indexado de ventrículo izquierdo mediante el método de Simpson; Vol AI i = volumen indexado de aurícula izquierda; E = pico precoz de velocidad de flujo transmitral ; E/A ratio = ratio de velocidades de llenado mitral; E' =desplazamiento de anillo mitral por pico precoz de llenado; TD = tiempo de deceleración; FEVI =fracción de eyección de ventrículo izquierdo; ERC= enfermedad renal crónica; IC= insuficiencia cardíaca; ICFEP= insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada \* Para comparaciones entre pacientes con IC-FEP

La asociación de la combinación de los biomarcadores de fibrosis miocárdica con el ratio E:e' y el volumen de AI fueron analizados en todos los pacientes, categorizados según la presencia o ausencia de ERC. Los pacientes sin ERC con la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica (n=47, 21%) mostraron unos valores del ratio E:e' y volumen de AI similares comparados con los pacientes sin ERC sin la combinación de los biomarcadores de fibrosis miocárdica (E: e':  $10,3 \pm 3,5$  frente a  $9,3 \pm 3,4$ , valor  $p=0,09$ ; Vol AI:  $29,1 \pm 12$  mL/m<sup>2</sup> frente a  $27,2 \pm 10,1$  mL/m<sup>2</sup>, valor  $p = 0,25$ ). Los pacientes con ERC con la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica (n = 49, 34,5%) presentaban valores más altos de E: e' en comparación con los pacientes sin la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica ( $13,8$  mL/m<sup>2</sup> ± 5,1 frente a  $8,9$  mL/m<sup>2</sup> ± 4, valor  $p < 0,001$ ), mientras que los valores de volumen auricular izquierdo fueron similares en ambos subgrupos ( $33,8 \pm 13,9$  mL/m<sup>2</sup> frente a  $29,1 \pm 11,3$  mL/m<sup>2</sup>, valor  $p=0,08$ ).

La asociación de la presencia de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica con valores elevados del cociente E:e' en pacientes con ERC era independiente de factores confusores como muestra la Tabla 9. Se observó que esta asociación también estaba presente en el subgrupo de pacientes con ERC con IC-FEP y que así mismo era independiente de factores confusores (incluidos en el modelo basal, sexo, frecuencia cardiaca, clase NYHA y pro-BNP) como se refleja en la Tabla 10. En estos pacientes la proporción de la varianza en la variable E:e' explicada por el modelo basal ( $R^2$ ) fue de 39,8%, que aumentó hasta un 44,9% (valor  $p= 0,033$ ) tras añadir la combinación de biomarcadores.



**Tabla 9.** Análisis de regresión lineal con los modelos uni y multivariante para el cociente E: e' en pacientes con ERC.

	Análisis univariable		Análisis multivariable		
	Beta (IC 95%)	Valor P	Beta (IC 95%)	Parcial R <sup>2</sup> (%)	Valor P
Edad, años	0,21 (0,14 a 0,28)	<0,001	0,06 (-0,02 a 0,14)	1,02	0,12
Varón, (no=0, si=1)	-5,58 (-7,07 a -4,10)	<0,001	-2,15 (-3,93 a -0,38)	3,03	<b>0,018</b>
IMC, kg/m <sup>2</sup>	0,04 (-0,13 a 0,21)	0,65			
PAS, mmHg	-0,003 (-0,04 a 0,04)	0,88			
PAD, mmHg	-0,10 (-0,16 a -0,03)	<b>0,003</b>	0,02 (-0,05 a 0,08)	0,12	0,60
FC, latidos/min	-0,08 (-0,16 a -0,01)	<b>0,026</b>	-0,07 (-0,12 a -0,01)	2,40	<b>0,019</b>
eFG, ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	-0,05 (-0,10 a 0,009)	0,10			
Hospitalización en últimos 12 meses, (no=0, si=1)	4,30 (2,08 a 6,53)	<0,001	-0,43 (-2,57 a 1,72)	0,06	0,70
Enfermedad cerebrovascular, (no=0, si =1)	4,23 (-0,11 a 8,34)	0,054			
Enfermedad vascular periférica, (no=0, si =1)	-1,80 (-6,76 a 3,16)	0,47			
Fibrilación auricular, (no=0, si =1)	3,25 (1,26 a 5,24)	<b>0,002</b>	0,60 (-1,24 a 2,43)	0,18	0,52
NYHA (II-III), (no=0, si =1)	6,58 (5,20 a 7,97)	<0,001	3,21 (1,08 a 5,34)	3,76	<b>0,003</b>
Obesidad, (no=0, si =1)	0,83 (-0,85 a 2,50)	0,33			
Dislipemia, (no=0, si =1)	2,13 (0,47 a 3,79)	<b>0,012</b>	0,05 (-1,42 a 1,51)	0,01	0,95

*Resultados*

Diabetes, (no=0, si =1)	1,43 (-1,06 a 3,91)	0,26			
SAOS, (no=0, si =1)	2,12 (-2,00 a 6,23)	0,31			
EPOC, (no=0, si =1)	2,40 (-1,72 a 6,51)	0,25			
Anemia, (no=0, si =1)	3,75 (1,04 a 6,47)	<b>0,007</b>	-0.18 (-2.51 a 2.16)	0,01	0,88
Betabloqueantes, (no=0, si =1)	4,97 (3,51 a 6,44)	<b>&lt;0,001</b>	1,25 (-0,46 a 2,95)	0,88	0,15
IECA/ARA II, (no=0, si =1)	0,27 (-1,70 a 2,24)	0,79			
Diuréticos, (no=0, si =1)	4,00 (2,45 a 5,53)	<b>&lt;0,001</b>	0,16 (-1,48 a 1,81)	0,02	0,84
Antagonistas de la aldosterona, (no=0, si =1)	5,25 (3,32 a 7,18)	<b>&lt;0,001</b>	1,42 (-0,46 a 3,30)	0,94	0,14
Combinación de biomarcadores, (no=0, si =1)	4,98 (3,43 a 6,53)	<b>&lt;0,001</b>	2,11 (0,57 a 3,65)	3,10	<b>0,008</b>

*IMC = índice de masa corporal; PAS = tensión arterial sistólica; PAD = tensión arterial diastólica; FC = frecuencia cardíaca; eFG Calculado como =  $175 \times \text{creatinina sérica} - 1.154 \times \text{edad} - 0.203 \times 0.742$  si mujer; NYHA = New York Heart Association; SAOS = síndrome de apnea obstructiva del sueño; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IECA = inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II = antagonista del receptor de la angiotensina II.*

**Tabla 10.** Análisis de regresión lineal para el cociente E:e' en pacientes con ERC e IC-FEP.

	Análisis univariable		Análisis multivariable		
	Beta (IC 95%)	Valor P	Beta (IC 95%)	Parcial R <sup>2</sup> (%)	Valor P
Edad, años	0,01 (-0,15 a 0,18)	0,87			
Varón, (no=0, si=1)	-2,60 (-5,26 a 0,05)	0,055	-2,23 (-4,46 a 0,001)	4,28	0,050
IMC, kg/m <sup>2</sup>	0,09 (-0,21 a 0,38)	0,55			
PAS, mmHg	-0,01 (-0,07 a 0,05)	0,67			
PAD, mmHg	0,003 (-0,10 a 0,11)	0,96			
FC, latidos/min	-0,14 (-0,23 a -0,05)	<b>0,003</b>	-0,15 (-0,23 a -0,07)	13,8	<b>0,001</b>
eFG, ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	-0,03 (-0,12 a 0,07)	0,62			
NT-proBNP	4,15 (1,60 a 6,70)	<b>0,002</b>	3,95 (1,74 a 6,16)	13,6	<b>0,001</b>
Hospitalización en últimos 12 meses, (no=0, si=1)	-0,02 (-2,73 a 2,69)	0,99			
Enfermedad cerebrovascular (no=0, si =1)	0,49 (-3,82 a 4,81)	0,82			
Enfermedad vascular periférica, (no=0, si =1)	0,05 (-5,02 a 5,11)	0,98			
Fibrilación auricular, (no=0, si =1)	-0,26 (-2,87 a 2,36)	0,84			
NYHA (II-III), (no=0, si =1)	3,63 (0,64 a 6,63)	<b>0,018</b>	1,99 (-0,61 a 4,59)	2,50	0,13
Obesidad, (no=0, si =1)	0,70 (-1,89 a 3,29)	0,59			

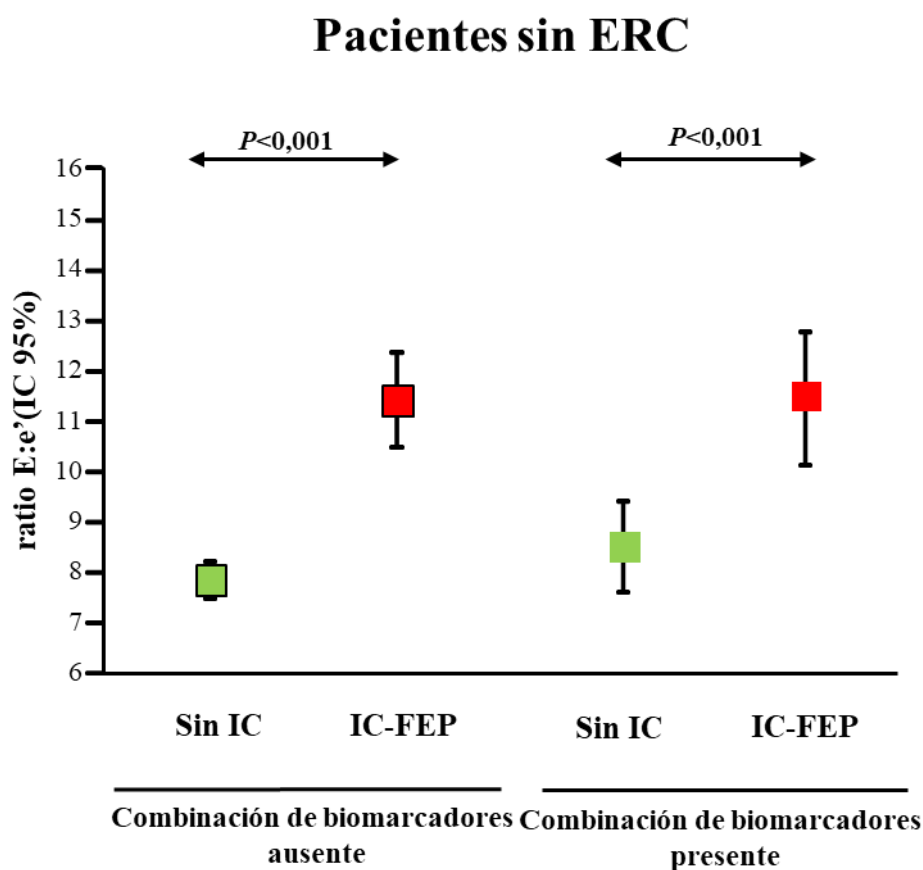
*Resultados*

Dislipemia, (no=0, si =1)	1,45 (-1,51 a 4,41)	0,33			
Diabetes, (no=0, si =1)	0,48 (-2,99 a 3,96)	0,78			
SAOS, (no=0, si =1)	-0,69 (-5,37 a 4,00)	0,77			
EPOC, (no=0, si =1)	-1,53 (-5,83 a 2,77)	0,48			
Anemia, (no=0, si =1)	-0,25 (-3,49 a 2,98)	0,88			
Betabloqueantes, (no=0, si =1)	2,62 (-0,29 a 5,53)	0,08			
IECA/ARA II, (no=0, si =1)	0,68 (-2,66 a 4,02)	0,68			
Diuréticos, (no=0, si =1)	1,30 (2,16 a 4,76)	0,46			
Antagonistas de la aldosterona, (no=0, si =1)	1,80 (-0,77 a 4,37)	0,17			
Combinación de biomarcadores, (no=0, si =1)	2,72 (0,20 a 5,24)	<b>0,035</b>	2.27 (0,19 a 4,34)	5,06	<b>0,033</b>

*IMC = Índice de masa corporal; PAS = tensión arterial sistólica; PAD =tensión arterial diastólica; FC = frecuencia cardíaca; eFG calculado como = 175 x creatinina sérica-1.154 x edad -0.203 x 0.742 si mujer; NYHA = New York Heart Association; SAOS= síndrome de apnea obstructiva del sueño; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IECA = inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II = antagonista del receptor de la angiotensina II.*

Con estos resultados decidimos analizar la influencia de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica en el cociente E:e' tanto en pacientes sin ERC como en pacientes con ERC estratificados de acuerdo con la presencia o ausencia de IC.

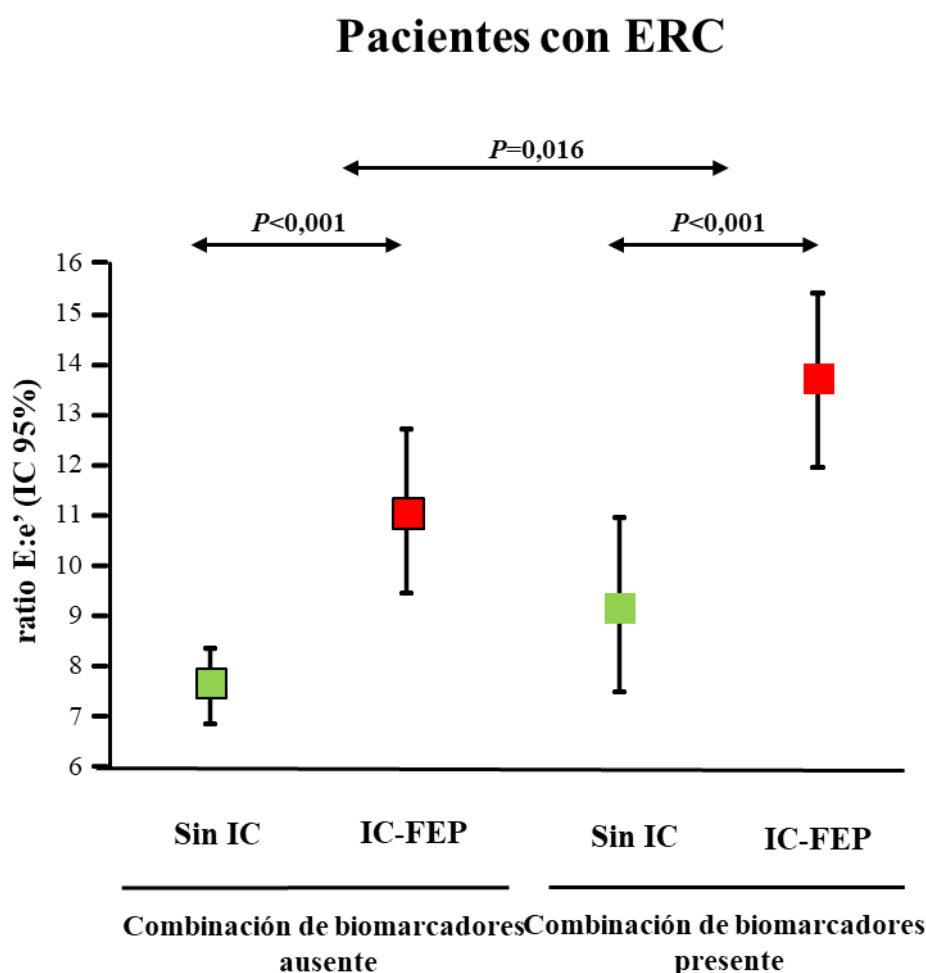
Como se muestra en la Figura 17, los análisis ajustados por edad y sexo mostraron que en pacientes sin ERC aquellos con IC-FEP presentan valores más elevados del cociente E:e' que aquellos sin IC de manera significativa (valor  $p < 0,001$ ), independientemente de la presencia de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica.



IC-FEP = insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada; ERC = enfermedad renal crónica

**Figura 17:** Valores del ratio E:e' en pacientes sin ERC subclasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de la combinación de fibrosis miocárdica y posteriormente según la presencia o ausencia de IC. Los símbolos representan las medias y los intervalos de confianza al 95%, ajustado por edad y sexo.

No obstante, en pacientes con ERC el aumento del ratio E: e' observado en los pacientes con IC-FEP comparado con los de los pacientes sin IC fue significativamente mayor en los pacientes que presentaban la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna en comparación con los que no lo presentaban (Figura 18).



IC= insuficiencia cardíaca; IC-FEP= insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada; ERC = enfermedad renal crónica.

**Figura 18:** Valores del ratio E: e' en pacientes con ERC subclasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de la combinación de fibrosis miocárdica y posteriormente según la presencia o ausencia de IC. Los símbolos representan las medias y los intervalos de confianza al 95%, ajustado a edad y sexo.

## **DISCUSION**

## **1. Fibrosis miocárdica en pacientes con hipertensión arterial**

La producción neta y el depósito de colágeno en el miocardio depende del balance entre su síntesis y degradación (32). Se ha propuesto que la fibrosis miocárdica es el resultado de un aumento en la síntesis en presencia de una degradación no modificada o disminuida (50). A pesar de la sólida evidencia científica que respalda el papel que desempeña la fibrosis miocárdica en pacientes con IC pocos datos aportan conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en ella, que son de interés al constituir unas potenciales dianas terapéuticas.

### **1.1 Formación de la fibra del colágeno tipo I**

El biomarcador P1CP, se forma durante la conversión extracelular de procolágeno I en colágeno maduro tipo I, mediante la enzima procolágeno carboxi-terminal proteinasa para ser posteriormente excretado al torrente circulatorio a través de los capilares (106). Existen múltiples estudios que evidencian que el P1CP sérico es un biomarcador de fibrosis miocárdica representativo de la cantidad de colágeno depositado, en concreto del colágeno tipo I, en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen hipertensivo (75). Por ello, el exceso de P1CP sérico en pacientes hipertensos con IC-FEP comparado con pacientes hipertensos sin IC, reportado en nuestro estudio, sugiere que la síntesis miocárdica y el depósito de colágeno tipo I aumenta en paralelo con la progresión hacia la insuficiencia cardíaca sintomática en estos pacientes.

Todo ello sugiere que la HTA desde las etapas tempranas produce alteraciones en la síntesis de colágeno y provoca un aumento anormal del depósito de colágeno tipo I aún en pacientes asintomáticos, lo cual precede a las alteraciones estructurales y funcionales que estos pacientes desarrollan con el tiempo de evolución.



## 1.2 Degradación de la molécula de colágeno tipo I

El grado de “cross-linking” o entrecruzamiento del colágeno está regulado por múltiples enzimas denominadas lisil-oxidasas (LOX) (64) y determina la resistencia de las fibras de colágeno tipo I a ser degradadas por las metaloproteinasas tipo 1 resultando en la desintegración del C1TP (47,107). El cociente C1TP:MMP1 refleja el grado de entrecruzamiento, de manera que a menor cociente, mayor resistencia a la degradación del colágeno que se traduce en el desarrollo de fibrosis miocárdica por acúmulo de colágeno de “mayor calidad” (66). Este cociente hasta 2015 presentaba una evidencia no concluyente, ya que por una parte el grupo de Klappacher et al. (108) halló una correlación directa entre C<sub>1</sub>VF (fracción de volumen de colágeno tipo 1) y C1TP en pacientes con IC y cardiopatía isquémica o miocardiopatía dilatada. Por otro lado Izawa et al (109) obtuvieron que los niveles de C1TP eran menores en pacientes con IC con miocardiopatía dilatada de origen idiopático y fibrosis miocárdica severa que en pacientes con fibrosis miocárdica moderada. Fue en el 2017 cuando se concluyó que el cociente C1TP/MMP1 es un biomarcador de alto “cross linking” en pacientes con insuficiencia cardíaca (79). En nuestro estudio este cociente aparece ya disminuido en pacientes hipertensos sin IC. Así mismo se observó que este cociente disminuía de manera significativa en los pacientes con insuficiencia cardíaca de origen hipertensivo respecto a los pacientes sin insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, el bajo cociente de C1TP: MMP -1 observado en pacientes con IC-FEP en comparación con los pacientes sin IC sugiere que el entrecruzamiento en las fibras de colágeno tipo I aumenta con el empeoramiento de la función diastólica y aparición de síntomas en pacientes hipertensos.

## 1.3 Combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica en pacientes con IC-FEP

El concepto de IC-FEP ha ido evolucionando desde el inicial de disfunción diastólica al actual de IC-FEP, término más inclusivo, en el que se reconoce el papel esencial que otros muchos componentes desempeñan en el desarrollo de este tipo de IC como se señaló en la introducción. Esta evolución conceptual se debe a los avances en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo

de la misma, de tal manera que, hoy día, se conoce que la IC-FEP comprende varios mecanismos fisiopatológicos que abarcan mucho más que disfunción diastólica, ya que la disfunción diastólica es un componente constitutivo del síndrome de IC-FEP, pero de manera aislada no es definitorio de IC-FEP (16). Una vez aclarado este concepto, se puede afirmar que determinadas comorbilidades van a condicionar el aumento en la prevalencia e incidencia de la IC-FEP. Especialmente destacable es la hipertensión arterial (HTA), con una prevalencia de 60%-80% en los grandes estudios epidemiológicos y registros de IC (16,110). La transición desde la disfunción hipertensiva diastólica asintomática hasta la IC-FEP sintomática estaría, por tanto, promovida por la presencia del suficiente número de alteraciones individuales en la reserva funcional cardiovascular (39). Así, se ha clarificado que la IC-FEP es en realidad un conjunto de entidades patológicas que tienen en común el presentar un cuadro clínico compatible con IC, tener una FE preservada, un VI no dilatado y evidencia objetiva de disfunción diastólica o enfermedad estructural cardíaca (hipertrofia ventricular izquierda o aumento del tamaño auricular(16). Debido a la dificultad que entraña su diagnóstico, la determinación de las concentraciones sanguíneas de péptidos natriuréticos pueden ayudar a confirmar o excluir el diagnóstico. Este mayor y mejor conocimiento de las diversas alteraciones estructurales debería permitir posibles avances en el tratamiento de la IC-FEP, y en este objetivo es muy útil el papel de la amplia gama de biomarcadores.

Recientemente nuestro grupo ha descrito un fenotipo histomolecular de fibrosis miocárdica maligna caracterizado por la coincidencia de deposición abundante de colágeno tipo 1 y exceso de grado de entrecruzamiento en biopsias endomiocárdicas de pacientes hipertensos con IC (79). En este mismo estudio, la combinación de valores elevados de PICP y valores disminuidos del cociente C1P:MMP -1 identificaba a los pacientes con alta cantidad de depósito de colágeno tipo 1 junto con fibras de colágeno tipo 1 con alto grado de entrecruzamiento (79). La concurrencia del exceso de depósito de colágeno tipo 1 y el exceso del grado de entrecruzamiento de sus fibras en pacientes con HTA está asociado con presiones de llenado elevadas y disfunción diastólica del ventrículo izquierdo. También se ha correlacionado a un peor pronóstico por mayor número de hospitalizaciones y mayor mortalidad tanto de causa cardíaca como no cardíaca (79) así como con fibrilación auricular (111). Por lo tanto, propusimos que en pacientes hipertensos con IC-FEP la combinación de

biomarcadores identificaba un fenotipo histomolecular de fibrosis miocárdica con disfunción diastólica y peor pronóstico.

#### **1.4 Relevancia clínica**

La aparición de síntomas es un hecho clave en la historia natural de la CH. Se ha situado la esperanza de vida media de 5 años tras el inicio de los síntomas (112). Por ello es vital poder reconocer a aquellos pacientes desde estadios precoces que tendrán peor evolución clínica asociada a mayor mortalidad, con el objetivo de poder desarrollar fármacos diana, y terapias de precisión que permitan efectuar esquemas terapéuticos de precisión. Con este estudio hemos visto que dentro de todos los pacientes con HTA hay un grupo que presenta un fenotipo de fibrosis miocárdica de peor pronóstico, independientemente de otras comorbilidades que presentan mayor riesgo de peor evolución una vez aparecidos los síntomas. Este enfoque expuesto permite estratificar el riesgo del paciente y establece el marco idóneo para un tratamiento personalizado, en particular de los pacientes con mayor riesgo.

## **2. La influencia de la enfermedad renal crónica en la aparición de fibrosis miocárdica en pacientes con hipertensión arterial**

Previamente se ha expuesto que los pacientes con IC-FEP presentaban hasta duplicados los valores los biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna respecto a los pacientes sin IC. Otro de nuestros hallazgos fue que esta proporción aumentaba hasta cuatro veces si se comparan los pacientes con IC-FEP y ERC con los pacientes sin IC ni ERC.

Es conocido que la presencia de ERC conlleva peor pronóstico en pacientes con IC-FEP (113). Algunos estudios han demostrado que la ERC está asociada a mayor remodelado cardíaco y alteraciones estructurales, como una mayor relación E/e' marcador de disfunción diastólica (114). Así mismo se ha observado una relación lineal entre el empeoramiento de la función renal y las alteraciones estructurales (95).

Nosotros observamos que los pacientes con IC-FEP y ERC presentaban mayor proporción de la combinación de los biomarcadores de fibrosis miocárdica. La ERC podría subyacer como una comorbilidad que ejerce de “gatillo” en la formación de fibrosis miocárdica en pacientes con HTA. Así mismo los biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna tienen mayor asociación con alteraciones estructurales del ventrículo izquierdo (cociente E/e') en pacientes con IC-FEP y ERC. Todo ello explica por qué la ERC esta, independientemente de otras comorbilidades como edad o sexo, asociada con las alteraciones estructurales del ventrículo izquierdo y con un peor pronóstico en pacientes con IC-FEP.

## **2.1 Factores pro-fibróticos asociados a ERC**

Debido a la alta prevalencia de fibrosis miocárdica en pacientes con enfermedad crónica y la correlación directa existente entre el grado de función renal y la severidad de la fibrosis miocárdica se ha propuesto que existan factores pro-fibróticos o vías ligadas a la enfermedad crónica que sean “adyuvantes”. En nuestro estudio específicamente no se ha investigado sobre mecanismos fisiopatológicos de la fibrosis miocárdica, pero sí existe evidencia experimental y clínica que apunta a la osteopontina como un candidato potencial.

### **2.1.1 La osteopontina**

La osteopontina es una proteína matricelular involucrada en el remodelado cardíaco. Se ha observado que esta proteína promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (115) e inhibe las metaloproteinasas involucradas en la degradación de colágeno (116,117). La osteopontina actuaría así como mediadora de la fibrosis miocárdica en respuesta a la sobrecarga de presión (58).

Recientemente se han publicado varios hallazgos en relación con la osteopontina: por una parte, se ha demostrado que la osteopontina miocárdica está asociada con el aumento del depósito del colágeno tipo I y el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno tipo I en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen hipertensivo (118). Así mismo, los pacientes con insuficiencia cardíaca de origen hipertensivo que presentan la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica presentaban mayor concentración de osteopontina en el miocardio (79). La osteopontina favorece la actividad de la LOX y su expresión en fibroblastos cardíacos (115). A pesar de que la asociación de la LOX con la osteopontina no es necesariamente una relación causal se postula como un mecanismo profibrótico en pacientes con IC de origen hipertensivo.

Por otra parte, se ha hallado que la osteopontina pueda ser predictiva para la hospitalización por IC y la mortalidad en pacientes con IC-FEP (119). Por último, la osteopontina plasmática aumenta progresivamente con la disminución del filtrado glomerular en pacientes con ERC, y está asociada con la mortalidad cardiovascular en estos pacientes (120). Parece necesario diseñar estudios específicos para evaluar el papel específico de la osteopontina en el desarrollo de la fibrosis miocárdica compleja en pacientes con IC-FEP y ERC.

### **3. Perspectivas futuras**

La fibrosis miocárdica es un proceso complejo que como se ha expuesto previamente presenta determinantes que favorecen su aparición, entre los que se encuentra como elemento principal la HTA. En este marco conceptual, más allá del control de la PA parece necesario y esencial dirigir la atención a estrategias terapéuticas dirigidas a la reparación del remodelado miocárdico.

Desde el punto de vista del metabolismo del colágeno tipo I se puede hipotetizar que en los pacientes con fibrosis miocárdica, el eje profibrótico PCP/BMP-1—LOX predomina sobre el eje fibrolítico MMP1 y otras MMP. Esto ofrece una oportunidad de desarrollar terapias de precisión para estos pacientes dirigidas a la inhibición del eje PCP/BMP-1—LOX. De hecho ya existen estudios que han demostrado que en pacientes con IC la administración durante un periodo largo de tiempo de torasemida sobre el tratamiento estándar de IC está asociado a una reducción de la deposición de colágenos y de su entrecruzamiento, lo cual conlleva a una disminución de la activación del PCP/BMP1 y una disminución en la expresión de la LOX (55,77,121). Clínicamente estos pacientes presentaban una mejoría en la clase funcional NYHA y una menor mortalidad (121). Cabe destacar que adicionalmente el tratamiento con torasemida se ha asociado a mejoría en la rigidez del ventrículo izquierdo y una mejoría de la función diastólica de hasta un 80% de los pacientes (122). Ninguno de estos efectos fue observado en pacientes con IC tratados con furosemida.

Lo previamente expuesto abre las puertas a que los pacientes con IC-FEP y ERC que presenten la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna (alto PCIP y bajo ratio de CITP/MMP1) puedan beneficiarse específicamente de tratamiento antifibróticos dirigidos, entre los cuales se encuentra actualmente la torasemida dentro de los fármacos utilizados para el tratamiento de la IC.

#### **4. Limitaciones**

En primer lugar, nuestro trabajo está realizado en un único centro con un tamaño muestral pequeño pero debido a la naturaleza de los objetivos del análisis, el diseño del estudio es apropiado. Debido a que se trata de un estudio descriptivo y transversal las asociaciones halladas entre la ERC, los biomarcadores de fibrosis miocárdica y la disfunción del VI no permiten establecer una causalidad.

En segundo término, los resultados aquí presentados no pueden ser extrapolados a una población sin HTA con IC o a una población con pacientes con IC de origen hipertensivo, pero con una fracción de eyección mid-range o fracción de eyección deprimida o a pacientes con IC-FEP con ERC estadio 5.

En tercera instancia la presencia de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna ha sido realizada con las medianas de PCIP y CITP:MMP1 en vez de los puntos de corte definidos previamente por nuestro grupo (79). Esto es debido a que los valores eran menores que el punto de corte en el caso del PCIP y mayores en el caso del cociente CITP: MMP1 en los pacientes con IC-FEP de nuestra población. Esto sugiere que la presencia de una fibrosis miocárdica en términos de cantidad y calidad de las fibras de colágeno tipo I es menor en comparación con los pacientes con IC estudiados hasta ahora, que incluían pacientes con FE preservada y deprimida. Por ello serían necesarios estudios para examinar la correspondencia entre los aspectos histológicos y bioquímicos de la fibrosis miocárdica maligna en los diferentes estadios de la IC.

En cuarto lugar, los análisis de subgrupos son considerados como análisis exploratorios con una generalización limitada. Por ello, son necesarios análisis más amplios en una serie de mayor tamaño muestral con cohortes independientes es necesaria para confirmar estos datos.

Finalmente, los problemas potenciales debido a la multiplicidad de comparaciones pueden haber influido en los hallazgos obtenidos.



## **CONCLUSIONES**

El análisis de una muestra poblacional de pacientes con insuficiencia cardiaca de origen hipertensivo nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes con hipertensión arterial e IC-FEP presentaron valores aumentados de P1CP y valores disminuidos del cociente C1TP: MMP -1 en comparación con pacientes hipertensos sin insuficiencia cardíaca.
2. La prevalencia de la combinación de P1CP elevado y del cociente C1TP: MMP- 1 disminuido fue mayor en pacientes hipertensos con IC-FEP que en los pacientes hipertensos sin insuficiencia cardíaca.
3. La presencia de enfermedad renal crónica en pacientes hipertensos, pero no de otras comorbilidades, hace que la asociación de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica con la IC-FEP sea más fuerte.
4. La combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica se asocia con disfunción diastólica en pacientes con ERC, especialmente en pacientes hipertensos con IC-FEP.
5. El metabolismo de colágeno, evaluado mediante los biomarcadores séricos P1CP y el cociente C1TP: MMP-1, mostró un peor perfil en presencia de IC-FEP en pacientes con hipertensión arterial.
6. La presencia de ERC pudo facilitar el desarrollo de fibrosis miocárdica, evaluada mediante la combinación de biomarcadores séricos, y de la disfunción diastólica en pacientes hipertensos con IC-FEP.

7. Se percibió una necesidad de investigar los mecanismos fisiopatológicos que asocian la prevalencia aumentada de la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna con la ERC, así como su asociación con el peor pronóstico en cohortes de mayor tamaño de pacientes con IC-FEP de origen hipertensivo con o sin ERC.

8. Existe la posibilidad de que la combinación de biomarcadores de fibrosis miocárdica maligna sirva para seleccionar a pacientes con IC-FEP de origen hipertensivo y ERC subsidiarios de tratamiento con torasemida añadido al tratamiento rutinario de IC.

## **REFERENCIAS**

1. Sayago Silva I, García-López F, Segovia-Cubero J. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca en España en los últimos 20 años. *Rev Esp Cardiol.* 2013;66:649–56.
2. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007;93:1137–46.
3. Steinberg BA, Zhao X, Heidenreich PA, Peterson ED, Bhatt DL, Cannon CP, et al. Trends in Patients Hospitalized With Heart Failure and Preserved Left Ventricular Ejection Fraction: Prevalence, Therapies, and Outcomes. *Circulation.* 2012;126:65–75.
4. Roger VL. Heart Failure Epidemic. *Circulation.* 2018;138:25–8.
5. Andersson C, Vasan RS. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Clin.* 2014;10:377–88.
6. Edelmann F. Facts and numbers on epidemiology and pharmacological treatment of heart failure with preserved ejection fraction. *ESC Hear Fail.* 2015;2:41–5.
7. Colby SL, Ortman JM. Projections of the size and composition of the US population: 2014 to 2060. *Curr Popul Reports.* 2015;25-1143.
8. Tsao CW, Lyass A, Enserro D, Larson MG, Ho JE, Kizer JR, et al. Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JACC Hear Fail.* 2018;6:678-85.
9. Anguita Sánchez M, Crespo Leiro MG, de Teresa Galván E, Jiménez Navarro M, Alonso-Pulpón L, Muñiz García J, et al. Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61:1041–9.

10. Nagai T, Yoshikawa T, Saito Y, Takeishi Y, Yamamoto K, Ogawa H, et al. Clinical Characteristics, Management, and Outcomes of Japanese Patients Hospitalized for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction — A Report From the Japanese Heart Failure Syndrome With Preserved Ejection Fraction (JASPER) Registry —. *Circ J*. 2018;82:1534–45.
11. Kurmani S, Squire I. Acute Heart Failure: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Heart Fail Rep*. 2017;14:385-92.
12. Stewart S, MacIntyre K, Capewell S, McMurray JJ V. Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart*. 2003;89:49–53.
13. Delgado JF, Oliva J, Llano M, Pascual-Figal D, Grillo JJ, Comin-Colet J, et al. Health care and nonhealth care costs in the treatment of patients with symptomatic chronic heart failure in Spain. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:643–50.
14. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:6A–13A.
15. INEbase / Sociedad /Salud /Estadística de defunciones según la causa de muerte / Últimos datos. <http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm>
16. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2016;37:2129–2200.
17. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: Executive summary: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2013;128:1810–52.

18. Chacko KA. AHA Medical/Scientific Statement: 1994 revisions to classification of functional capacity and objective assessment of patients with diseases of the heart. *Circulation*. 1995 Oct 1;92:2003–5.
19. How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur Heart J*. 1998;19:990–1003.
20. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: A consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28:2539–50.
21. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: Executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidel. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:2101–13.
22. Oktay AA, Rich JD, Shah SJ. The Emerging Epidemic of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr Heart Fail Rep*. 2013;10:401–10.
23. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;130:2354–94.
24. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl*

- J Med.2006;355:251–9.
25. Zile MR, Gaasch WH, Anand IS, Haass M, Little WC, Miller AB, et al. Mode of death in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Study (I-Preserve) trial. *Circulation*. 2010;121:1393–405.
  26. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Pr. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:e127–248.
  27. Lip GYH, Skjøth F, Overvad K, Rasmussen LH, Larsen TB. Blood pressure and prognosis in patients with incident heart failure: the Diet, Cancer and Health (DCH) cohort study. *Clin Res Cardiol*. 2015;104:1088–96.
  28. González A, Ravassa S, López B, Moreno MU, Beaumont J, San José G, et al. Myocardial remodeling in hypertension toward a new view of hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2018;72:549–58.
  29. Díez J. Diagnosis and treatment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circ J*. 2008;72 Suppl A:A8–12.
  30. Weber KT, Díez J. Targeting the cardiac myofibroblast secretome to treat myocardial fibrosis in heart failure. *Circ Hear Fail*. 2016;9:1–5.
  31. Miguel-Carrasco JL, Beaumont J, San José G, Moreno MU, López B, González A, et al. Mechanisms underlying the cardiac antifibrotic effects of losartan metabolites. *Sci Rep*. 2017;7:41865.



32. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989;13:1637–52.
33. Maulik N, Thirunavukkarasu M. Growth factor/s and cell therapy in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:219–27.
34. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res.* 2015;116:1022–33.
35. Kvakani H, Luft FC, Muller DN. Role of the immune system in hypertensive target organ damage. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19:242–6.
36. Weber KT. From Inflammation to Fibrosis: A Stiff Stretch of Highway. *Hypertension.* 2004;43:716–9.
37. Treibel TA, López B, González A, Menacho K, Schofield RS, Ravassa S, et al. Reappraising myocardial fibrosis in severe aortic stenosis: an invasive and non-invasive study in 133 patients. *Eur Heart J.* 2018;39:699-709.
38. Rizzoni D, Agabiti-Rosei C, Agabiti-Rosei E. Hemodynamic consequences of changes in microvascular structure. *Am J Hypertens.* 2017;30:939–46.
39. Bruno RM, Duranti E, Ippolito C, Segnani C, Bernardini N, Di Candio G, et al. Different Impact of Essential Hypertension on Structural and Functional Age-Related Vascular Changes: Novelty and Significance. *Hypertension.* 2017;69:71–8.
40. Shahbaz AU, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC, McGee JE, et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: molecular pathways and cardioprotective strategies. *J Hypertens.* 2010;28:S25–32.
41. Heymans S, González A, Pizard A, Papageorgiou AP, Lopez-Andrés N, Jaisser F, et al. Searching for new mechanisms of myocardial fibrosis with diagnostic and/or

- therapeutic potential. *Eur J Heart Fail.* 2015;17:764–71.
42. Gyöngyösi M, Winkler J, Ramos I, Do Q-T, Firat H, McDonald K, et al. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *Eur J Heart Fail.* 2017;19:177–91.
  43. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.* 1993;27:341–8.
  44. Weber K. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens.* 2004;22:47–50.
  45. Frangiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest.* 2017;127:1600–12.
  46. Brodsky B, Thiagarajan G, Madhan B, Kar K. Triple-helical peptides: An approach to collagen conformation, stability, and self-association. *Biopolymers.* 2008;89:345–53.
  47. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929–58.
  48. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:a004978.
  49. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 2000;15:264–72.
  50. González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71:1696–706.

51. Díez J, González A, López B, Querejeta R. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2:209–16.
52. Trackman PC. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem* .2005;96:927–37.
53. Lijnen PJ, Maharani T, Finahari N, Prihadi JS. Serum collagen markers and heart failure. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2012;12:51–5.
54. Prockop DJ, Sieron AL, Li SW. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol*. 1998;16:399–408.
55. López B, González A, Beaumont J, Querejeta R, Larman M, Díez J. Identification of a Potential Cardiac Antifibrotic Mechanism of Torasemide in Patients With Chronic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:859–67.
56. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*. 2005;118:1341–53.
57. Moreno MU, Eiros R, Gavira JJ, Gallego C, González A, Ravassa S, et al. The Hypertensive Myocardium. *Med Clin North Am*. 2017;101:43–52.
58. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev*. 2012;92:635–88.
59. Smit AJ, Hartog JW, Voors AA, van Veldhuisen DJ. Advanced Glycation Endproducts in Chronic Heart Failure. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1126:225–30.
60. López B, González A, Lindner D, Westermann D, Ravassa S, Beaumont J, et al.

- Osteopontin-mediated myocardial fibrosis in heart failure: a role for lysyl oxidase? *Cardiovasc Res.* 2013;99:111–20.
61. López B, González A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2010;299:H1–9.
  62. Engebretsen KVT, Lunde IG, Strand ME, Waehre A, Sjaastad I, Marstein HS, et al. Lumican is increased in experimental and clinical heart failure, and its production by cardiac fibroblasts is induced by mechanical and proinflammatory stimuli. *FEBS J.* 2013;280:2382–98.
  63. Kasner M, Westermann D, Lopez B, Gaub R, Escher F, Kühl U, et al. Diastolic tissue Doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:977–85.
  64. López B, Querejeta R, González A, Larman M, Díez J. Collagen cross-linking but not collagen amount associates with elevated filling pressures in hypertensive patients with stage C heart failure: Potential role of lysyl oxidase. *Hypertension.* 2012;60:677–83.
  65. Moore L, Fan D, Basu R, Kandalam V, Kassiri Z. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2012;17:693–706.
  66. López B, Ravassa S, González A, Zubillaga E, Bonavila C, Bergés M, et al. Myocardial collagen cross-linking is associated with heart failure hospitalization in patients with hypertensive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67:251–60.
  67. López B, González A, Ravassa S, Beaumont J, Moreno MU, San José G, et al.

- Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:2449–56.
68. González A, López B, Querejeta R, Zubillaga E, Echeverría T, Díez J. Filling pressures and collagen metabolism in hypertensive patients with heart failure and normal ejection fraction. *Hypertension.* 2010;55:1418–24.
69. Fuentes-Arderiu X. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51:1689–90.
70. Morrow DA, De Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007;115:949–52.
71. Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest.* 1982;46:158–64.
72. López B, González A, Querejeta R, Larman M, Díez J. Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:89–96.
73. Mueller GC, Michel-Behnke I, Knirsch W, Haas NA, Abdul-Khaliq H, Gitter R, et al. Feasibility, safety and diagnostic impact of endomyocardial biopsies for the diagnosis of myocardial disease in children and adolescents. *EuroIntervention.* 2018;14:1089–95.
74. Querejeta R, Varo N, López B, Larman M, Artiñano E, Etayo JC, et al. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation.* 2000;101:1729–35.
75. Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, Martínez Ubago JL, et

- al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: Relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 2004;110:1263–8.
76. Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*. 2002;105:2512–7.
77. López B, Querejeta R, González A, Sánchez E, Larman M, Díez J. Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:2028–35.
78. Löfsjögård J, Kahan T, Díez J, López B, González A, Ravassa S, et al. Usefulness of Collagen Carboxy-Terminal Propeptide and Telopeptide to Predict Disturbances of Long-Term Mortality in Patients  $\geq 60$  Years With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *Am J Cardiol*. 2017;119:2042–8.
79. Ravassa S, López B, Querejeta R, Echegaray K, San José G, Moreno MU, et al. Phenotyping of myocardial fibrosis in hypertensive patients with heart failure. Influence on clinical outcome. *J Hypertens*. 2017;35:853–61.
80. Ravassa S, Ballesteros G, López B, Ramos P, Bragard J, González A, et al. Combination of Circulating Type I Collagen-Related Biomarkers Is Associated With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:1398–410.
81. Romero-González G, Ravassa S, González O, Lorenzo I, Rojas MA, García-Trigo I, et al. Burden and challenges of heart failure in patients with chronic kidney disease. A call to action. *Nefrología*. 2019;S0211-6995:30196-1.
82. Erratum: Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD

- Update Work Group. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2017;7:1-59.
83. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Blood Pressure Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the management of blood pressure in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2012;2:337-414.
84. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: Refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med.* 2008;34:957–62.
85. Segall L, Nistor I, Covic A. Heart Failure in Patients with Chronic Kidney Disease : A Systematic Integrative Review. *Biomed Res Int.* 2014;2014:937398.
86. Palazzuoli A, Lombardi C, Ruocco G, Padeletti M, Nuti R, Metra M, et al. Chronic kidney disease and worsening renal function in acute heart failure: different phenotypes with similar prognostic impact? *Eur Hear journal Acute Cardiovasc Care.* 2016;5:534–48.
87. USRDS. United States Renal Data System. 2015 USRDS annual data report Volume 2: ESRD in the United States, Chapter 9: Cardiovascular Disease in patients with ESRD. *Natl Institutes Heal Natl Inst Diabetes Dig Kidney Dis.* 2016;Bethesda:465–80.
88. Kottgen A, Russell SD, Loehr LR, Crainiceanu CM, Rosamond WD, Chang PP, et al. Reduced kidney function as a risk factor for incident heart failure: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1307–15.
89. Wang X, Shapiro JI. Evolving concepts in the pathogenesis of uraemic

- cardiomyopathy. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15:159–75.
90. López B, González A, Hermida N, Laviades C, Díez J. Myocardial fibrosis in chronic kidney disease: potential benefits of torasemide: New strategies to prevent cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008;74:S19–23.
  91. Zannad F, Rossignol P. Cardiorenal syndrome revisited. *Circulation.* 2018;138:929–44.
  92. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 2006;30:604–10.
  93. Takahama H, Kitakaze M. Pathophysiology of cardiorenal syndrome in patients with heart failure: Potential therapeutic targets. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2017;313:H715-21.
  94. Damman K, Valente MAE, Voors AA, O'Connor CM, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35:455–69.
  95. Unger ED, Dubin RF, Deo R, Daruwalla V, Friedman JL, Medina C, et al. Association of chronic kidney disease with abnormal cardiac mechanics and adverse outcomes in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:103–12.
  96. Bibbins-Domingo K, Lin F, Vittinghoff E, Barrett-Connor E, Grady D, Shlipak MG. Renal insufficiency as an independent predictor of mortality among women with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1593–600.
  97. Fatema K, Hirono O, Masakane I, Nitobe J, Kaneko K, Zhang X, et al. Dynamic



- assessment of myocardial involvement in patients with end-stage renal disease by ultrasonic tissue characterization and serum markers of collagen metabolism. *Clin Cardiol.* 2004;27:228–34.
98. Shibasaki Y, Nishiue T, Masaki H, Tamura K, Matsumoto N, Mori Y, et al. Impact of the Angiotensin II Receptor Antagonist, Losartan, on Myocardial Fibrosis in Patients with End-Stage Renal Disease: Assessment by Ultrasonic Integrated Backscatter and Biochemical Markers. *Hypertens Res.* 2005;28:787–95.
99. Issue Information-Declaration of Helsinki. *J Bone Miner Res.* 2017;32:BM i-BM ii.
100. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Hear J – Cardiovasc Imaging.* 2015;16:233–71.
101. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2016;37:2129–200.
102. Caballero L, Kou S, Dulgheru R, Gonjilashvili N, Athanassopoulos GD, Barone D, et al. Echocardiographic reference ranges for normal cardiac Doppler data: Results from the NORRE Study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16:1031–41.
103. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, Dokainish H, Edvardsen T, et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography

- and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2016;29:277–314.
104. Zhang J, Fujimoto N, Iwata K, Sakai T, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* . 1993;219:1–14.
  105. Karl J, Borgya A, Gallusser A, Huber E, Krueger K, Rollinger W, et al. Development of a novel, N-terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1999;230:177–81.
  106. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:403–34.
  107. van der Slot-Verhoeven AJ, van Dura EA, Attema J, Blauw B, DeGroot J, Huizinga TWJ, et al. The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2005;1740:60–7.
  108. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol*. 1995;75:913–8.
  109. Izawa H, Murohara T, Nagata K, Isobe S, Asano H, Amano T, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study. *Circulation*. 2005;112:2940–5.
  110. Mentz RJ, Kelly JP, Von Lueder TG, Voors AA, Lam CSP, Cowie MR, et al.

- Noncardiac comorbidities in heart failure with reduced versus preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:2281–93.
111. Ravassa S, Ballesteros G, López B, Ramos P, Bragard J, González A, et al. Combination of Circulating Type I Collagen-Related Biomarkers Is Associated With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73:1398–410.
112. Bleumink G, Knetsch A, Sturkenboom M, Straus S, Hofman A, Deckers J, et al. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure: The Rotterdam Study. *Eur Heart J.* 2004;25:1614–9.
113. McAlister FA, Ezekowitz J, Tonelli M, Armstrong PW. Renal Insufficiency and Heart Failure. *Circulation.* 2004;109:1004–9.
114. Bruch C, Rothenburger M, Gotzmann M, Wichter T, Scheld HH, Breithardt G, et al. Chronic kidney disease in patients with chronic heart failure--impact on intracardiac conduction, diastolic function and prognosis. *Int J Cardiol.* 2007;118:375–80.
115. Lenga Y, Koh A, Perera AS, McCulloch CA, Sodek J, Zohar R. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res.* 2008;102:319–27.
116. Krishnamurthy P, Peterson JT, Subramanian V, Singh M, Singh K. Inhibition of matrix metalloproteinases improves left ventricular function in mice lacking osteopontin after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2009;322:53–62.
117. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:549–74.
118. López B, González A, Lindner D, Westermann D, Ravassa S, Beaumont J, et al.

- Osteopontin-mediated myocardial fibrosis in heart failure: a role for lysyl oxidase?  
*Cardiovasc Res.* 2013;99:111–20.
119. Tromp J, Khan MAF, Klip IJT, Meyer S, de Boer RA, Jaarsma T, et al. Biomarker Profiles in Heart Failure Patients With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc.* 2017;6: e003989.
120. Kaleta, B. The role of osteopontin in kidney diseases. *Inflamm. Res.* 2019; 68: 93–10.
121. Cosín J, Díez J. Torasemide in chronic heart failure: results of the TORIC study. *Eur J Heart Fail.* 2002;4:507–13.
122. Yamato M, Sasaki T, Honda K, Fukuda M, Akutagawa O, Okamoto M, et al. Effects of torasemide on left ventricular function and neurohumoral factors in patients with chronic heart failure. *Circ J.* 2003;67:384–90.

# **ANEXO**



Article

# Does Chronic Kidney Disease Facilitate Malignant Myocardial Fibrosis in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction of Hypertensive Origin?

Rocio Eiros <sup>1,\*</sup>, Gregorio Romero-González <sup>2</sup>, Juan Jose Gavira <sup>1,3</sup>, Oscar Beloqui <sup>3,4</sup>, Inmaculada Colina <sup>3,4</sup>, Manuel Fortún Landecho <sup>3,4</sup>, Begoña López <sup>3,5,6</sup>, Arantxa González <sup>3,5,6</sup>, Javier Díez <sup>1,2,3,5,6</sup> and Susana Ravassa <sup>3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Department of Cardiology and Cardiac Surgery, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain; jjgavira@unav.es (J.J.G.); jadimar@unav.es (J.D.)

<sup>2</sup> Department of Nephrology, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain; gromero@unav.es

<sup>3</sup> Program of Cardiovascular and Renal Diseases, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), 31008 Pamplona, Spain; obeloqui@unav.es (O.B.); icolina@unav.es (I.C.); mflandecho@unav.es (M.F.L.); blopez@unav.es (B.L.); amiqueo@unav.es (A.G.); sravassa@unav.es (S.R.)

<sup>4</sup> Department of Internal Medicine, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

<sup>5</sup> Program of Cardiovascular Diseases, CIMA Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

<sup>6</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain

\* Correspondence: eirosbachiller@gmail.com; Tel.: +34-948194700

Received: 26 December 2019; Accepted: 31 January 2020; Published: 3 February 2020



**Abstract:** In hypertensive patients with heart failure (HF) a serum biomarker combination of high carboxy-terminal propeptide of procollagen type-I (PICP) and low carboxy-terminal telopeptide of collagen type-I to matrix metalloproteinase-1 (CITP:MMP-1) ratio identifies a histomolecular phenotype of malignant myocardial fibrosis (mMF) associated with severe diastolic dysfunction (DD) and poor outcomes. As chronic kidney disease (CKD) facilitates MF and DD, we investigated the influence of CKD on the mMF biomarker combination in HF patients with preserved ejection fraction (HFpEF). Hypertensives ( $n = 365$ ), 232 non-HF and 133 HFpEF, were studied, and 35% non-HF and 46% HFpEF patients had CKD (estimated glomerular filtration rate  $< 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> or urine albumin-to-creatinine ratio  $\geq 30$  mg/g). Specific immunoassays were performed to determine biomarkers. Medians were used to establish the high PICP and low CITP:MMP-1 combination. A comparison with non-HF showed that the biomarker combination presence was increased in HFpEF patients, being associated with CKD in all patients. CKD influenced the association of the biomarker combination and HFpEF ( $p$  for interaction  $\leq 0.019$ ). The E:e' ratio was associated with the biomarker combination in CKD patients. Among CKD patients with HFpEF, those with the biomarker combination exhibited higher ( $p = 0.016$ ) E:e' ratio than those without the pattern. These findings suggest that CKD facilitates the development of biomarker-assessed mMF and DD in hypertensive HFpEF patients.

**Keywords:** arterial hypertension; heart failure; chronic kidney disease; myocardial fibrosis; biomarkers

## 1. Introduction

Diffuse myocardial fibrosis (MF) is practically a constant finding in hypertensive patients with heart failure (HF) and contributes to left ventricular (LV) stiffness and dysfunction [1]. In hypertensive patients with HF, MF is the result of increased deposition of collagen type I fibers with increased

cross-linking [1]. In HF patients the amount of collagen deposition is associated with all-cause death [2], whereas in HF hypertensive patients the degree of collagen cross-linking is associated with the risk of hospitalization for HF [3]. In fact, the combination of extensive collagen deposition and excessive collagen cross-linking identifies a histomolecular phenotype of "malignant" MF (mMF) that is independently associated with severe LV dysfunction, and both hospitalization for HF and cardiovascular mortality in hypertensive patients with HF [4].

Some circulating biomarkers of myocardial collagen type I deposition and cross-linking have been characterized in HF patients. On the one hand, serum levels of the carboxy-terminal propeptide of procollagen type I (PICP) directly correlate with the amount of collagen type I deposition in the myocardium of hypertensive patients with HF [5]. On the other hand, the serum carboxy-terminal telopeptide of collagen type I to matrix metalloproteinase-1 ratio (CITP:MMP-1) inversely correlates with myocardial collagen type I cross-linking in hypertensive patients with HF [3]. Recently, it has been reported that in hypertensive patients with HF a combination of high PICP and low CITP:MMP-1 ratio identifies a subgroup of patients carrying the histomolecular phenotype of mMF and presenting with high risk of HF hospitalization or death from cardiovascular causes [4], and atrial fibrillation [6].

The presence of chronic kidney disease (CKD) is associated with a higher risk of mortality in HF patients, showing a greater prognostic significance among those with HF with preserved ejection fraction (HFpEF) [7]. In fact, a recent study has shown that CKD is related to cardiac remodeling, significantly impaired cardiac function and, worse outcomes in HFpEF patients, of whom > 80% were hypertensive [8]. Several post-mortem studies have shown MF in patients with CKD [9–11], and it has been proposed that the development of LV diastolic dysfunction (LVDD) and subsequent HFpEF in CKD patients is related to MF [12]. Although some studies have explored MF in patients with end-stage CKD using circulating collagen-related biomarkers [13,14], no information is available on serum PICP and CITP/MMP-1 ratio in CKD patients with HF. Therefore, this study was designed to assess in hypertensive patients with HFpEF the potential influence of CKD on the biomarker combination corresponding to the histomolecular phenotype of mMF and the association of this combination with LVDD in these patients.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Study Subjects

Samples and data from patients included in the study were provided by the Biobank of the University of Navarra and were processed following standard operating procedures approved by the Clinical Investigation Ethics Committee of the University of Navarra. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The study conformed to the principles of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013.

In total, 411 patients, diagnosed with chronic arterial hypertension, were enrolled between October 2014 and November 2017, at the University of Navarra Clinic. Blood pressure measurement was obtained by using an appropriate cuff size for the left arm circumference with the patient in a sitting position; after a 5 min rest, measurements were taken twice with a 1 to 2 min interval between the measurements. Hypertension was defined as systolic blood pressure >139 mm Hg and/or diastolic blood pressure > 89 mm Hg and/or antihypertensive treatment. All patients underwent appropriate clinical and laboratory evaluation to exclude secondary hypertension. Of the 411 patients diagnosed as hypertensives, 20 did not have available blood samples and 26 had undetectable or above the range (determined by the respective standard curves) PICP, CITP, or MMP-1 values. Therefore, valid determinations of the biomarkers of myocardial fibrosis were obtained in 365 patients. These were divided in 2 groups, according to the absence of HF ( $n = 232$ ) or presence of HFpEF ( $n = 133$ ). HFpEF was defined by past or current symptoms of HF associated with EF values  $\geq 50\%$ , relevant structural heart disease and/or LVDD, and plasma values of amino-terminal propeptide of brain natriuretic peptide (NT-proBNP) > 125 pg/ml [15]. CKD was defined on the basis of reduced estimated

glomerular filtration rate (eGFR  $<60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) or a urine albumin-to-creatinine ratio  $\geq 30$  mg/g for  $\geq 3$  months [16].

Comorbidities were defined as follows: Obesity was defined as body mass index  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>. Dyslipidemia was diagnosed if the fasting serum total cholesterol was  $\geq 200$  mg/dL or serum triglyceride levels were  $\geq 150$  mg/dL. Diabetes mellitus was defined by physician-documented history, use of oral hypoglycemic or insulin for the treatment of hyperglycemia. Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome was diagnosed if the apnea hypopnea index was  $\geq 4.6$ . Chronic obstructive pulmonary disease was diagnosed if the ratio of post-bronchodilator forced expiratory volume in 1 s and forced vital capacity was  $< 0.70$ . Anemia was diagnosed if the value of hemoglobin was  $< 13$  g/dL for men and  $< 12$  g/dL for women.

Patients with LVEF values  $< 50\%$ , severe valvular heart disease, ischemic heart disease, and stage 5 CKD (eGFR  $< 15$  mL/min per 1.73 m<sup>2</sup>) were excluded after examination. None of the patients presented extracardiac conditions associated with alterations in serum or plasma levels of any of the studied collagen biomarkers (i.e., chronic liver disease or metabolic bone disease).

## 2.2. Echocardiographic Study

Two dimensional echocardiographic, pulsed Doppler, and tissue Doppler imaging studies were performed in all patients. LVH was diagnosed when the LV mass index (LVMI) was  $> 125$  g/m<sup>2</sup> for men and  $> 95$  g/m<sup>2</sup> for women [17]. Values of left atrial volume index (LAVI)  $> 34$  mL/m<sup>2</sup> were considered indicative of LA enlargement [17]. Values of the peak early diastolic velocity (E) to the early mitral annulus velocity in diastole (septal and lateral average) (e') (E:e') ratio  $> 15$  were considered indicative of LV diastolic dysfunction [17].

## 2.3. Biochemical Determinations

Venous blood samples were obtained in each patient included in the study from the left antecubital vein and stored at  $-20$  °C for further simultaneous processing. Determination of biomarkers was performed as previously described [4]. Plasma amino-terminal propeptide of brain natriuretic peptide (NT-proBNP) was measured using an ELISA (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were less than 10%. The lower limit of detection was 5 pg of NT-proBNP per mL. Serum carboxy-terminal telopeptide of collagen type I (CITP) was measured by an ELISA (Orion Diagnostica, Espoo, Finland). The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were 10.3% and 8.8%, respectively. The lower limit of detection was 0.3  $\mu$ g of CITP per liter. Total serum matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) was measured by an alphaLISA (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were 12.5% and 4%, respectively. The lower limit of detection was 82.6 pg/mL. CITP and MMP-1 values were expressed in molarity and their ratio was calculated in each patient as previously reported [3]. Serum PICP was measured using the EIA MicroVue CICP (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA). The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were 12.0% and 8.1%, respectively. The lower limit of detection was 0.2 ng/mL.

## 2.4. Statistical Analysis

The presence of the biomarker combination of high PICP and low CITP:MMP-1 ratio was determined by using the previously defined cut-off points [4] and the respective medians in the entire group. Normality was demonstrated by the Shapiro–Wilks or Kolmogorov–Smirnov tests. Non-normally distributed variables were examined after logarithmic transformation. Differences between two groups of subjects were tested by Student's t-test for unpaired data once normality was demonstrated; otherwise, the nonparametric test (Mann–Whitney U test) was used. Differences between more than two groups were tested by using on-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Fisher test once normality was demonstrated; otherwise the nonparametric test of Kruskal–Wallis was applied followed by the Mann–Whitney U test. Categorical variables were examined by using  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, when necessary. Multivariable logistic regression models were used to



assess the independent relationships of comorbidities with the presence or absence of the biomarker combination after adjustment for relevant covariables identified by a backward stepwise selection with minimization of the Akaike information criterion (AIC). Calibration of the logistic models was assessed using the Homer–Lemeshow goodness-of-fit test.

To determine whether the association of the biomarker combination with HFpEF differed by the presence or absence of CKD, qualitative interaction analyses were performed by logistic regression analyses in a model including the combination of biomarkers (yes/no) as the dependent variable, and CKD (yes/no), HFpEF (yes/no), and an interaction term derived from the product of these variables as independent categorical factors.

Multivariable linear regression models were performed to assess the independent relationship of the biomarker combination with the E:e' ratio, adjusting for covariables significant in univariable analyses ( $p < 0.05$  in all CKD patients,  $p < 0.1$  in CKD patients with HFpEF). The assumption of normality of residuals was checked by the Kolmogorov–Smirnov test and graphic analysis of the P-P plots. Multicollinearity was defined as variance inflation factor (VIF)  $> 2$  or tolerance  $< 0.50$  with model reduction, in case any variable showed evidence of multicollinearity. Age- and sex-adjusted analyses of variance were used to compare the E:e' ratio among patients classified in four subgroups according to the presence or absence of HFpEF and the biomarker combination.

Values are expressed as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range), and categorical variables as numbers and percentages. Statistical significance was set as a 2-sided  $p$  of 0.05. The statistical analyses were performed by using SPSS (15.0 version, Chicago, IL, USA) and STATA (12.1 version, Stata Corp, College station, TX, USA) software.

### 2.5. Data Availability

The used study data are unsuitable for public deposition due to ethical restrictions and privacy of participant data. Data are available from these studies for any interested researcher who meets the criteria for access to confidential data. Rocio Eiros can be contacted to request study data.

## 3. Results

### 3.1. Findings in Patients Classified According to the Absence of HF or Presence of HFpEF

Clinical, biochemical, and echocardiographic characteristics of the two groups, non-HF and HFpEF patients, are presented in Table 1. Among other significant clinical differences, CKD was more prevalent in HFpEF patients than in non-HF patients. As expected, more HFpEF patients exhibited abnormal values of the E:e' ratio and left atrial volume index (LAVI) as compared with non-HF patients. Serum PICP levels were higher and C1P:MMP-1 ratio values lower in HFpEF patients compared with non-HF patients. When the biomarker combination was defined according to the previously defined cut-off points [4], the frequency of patients exhibiting the combination of high PICP ( $\geq 111$  ng/mL) and low C1P:MMP-1 ratio ( $\leq 1.97$ ) was higher ( $p < 0.001$ ) in the HFpEF group (10.5%) as compared with the non-HF group (0.4%). However, since the previously defined biomarker combination was only present in one non-HF patient, subsequent analyses in all patients were performed with the median-defined biomarker combination. As shown in Figure 1A, the frequency of patients exhibiting the combination of high PICP ( $\geq$  median value = 70.4 ng/mL) and low C1P:MMP-1 ratio ( $\leq$  median value = 3.58) was higher ( $p < 0.001$ ) in the HFpEF group (43.6%) than in the non-HF group (16.4%).

**Table 1.** Characteristics of patients classified according to the presence or absence of preserved ejection fraction (HFpEF).

	Without HF (N = 232)	With HF (N = 133)	p Value
Age, years	62.3 ± 9.7	74.0 ± 7.7	<0.001
Male, n (%)	169 (72.8)	43 (32.3)	<0.001
BMI, kg/m <sup>2</sup>	29.2 ± 4.6	29.1 ± 4.2	0.90
SBP, mmHg	135 ± 18.3	136 ± 20.3	0.58
DBP, mmHg	81.8 ± 10.4	74.9 ± 12.0	<0.001
MAP, mmHg	99.4 ± 11.5	95.2 ± 13.5	0.003
HR, beats/min	66.5 ± 11.3	68.9 ± 14.9	0.12
Previous cardiovascular history, n (%)			
Hospitalized within 12 months	0 (0.0)	46 (34.3)	
Peripheral artery disease	2 (0.9)	5 (3.8)	0.10
Cerebrovascular disease	2 (0.9)	9 (6.8)	0.002
Atrial fibrillation	8 (3.4)	48 (36.1)	<0.001
NYHA class			
I		29 (21.8)	
II		70 (52.6)	
III		34 (25.6)	
Comorbidities, n (%)			
Obesity	92 (39.7)	51 (38.3)	0.81
Dyslipidemia	110 (47.4)	87 (65.4)	0.001
Diabetes	40 (17.2)	27 (20.3)	0.47
OSAHS	7 (3.0)	11 (8.3)	0.041
COPD	0 (0.0)	8 (6.0)	
Anemia	14 (6.0)	23 (17.3)	0.001
CKD	81 (34.9)	61 (45.9)	0.039
Treatments, n (%)			
Beta-blockers	40 (17.2)	101 (75.9)	<0.001
ACEI/ARB	164 (70.7)	106 (79.7)	0.06
Diuretics	87 (37.5)	100 (75.2)	<0.001
MR blockers	9 (3.9)	50 (37.6)	<0.001
Anti-diabetic drugs	35 (15.1)	25 (18.8)	0.36
Biochemical parameters			
ACR, mg/g	8.1 (4.7–15.8)	18.4 (8.4–34.8)	<0.001
eGFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	76.9 ± 21.5	62.7 ± 18.9	<0.001
Hemoglobin, g/dL	14.8 ± 1.4	13.2 ± 1.6	<0.001
NT-proBNP, pg/mL		332 (191–782)	
PICP, ng/mL	61.1 (50.2–79.5)	91.0 (70.6–108)	<0.001
CITP:MMP-1 ratio	4.0 (2.3–6.6)	3.0 (1.5–5.0)	<0.001
Echocardiographic parameters			
LV morphology			
LVMI, g/m <sup>2</sup>	112 ± 30.7	119 ± 30.1	0.056
LVH, n (%)	116 (50.0)	94 (70.7)	<0.001
RWT	0.41 ± 0.08	0.47 ± 0.10	<0.001
RWT > 0.45, n (%)	60 (25.9)	73 (54.9)	<0.001
LVEDVi, mL/m <sup>2</sup>	58.3 ± 19.9	40.1 ± 13.4	<0.001
LVESVi, mL/m <sup>2</sup>	21.1 ± 8.6	14.2 ± 7.2	<0.001

Table 1. Cont.

	Without HF (N = 232)	With HF (N = 133)	p Value
LV function			
E wave, cm/s	69.5 ± 15.9	82.8 ± 25.4	<0.001
E:A ratio	0.89 ± 0.23	0.95 ± 0.44	0.51
DT, ms	219 ± 67.4	228 ± 65.3	0.22
Mean e', cm/s	9.2 ± 2.6	7.1 ± 2.1	<0.001
E:e' ratio	8.0 ± 2.7	13.3 ± 4.3	<0.001
E:e' ratio > 15, n (%)	3 (1.3)	37 (27.8)	<0.001
LVEF, %	63.6 ± 6.3	67.4 ± 8.2	<0.001
LA morphology			
LAVI, mL/m <sup>2</sup>	25.4 ± 7.0	33.5 ± 12.5	<0.001
LAVI > 34 mL/m <sup>2</sup> , n (%)	24(10.3)	56(42.1)	<0.001

HF means heart failure; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; NYHA, New York Heart Association; OSAHS, obstructive sleep apnea hypopnea syndrome; COPD; chronic obstructive pulmonary disease; CKD, chronic kidney disease; ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II type 1 receptor blockers; MR, mineralocorticoid receptor; ACR, albumin to creatinine ratio; eGFR, estimated glomerular filtration rate; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PICP, carboxy-terminal propeptide of procollagen type I; C1TP:MMP-1, carboxy-terminal telopeptide of collagen type I to serum matrix metalloproteinase-1 ratio; LV, left ventricular; LVMI, LV mass index; LVH, LV hypertrophy; RWT, relative wall thickness; LVEDVi, LV end-diastolic volume index; LVESVi, LV end-systolic volume index; E, peak early diastolic velocity; A, peak late diastolic velocity; DT, deceleration time; e', mean peak early diastolic mitral annular velocity at the septal and lateral acquisition sites; LVEF, LV ejection fraction; LA, left atrial; LAVI, left atrial volume index. Quantitative variables are expressed as mean ± SD or as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as numbers (percentages).

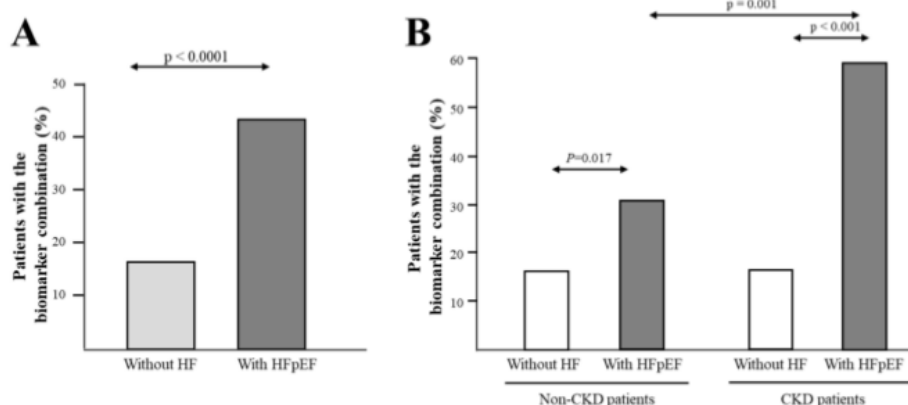


Figure 1. Frequency distribution of the combination of biomarkers of malignant myocardial fibrosis as defined in the text. (A) Panel A shows frequency distribution in all hypertensive patients classified according to the absence of heart failure (HF) or the presence of HF with preserved ejection fraction (HFpEF); (B) Panel B shows frequency distribution in patients without and with chronic kidney disease (non-CKD and CKD groups, respectively) classified in subgroups according to the absence of HF or the presence of HFpEF.

Unadjusted association analyses showed that the median-based biomarker combination of high PICP and low C1TP:MMP-1 ratio was associated with several clinical variables in all patients (Table 2). Among the comorbidities, the biomarker panel was associated with dyslipidemia, anemia, and CKD (Table 2). Taking into account all significant univariate associations, a basal model including the variables age, sex, cerebrovascular disease, atrial fibrillation, NYHA class, dyslipidemia, CKD, anemia, and treatment with MR blockers was selected following a backward stepwise selection procedure. Multiple logistic regression analyses showed that the association of the biomarker combination with anemia and CKD were independent of the other previously mentioned covariables (Table 2).

**Table 2.** Logistic regression analyses for the biomarker combination.

	Univariable Analyses		Multivariable Analysis	
	OR (95% CI)	<i>p</i> Value *	OR (95% CI)	<i>p</i> Value
Age, years	1.04 (1.02 to 1.07)	0.001	1.01 (0.98 to 1.04)	0.48
Male, <i>n</i> (%)	0.48 (0.30 to 0.77)	0.002	0.64 (0.37 to 1.11)	0.11
BMI, kg/m <sup>2</sup>	0.95 (0.90 to 1.00)	0.07		
SBP, mmHg	1.00 (0.99 to 1.01)	0.96		
DBP, mmHg	0.98 (0.96 to 1.00)	0.06		
MAP, mmHg	0.99 (0.97 to 1.01)	0.25		
HR, beats/min	0.99 (0.97 to 1.01)	0.24		
Previous cardiovascular history, <i>n</i> (%)				
Hospitalized within 12 months	2.46 (1.30 to 4.65)	0.006		
Cerebrovascular disease	3.52 (1.05 to 11.8)	0.042	1.97 (0.51 to 7.54)	0.32
Atrial Fibrillation	2.45 (1.36 to 4.44)	0.003	1.46 (0.75 to 2.86)	0.27
NYHA class (II–III)	2.86 (1.74 to 4.69)	<0.0001	1.43 (0.74 to 2.78)	0.29
Comorbidities, <i>n</i> (%)				
Obesity	0.71 (0.44 to 1.16)	0.17		
Dyslipidemia	1.81 (1.12 to 2.93)	0.016	1.45 (0.85 to 2.48)	0.17
Diabetes	0.70 (0.37 to 1.32)	0.27		
OSAHS	2.35 (0.90 to 6.15)	0.08		
COPD	2.88 (0.71 to 11.8)	0.14		
Anemia	2.68 (1.34 to 5.36)	0.005	2.24 (1.04 to 4.81)	0.039
CKD	1.97 (1.23 to 3.17)	0.005	1.87 (1.11 to 3.15)	0.018
Treatments, <i>n</i> (%)				
Beta blockers	2.25 (1.40 to 3.62)	0.001		
ACEI/ARB	1.25 (0.73 to 2.16)	0.42		
Diuretics	1.86 (1.16 to 3.00)	0.011		
MR blockers	2.43 (1.36 to 4.35)	0.003	1.52 (0.76 to 3.02)	0.24
Antidiabetic drugs	0.74 (0.38 to 1.44)	0.37		

HF means heart failure; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; eGFR, estimated glomerular filtration rate; NYHA, New York Heart Association; OSAHS, obstructive sleep apnea hypopnea syndrome; COPD; chronic obstructive pulmonary disease; CKD, chronic kidney disease; ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II type 1 receptor blockers; MR, mineralocorticoid receptor. \* *p* values <0.05 were selected followed by a backward stepwise selection with minimization of the Akaike information criterion (AIC) for the multivariable analysis.

Since CKD and anemia were independently associated with the combination of high PICP and low C1P:MMP-1 ratio and showed a higher prevalence in HFpEF patients, we investigated whether the association of the biomarker combination with HFpEF could be influenced by these factors. Qualitative interaction analyses showed that the prevalence of the combination of high PICP and low C1P:MMP-1 ratio in HFpEF patients was increased by CKD (*P* for interaction = 0.019). In fact, whereas the biomarker combination was present in 30.6% non-CKD patients with HFpEF (as compared with 16.6% non-CKD patients without HF), its prevalence increased up to 59.0% in CKD patients with HFpEF (as compared with 16.0% in CKD patients without HF) (Figure 1B). The interaction analysis with anemia was nonsignificant (*P* for interaction = 0.18). In addition, interaction analyses with other demographic factors and comorbidities showed non-significant *p* interaction values.

### 3.2. Findings in Patients Classified According to the Presence or Absence of CKD and Subcategorized According to the Absence of HF or the Presence of HFpEF

Clinical, biochemical, and echocardiographic characteristics of the four subgroups of patients are presented in Table 3. Of note, abnormal values of E:e' ratio and LAVI were more frequent in HFpEF patients as compared with non-HF patients, irrespectively of the presence or absence of CKD (*p* < 0.001). Interestingly, the increment in both E:e' ratio and LAVI was higher in CKD patients with HFpEF as compared with non-CKD patients with HFpEF (*p* ≤ 0.050, Table 3).

**Table 3.** Characteristics of patients classified according to presence or absence of CKD and with or without HFpEF.

	Non-CKD (N = 223)				CKD (N = 142)			
	Without HF (N = 151)	With HFpEF (N = 72)	p	Without HF (N = 81)	With HFpEF (N = 61)	p	p*	
Age, years	62.2 ± 9.7	73.3 ± 7.6	<0.001	62.5 ± 9.5	74.7 ± 7.8	<0.001	0.99	
Male, n (%)	95 (62.9)	23 (31.9)	<0.001	74 (91.4)	20 (32.8)	<0.001	0.92	
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.5 ± 4.1	29.0 ± 4.1	0.99	30.4 ± 5.2	29.3 ± 4.4	0.81	0.99	
SBP, mmHg	134 ± 17.6	138 ± 19.4	0.99	135 ± 19.8	133 ± 21.2	0.99	0.90	
DBP, mmHg	80.6 ± 9.9	75.9 ± 11.6	0.020	83.9 ± 10.9	73.7 ± 12.6	<0.001	0.71	
MAP, mmHg	98.5 ± 10.9	96.6 ± 12.6	0.99	101 ± 12.5	93.5 ± 14.4	0.002	0.87	
HR, beats/min	66.1 ± 11.3	69.8 ± 16.3	0.32	67.2 ± 11.3	67.8 ± 13.2	0.99	0.99	
Previous cardiovascular history, n (%)								
Hospitalized within 12 months	0 (0.0)	25 (34.7)		0 (0.0)	21 (34.4)		0.97	
Peripheral artery disease	2 (1.3)	4 (5.6)	0.09	0 (0.0)	1 (1.6)		0.37	
Cerebrovascular disease	2 (1.3)	3 (4.2)	0.33	0 (0.0)	6 (9.8)		0.30	
Atrial Fibrillation	4 (2.6)	23 (31.9)	<0.001	4 (4.9)	25 (41.0)	<0.001	0.28	
NYHA class								
I		16 (22.2)			13 (21.3)			
II		40 (55.6)			30 (49.2)		0.62	
III		16 (22.2)			18 (29.5)			
Comorbidities, n (%)								
Obesity	56 (37.1)	25 (34.7)	0.73	36 (44.4)	26 (42.6)	0.83	0.35	
Dyslipidemia	72 (47.7)	41 (56.9)	0.20	38 (46.9)	46 (75.4)	0.001	0.026	
Diabetes	32 (21.2)	13 (18.1)	0.59	8 (9.9)	14 (23.0)	0.033	0.48	
OSAHS	6 (4.0)	6 (8.3)	0.21	1 (1.2)	5 (8.2)	0.08	0.98	
COPD	0 (0.0)	2 (2.8)		0 (0.0)	6 (9.8)		0.09	
Anemia	12 (7.9)	11 (15.3)	0.09	2 (2.5)	12 (19.7)	0.001	0.50	
Treatments, n (%)								
Beta-blockers	26 (17.2)	55 (76.4)	<0.001	14 (17.3)	46 (75.4)	<0.001	0.90	
ACEI/ARB	105 (69.5)	56 (77.8)	0.20	59 (72.8)	50 (82.0)	0.20	0.55	
Diuretics	59 (39.1)	49 (68.1)	<0.001	28 (34.6)	51 (83.6)	<0.001	0.039	
MR blockers	7 (4.6)	25 (34.7)	<0.001	2 (2.5)	25 (41.0)	<0.001	0.46	
Antidiabetic drugs	29 (19.2)	11 (15.3)	0.48	6 (7.4)	14 (23.0)	0.008	0.26	

Table 3. Cont.

	Non-CKD (N = 223)			CKD (N = 142)			
	Without HF (N = 151)	With HFpEF (N = 72)	p	Without HF (N = 81)	With HFpEF (N = 61)	p	p*
<b>Biochemical parameters</b>							
ACR, mg/g	8.0 (4.9–12.4)	12.7 (5.8–19.3)	0.040	8.5 (4.2–37.8)	37.5 (19.5–47.6)	0.003	<0.001
eGFR, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	88.0 ± 15.4	74.2 ± 15.3	<0.001	56.3 ± 15.1	49.3 ± 13.0	0.034	<0.001
Hemoglobin, g/dL	14.6 ± 1.4	13.2 ± 1.4	<0.001	15.1 ± 1.2	13.2 ± 1.8	<0.001	0.99
NT-proBNP, pg/mL		256 (179–502)			464 (199–928)		0.029
PICP, ng/mL	60.4 (50.2–81.7)	81.6 (64.6–96.6)	<0.001	63.9 (50.1–78.1)	106 (88.1–136)	<0.001	<0.001
CITP:MMP-1 ratio	4.1 (2.3–7.3)	3.3 (1.8–5.7)	0.06	4.0 (2.3–6.3)	2.4 (1.2–4.4)	0.004	0.40
<b>Echocardiographic parameters</b>							
<b>LV morphology</b>							
LVMI, g/m <sup>2</sup>	111 ± 32.7	121 ± 26.9	0.08	114 ± 26.6	114 ± 28.0	0.98	0.84
L VH, n (%)	75 (49.7)	54 (75.0)	<0.001	41 (50.6)	40 (65.6)	0.08	0.26
RWT	0.40 ± 0.08	0.46 ± 0.09	<0.001	0.41 ± 0.07	0.49 ± 0.11	<0.001	0.035
RWT > 0.45, n (%)	40 (26.5)	37 (51.4)	<0.001	20 (24.7)	36 (59.0)	<0.001	0.38
LVEDVi, mL/m <sup>2</sup>	55.8 ± 17.8	40.0 ± 14.8	<0.001	62.9 ± 22.8	40.2 ± 11.7	<0.001	0.96
LVESVi, mL/m <sup>2</sup>	20.2 ± 8.4	14.2 ± 7.5	<0.001	22.7 ± 8.7	14.2 ± 6.9	<0.001	0.99
<b>LV function</b>							
E wave, cm/s	71.1 ± 15.1	79.3 ± 23.1	0.040	66.5 ± 17.0	86.9 ± 27.4	<0.001	0.028
E:A ratio	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.93	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.6	0.32	0.75
DT, ms	221 ± 62.6	230 ± 64.0	0.36	214 ± 76.3	225 ± 67.1	0.33	0.69
Mean e', cm/s	9.3 ± 2.5	7.0 ± 2.0	<0.001	9.1 ± 2.7	6.9 ± 1.7	<0.001	0.80
E:e' ratio	8.0 ± 2.2	12.5 ± 3.5	<0.001	7.8 ± 2.6	14.2 ± 4.9	<0.001	0.010
E:e' ratio > 15, n (%)	2 (1.3)	15 (20.8)	<0.001	1 (1.2)	22 (36.1)	<0.001	0.050
LVEF, %	64.0 ± 6.3	66.7 ± 7.9	0.050	62.9 ± 6.2	68.2 ± 8.4	<0.001	0.99
<b>LA morphology</b>							
LAVI, mL/m <sup>2</sup>	25.6 ± 7.5	29.7 ± 9.6	0.013	25.0 ± 6.1	38.1 ± 14.1	<0.001	0.001
LAVI > 34 mL/m <sup>2</sup> , n (%)	17 (11.3)	23 (31.9)	<0.001	7 (8.6)	33 (54.1)	<0.001	0.012

HF means heart failure; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; NYHA, New York Heart Association; OSAHS, obstructive sleep apnea hypopnea syndrome; COPD; chronic obstructive pulmonary disease; CKD, chronic kidney disease; ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II type 1 receptor blockers; MR, mineralocorticoid receptor; ACR, albumin to creatinine ratio; eGFR, estimated glomerular filtration rate; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PICP, carboxy-terminal propeptide of procollagen type I; CITP:MMP-1, carboxy-terminal telopeptide of collagen type I to serum matrix metalloproteinase-1 ratio; LV, left ventricular; LVMI, LV mass index; LVH, LV hypertrophy; RWT, relative wall thickness; LVEDVi, LV end-diastolic volume index; LVESVi, LV end-systolic volume index; E, peak-early diastolic velocity; A, peak-late diastolic velocity; DT, deceleration time; e', mean peak-early diastolic mitral annular velocity at the septal and lateral acquisition sites; LVEF, LV ejection fraction; LA, left atrial; LAVI, left atrial volume index. Quantitative variables are expressed as mean ± SD or as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as numbers (percentages). \* For comparisons between patients with HFpEF.

Serum PICP levels were increased in HFpEF patients compared with non-HF, irrespectively of the presence or absence of CKD. In addition, PICP was higher in CKD patients with HFpEF as compared with non-CKD patients with HFpEF (Table 3). Whereas no differences in the C1P:MMP-1 ratio were observed between non-CKD patients with and without HFpEF, this parameter was decreased in CKD patients with HFpEF as compared with non-HF patients (Table 3). As previously mentioned, the frequency of patients exhibiting the combination of high PICP and low C1P:MMP-1 ratio was higher ( $p < 0.001$ ) in CKD patients with HFpEF than in CKD patients without HF and non-CKD patients with HFpEF (Figure 1B).

The associations of the biomarker combination with the E:e' ratio and LAVI were first analyzed in all patients, categorized according to the presence or absence of CKD. Non-CKD patients with the biomarker combination ( $n = 47, 21.0\%$ ) exhibited similar E:e' ratio and LAVI values as compared with non-CKD patients without the combination (E:e' ratio  $10.3 \pm 3.5$  vs.  $9.3 \pm 3.4$ ,  $p = 0.09$  and LAVI  $29.4 \pm 12.0$  vs.  $27.2 \pm 10.1$  mL/m<sup>2</sup>,  $p = 0.25$ ). CKD patients with the biomarker combination ( $n = 49, 34.5\%$ ) exhibited higher E:e' ratio as compared with CKD patients without the combination ( $13.8 \pm 5.1$  vs.  $8.9 \pm 4.0$ ,  $p < 0.001$ ), whereas LAVI values were similar in the two group of patients ( $33.8 \pm 13.9$  vs.  $29.1 \pm 11.3$  mL/m<sup>2</sup>,  $p = 0.08$ ). The association of the biomarker combination with higher values of E:e' in CKD patients was independent of confounding factors (Table 4). Interestingly, this association was also present in the subgroup of CKD patients with HFpEF, and was independent of a basal model including sex, heart rate, NYHA class, and NT-proBNP (Table 5). In these patients, the proportion of variance in the E:e' variable explained by the basal model (R<sup>2</sup>) was 39.8%, which was increased up to 44.9% ( $p = 0.033$ ) by the addition of the biomarker combination.

Table 4. Linear regression analyses for the E:e' ratio in CKD patients.

	Univariable Analyses			Multivariable Analysis		
	Estimate (95%CI)	p*	Estimate (95%CI)	Partial R <sup>2</sup> (%)	p	
Age, years	0.21 (0.14 to 0.28)	<0.001	0.06 (−0.02 to 0.14)	0.98	0.13	
Male, (no = 0, yes = 1)	−5.58 (−7.07 to −4.10)	<0.001	−2.27 (−4.01 to −0.52)	2.76	0.011	
BMI, kg/m <sup>2</sup>	0.04 (−0.13 to 0.21)	0.65				
SBP, mmHg	−0.003 (−0.04 to 0.04)	0.88				
DBP, mmHg	−0.10 (−0.16 to −0.03)	0.003	0.02 (−0.05 to 0.08)	0.10	0.64	
HR, beats/min	−0.08 (−0.16 to −0.01)	0.026	−0.07 (−0.13 to −0.01)	2.50	0.017	
ACR (log <sub>2</sub> ), mg/g	0.32 (−0.05 to 0.70)	0.09				
eGFR, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	−0.05 (−0.10 to 0.009)	0.10				
Hospitalized within 12 months, (no = 0, yes = 1)	4.30 (2.08 to 6.53)	<0.001	−0.48 (−2.62 to 1.65)	0.08	0.65	
Cerebrovascular disease, (no = 0, yes = 1)	4.23 (−0.11 to 8.34)	0.054				
Peripheral artery disease, (no = 0, yes = 1)	−1.80 (−6.76 to 3.16)	0.47				
Atrial Fibrillation, (no = 0, yes = 1)	3.25 (1.26 to 5.24)	0.002	0.80 (−0.95 to 2.56)	0.35	0.37	
NYHA class (II-III), (no = 0, yes = 1)	6.58 (5.20 to 7.97)	<0.001	3.01 (0.94 to 5.07)	3.50	0.005	
Obesity, (no = 0, yes = 1)	0.83 (−0.85 to 2.50)	0.33	−0.01 (−1.46 to 1.44)	<0.01	0.99	
Dyslipidemia, (no = 0, yes = 1)	2.13 (0.47 to 3.79)	0.012				
Diabetes, (no = 0, yes = 1)	1.40 (−0.89 to 3.68)	0.23				
OSAS, (no = 0, yes = 1)	2.12 (−2.00 to 6.23)	0.31				
COPD, (no = 0, yes = 1)	2.40 (−1.72 to 6.51)	0.25				
Anemia, (no = 0, yes = 1)	3.75 (1.04 to 6.47)	0.007	−0.14 (−2.47 to 2.19)	0.01	0.90	
Beta-blockers, (no = 0, yes = 1)	4.97 (3.51 to 6.44)	<0.001	1.12 (−0.55 to 2.80)	0.74	0.19	
ACEI/ARB, (no = 0, yes = 1)	0.27 (−1.70 to 2.24)	0.79				
Diuretics, (no = 0, yes = 1)	4.00 (2.45 to 5.53)	<0.001	0.17 (−1.47 to 1.81)	0.02	0.84	
MR blockers, (no = 0, yes = 1)	5.25 (3.32 to 7.18)	<0.001	1.33 (−0.53 to 3.19)	0.83	0.16	
Biomarker combination, (no = 0, yes = 1)	4.98 (3.43 to 6.53)	<0.001	2.04 (0.51 to 3.56)	2.92	0.009	

Abbreviations as in Table 1. \* Variables with p < 0.05 were selected for the multivariable analysis.

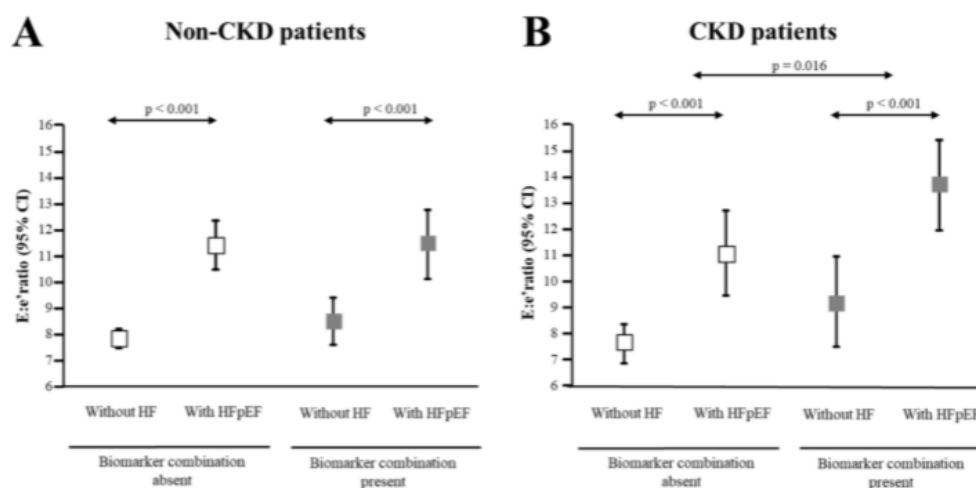


**Table 5.** Linear regression analyses for the E:c' ratio in CKD patients with HFpEF.

	Univariable Analyses			Multivariable Analysis		
	Estimate (95%CI)	p*	Estimate (95%CI)	Partial R <sup>2</sup> (%)	p	
Age, years	0.01 (-0.15 to 0.18)	0.87				
Male, (no = 0, yes = 1)	-2.60 (-5.26 to 0.05)	0.055	-2.23 (-4.46 to 0.001)	4.28	0.050	
BMI, kg/m <sup>2</sup>	0.09 (-0.21 to 0.38)	0.55				
SBP, mmHg	-0.01 (-0.07 to 0.05)	0.67				
DBP, mmHg	0.003 (-0.10 to 0.11)	0.96				
HR, beats/min	-0.14 (-0.23 to -0.05)	0.003	-0.15 (-0.23 to -0.07)	13.8	0.001	
ACR (log <sub>2</sub> ), mg/g	-0.48 (-1.76 to 0.80)	0.45				
eGFR, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	-0.03 (-0.12 to 0.07)	0.62				
NT-proBNP (log <sub>2</sub> ), pg/mL	4.15 (1.60 to 6.70)	0.002	3.95 (1.74 to 6.16)	13.6	0.001	
Hospitalized within 12 months, (no = 0, yes = 1)	-0.02 (-2.73 to 2.69)	0.99				
Cerebrovascular disease, (no = 0, yes = 1)	0.49 (-3.82 to 4.81)	0.82				
Peripheral artery disease, (no = 0, yes = 1)	0.05 (-5.02 to 5.11)	0.98				
Atrial Fibrillation, (no = 0, yes = 1)	-0.26 (-2.87 to 2.36)	0.84				
NYHA class (II-III), (no = 0, yes = 1)	3.63 (0.64 to 6.63)	0.018	1.99 (-0.61 to 4.59)	2.50	0.13	
Obesity, (no = 0, yes = 1)	0.70 (-1.89 to 3.29)	0.59				
Dyslipidemia, (no = 0, yes = 1)	1.45 (-1.51 to 4.41)	0.33				
Diabetes, (no = 0, yes = 1)	-0.66 (-3.71 to 2.39)	0.67				
OSAHS, (no = 0, yes = 1)	-0.69 (-5.37 to 4.00)	0.77				
COPD, (no = 0, yes = 1)	-1.53 (-5.83 to 2.77)	0.48				
Anemia, (no = 0, yes = 1)	-0.25 (-3.49 to 2.98)	0.88				
Beta-blockers, (no = 0, yes = 1)	2.62 (-0.29 to 5.53)	0.08				
ACEI/ARB, (no = 0, yes = 1)	0.68 (-2.66 to 4.02)	0.68				
Diuretics, (no = 0, yes = 1)	1.30 (2.16 to 4.76)	0.46				
MR blockers, (no = 0, yes = 1)	1.80 (-0.77 to 4.37)	0.17				
Biomarker combination, (no = 0, yes = 1)	2.72 (0.20 to 5.24)	0.035	2.27 (0.19 to 4.34)	5.06	0.033	

Abbreviations as in Table 1. \* Variables with  $p \leq 0.055$  were selected for the multivariable analysis.

We, thus, decided to analyze the influence of the biomarker combination on the E:e' ratio in both non-CKD and CKD patients stratified according to the absence or presence of HFpEF. As shown in Figure 2A, age and sex-adjusted analyses showed that in non-CKD patients, those with HFpEF exhibited higher E:e' ratio values than non-HF patients, irrespectively of the presence of the biomarker combination. However, in CKD patients the increase in E:e' ratio values observed in HFpEF patients was significantly higher in those presenting with the biomarker combination compared with patients without the combination (Figure 2B).



**Figure 2.** Distribution of the maximal early transmittal flow velocity in diastole (E) to the early mitral annulus velocity in diastole (septal and lateral average) (e') (E:e') ratio values. (A) Panel A shows values in the group of patients without chronic kidney disease (non-CKD patients); (B) Panel B shows values in the group of patients with CKD (CKD patients). Patients were further classified according to the presence or absence of the combination of biomarkers of malignant myocardial fibrosis as defined in the text and then to the absence of heart failure (without HF) or the presence of HF with preserved ejection fraction (with HFpEF). Symbols represent means and 95% confidence intervals adjusted for age and sex.

#### 4. Discussion

The main findings here reported are the following: (i) Hypertensive patients with HFpEF exhibit increased serum PICP levels and decreased serum C1P:MMP-1 ratio values as compared with hypertensive patients without HF; (ii) the prevalence of a combination of high serum PICP and low serum C1P:MMP-1 ratio is higher in hypertensive patients with HFpEF than in hypertensive patients without HF; (iii) the presence of CKD, but not of other comorbidities, enhances the association of the biomarker combination with HFpEF; and (iv) the biomarker combination associates with LVDD in patients with CKD, especially in those with HFpEF. Collectively, these findings suggest that alterations in collagen type I metabolism, as assessed by the biomarkers PICP and C1P:MMP-1 ratio, worsen with the transition to HFpEF in hypertensive patients, and that CKD facilitates the development of biomarker-assessed mMF and LVDD in hypertensive patients with HFpEF.

PICP is formed during the extracellular conversion of procollagen type I into mature fibril-forming collagen type I by the enzyme procollagen carboxy-terminal proteinase or bone morphogenetic protein-1 (PCP/BMP-1) and can reach the blood stream through tissue capillaries [18]. Several clinical studies have provided evidence that serum PICP is directly correlated with the amount of collagen deposition, namely collagen type I, in MF associated with HF attributable to arterial hypertension [5,19,20]. Therefore, it is tempting to speculate that the excess of serum PICP in hypertensive patients with HFpEF, as compared with hypertensive patients without HF here reported, could reflect an increase in myocardial synthesis and deposition of collagen type I fibers in parallel with the progression towards symptomatic HF in these patients.

The degree of collagen cross-linking is regulated by several enzymes, namely lysyl oxidase (LOX), and determines the resistance of collagen type I fibers to degradation by MMP-1, resulting in diminished cleavage of C1P [21]. As previously mentioned, we have shown that the serum C1P:MMP-1 ratio is inversely correlated with myocardial collagen cross-linking in patients with HF due to hypertension [3]. Therefore, the lower C1P:MMP-1 ratio in patients with HFpEF as compared with patients without HF here observed suggests that the cross-linking among collagen type I fibrils increases with the worsening of cardiac function in hypertensive patients.

Recently, we reported a histomolecular phenotype of MF characterized by the coincidence of extensive collagen type I deposition and excessive cross-linking in endomyocardial biopsies from one third of hypertensive patients with HF [4]. In the same study, we found that the combination of high serum PICP and low serum C1P:MMP-1 ratio was indicative of the concurrence of severe myocardial collagen type I deposition and abnormally high myocardial collagen cross-linking, respectively, in these patients [4]. The concurrence of extensive myocardial collagen type I deposition and excessive cross-linking in hypertensive patients with HF is associated with elevated filling pressures and mechanical stress of the failing left ventricle, as well as with HF hospitalization after enrollment or death from cardiovascular causes [4]. Furthermore, the biomarker combination of high serum PICP and low serum C1P:MMP-1 ratio is associated also with increased risk of HF hospitalization and mortality [4], as well as with atrial fibrillation [6]. Therefore, we proposed that in hypertensive patients with HF the biomarker combination identifies a histomolecular phenotype of MF with severe LV dysfunction and poor prognosis (i.e., mMF). In this study, by performing a median-based categorization we show that the prevalence of the biomarker combination increases two times in hypertensive patients with HFpEF and absence of CKD and up to four times in hypertensive patients with HFpEF and CKD as compared with their respective groups of hypertensive patients without HF. Therefore, CKD emerges as a comorbidity that could facilitate the development of mMF in HFpEF. This possibility could explain why CKD is independently associated with abnormal LV mechanics and adverse outcomes in patients with HFpEF [8].

Because of the high prevalence of MF in patients with CKD and the direct correlation existing between the degree of impairment of kidney function and the severity of MF [9–11], it has been proposed that pro-fibrotic factors or pathways linked to CKD could exist [22]. Although we did not investigate mechanisms of mMF in the current study, some experimental and clinical evidence point to the matricellular protein osteopontin as a potential candidate. On the one hand, osteopontin mediates the myocardial fibrotic response in experimental pressure overload [23] and associates with collagen type I deposition and cross-linking in hypertensive patients with HF [24], and patients with mMF exhibit the highest expression of osteopontin in the myocardium [25]. On the other hand, osteopontin predicts HF hospitalization and mortality in patients with HFpEF [22]. Finally, plasma osteopontin progressively increases with the decline in eGFR in patients with CKD [26] and is associated with cardiovascular mortality in these patients [27]. Further clinical studies are required to delineate the role of osteopontin in the development of mMF in CKD patients with HFpEF.

From the point of view of collagen type I metabolism, the inhibition of the PCP/BMP-1-LOX axis has been proposed as a potential tailored antifibrotic therapy in patients with mMF. In this regard, administration of torasemide in addition to standard HF therapy has been associated with reductions in myocardial collagen deposition and cross-linking in conjunction with decreased activation of PCP/BMP-1 and diminished expression of LOX [20,28,29]. Additionally, 80% of the torasemide-treated patients exhibited normalization of LV stiffness and improvement of LV function [29]. Of note, none of these effects were observed in furosemide-treated HF patients [20,28,29]. Whether CKD patients with HFpEF carrying the combination of high serum PICP and low serum C1P:MMP-1 ratio would benefit specifically from the antifibrotic properties of torasemide remains to be tested in an adequately designed trial.

Some limitations need to be acknowledged. First, the present study was a single-center transversal study with a small number of patients, which could have caused selection bias. Second, results

here presented cannot be extrapolated to non-hypertensive patients with HF or to hypertensive patients with HF and reduced or mid-range EF, or to patients with HFpEF with stage 5 CKD. Third, in this study, the presence of the biomarker combination has been analyzed by using the PICP and C1P:MMP1 medians rather than the cut-off points previously defined [4], since levels of PICP were lower and C1P:MMP1 values were higher in the patients here analyzed, suggesting the presence of a less severe myocardial fibrosis in terms of the quantity and quality of the collagen fiber as compared with the previously studied HF patients (including HFpEF and HF with reduced EF) [4]. As a consequence, the low frequency of the biomarker combination as defined in previous studies precluded the performance of subgroup analyses in the current study. In this regard, further studies should be performed to examine the correspondence between histological and biochemical aspects of MIF in different HF stages. Fourth, subgroup analyses are commonly considered as exploratory analyses with limited generalizability. Therefore, further analyses in large and independent cohorts of patients are necessary to confirm these findings. Fifth, potential problems related to multiplicity could have influenced the findings obtained. Finally, because they are descriptive in nature, the associations found between renal disease, circulating biomarkers, and LV dysfunction do not establish causality.

## 5. Conclusions

In conclusion, the prevalence of a biomarker combination of high serum PICP and low serum C1P:MMP-1 ratio that identifies a histomolecular phenotype of mMF is associated with CKD in hypertensive patients with HFpEF. In addition, there is an effect modification of CKD on the association of this biomarker combination with LVDD in HFpEF patients. There is a necessity to investigate the pathophysiological mechanisms linking the increased prevalence of the biomarker combination with CKD, as well as its association with poor outcome in larger cohorts of hypertensive patients with HFpEF, with and without CKD. The possibility exists that the biomarker combination could serve to select hypertensive patients with HFpEF and CKD subsidiary of a tailored treatment with torasemide on top of other HF medications.

**Author Contributions:** R.E., G.R.-G., B.L., and A.G. participated in the design, analysis and interpretation of data, drafting and final approval of the manuscript; J.J.G., O.B., I.C., and M.F.L., carried out data interpretation; S.R. performed statistical analyses; J.D. and S.R. participated in the conception, design, analysis and interpretation of data, drafting and revision of the manuscript and final approval and take responsibility that this study has been reported honestly, accurately and transparently, and that no important aspects have been omitted. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Dirección General de Industria, Energía e Innovación, Gobierno de Navarra, Spain (MINERVA; codes 0011-1411-2018-000053 and 0011-1411-2018-000044), the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (Instituto de Salud Carlos III grants CB16/11/00483 and PI18/01469 co-financed by FEDER funds), the European Commission FP7 Programme (HOMAGE project 2012-305507) and the ERA-CVD Joint Transnational Call 2016 LYMIT-DIS (AC16/00020).

**Acknowledgments:** We particularly acknowledge the patients for their participation and the Biobank of the University of Navarra for its collaboration. The authors thank Sonia Martínez, Maria J. González, Encarnación Echarte, and Maria Isabel Nieva for their valuable technical assistance.

**Conflicts of Interest:** On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

## References

1. González, A.; Schelbert, E.B.; Diez, J.; Butler, J. Myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Biological and translational perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *71*, 1696–1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Aoki, T.; Fukumoto, Y.; Sugimura, K.; Oikawa, M.; Satoh, K.; Nakano, M.; Nakayama, M.; Shimokawa, H. Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure. Comparison between preserved and reduced ejection fraction heart failure. *Circ. J.* **2011**, *75*, 2605–2613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. López, B.; Ravassa, S.; González, A.; Zubillaga, E.; Bonavilla, C.; Bergés, M.; Larman, M. Myocardial collagen cross-linking is associated with heart failure hospitalization in patients with hypertensive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *67*, 251–260. [[CrossRef](#)]

4. Ravassa, S.; López, B.; Querejeta, R.; Echegaray, K.; San José, G.; Moreno, M.U.; María, U.; Beaumont Francisco, J.; González, A.; Díez, J. Phenotyping of myocardial fibrosis in hypertensive patients with heart failure. Influence on clinical outcome. *J. Hypertens.* **2017**, *35*, 853–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. López, B.; Querejeta, R.; González, A.; Larman, M.; Díez, J. Collagen cross-linking but not collagen amount associates with elevated filling pressures in hypertensive patients with stage C heart failure: Potential role of lysyl oxidase. *Hypertension* **2012**, *60*, 677–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ravassa, S.; Ballesteros, G.; López, B. A combination of collagen type I-related circulating biomarkers is associated with atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2019**, *73*, 1398–1410. [[CrossRef](#)]
7. Damman, K.; Valente, M.A.; Voors, A.A.; O'Connor, C.M.; van Veldhuisen, D.J.; Hillege, H.L. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: An updated meta-analysis. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 455–469. [[CrossRef](#)]
8. Unger, E.D.; Dubin, R.F.; Deo, R.; Daruwalla, V.; Friedman, J.L.; Medina, C.; Shah, S.J. Association of chronic kidney disease with abnormal cardiac mechanics and adverse outcomes in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* **2016**, *18*, 103–112. [[CrossRef](#)]
9. Mall, G.; Huther, W.; Schneider, J.; Lundin, P.; Ritz, E. Diffuse intermyocardiocytic fibrosis in uraemic patients. *Nephrol. Dial. Transpl.* **1990**, *5*, 39–44. [[CrossRef](#)]
10. Charytan, D.M.; Padera, R.; Helfand, A.M.; Zeisberg, M.; Xu, X.; Liu, X.; Zeisberg, E.M. Increased concentration of circulating angiogenesis and nitric oxide inhibitors induces endothelial to mesenchymal transition and myocardial fibrosis in patients with chronic kidney disease. *Int. J. Cardiol.* **2014**, *176*, 99–109. [[CrossRef](#)]
11. Izumaru, K.; Hata, J.; Nakano, T.; Nakashima, Y.; Nagata, M.; Fukuhara, M.; Ninomiya, T. Reduced Estimated GFR and Cardiac Remodeling: A Population-Based Autopsy Study. *Am. J. Kidney Dis.* **2019**, *74*, 373–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, X.; Shapiro, J.I. Evolving concepts in the pathogenesis of uraemic cardiomyopathy. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 159–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fatema, K.; Hirono, O.; Masakane, I.; Nitobe, J.; Kaneko, K.; Zhang, X.; Kubota, I. Dynamic assessment of myocardial involvement in patients with end-stage renal disease by ultrasonic tissue characterization and serum markers of collagen metabolism. *Clin. Cardiol.* **2004**, *27*, 228–234. [[CrossRef](#)]
14. Shibasaki, Y.; Nishiue, T.; Masaki, H.; Tamura, K.; Matsumoto, N.; Mori, Y.; Iwasaka, T. Impact of the angiotensin II receptor antagonist, losartan, on myocardial fibrosis in patients with end-stage renal disease: Assessment by ultrasonic integrated backscatter and biochemical markers. *Hypertens. Res.* **2005**, *28*, 787–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ponikowski, P.; Voors, A.A.; Anker, S.D.; Bueno, H.; Cleland, J.G.; Coats, A.J.; Jessup, M. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 2129–2200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Levin, A.; Stevens, P.E.; Bilous, R.W.; Coresh, J.; De Francisco, A.L.; De Jong, P.E.; Levey, A.S. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney. Int.* **2013**, *3*, 1–150.
17. Lancellotti, P.; Cosyns, B. *THE EACVI Echo Handbook*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2016.
18. Prockop, D.J.; Kivirikko, K.I. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 403–434. [[CrossRef](#)]
19. Querejeta, R.; López, B.; González, A.; Sánchez, E.; Larman, M.; Martínez Ubago, J.L.; Díez, J. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: Relation to myocardial fibrosis. *Circulation* **2004**, *110*, 1263–1268. [[CrossRef](#)]
20. López, B.; Querejeta, R.; González, A.; Sánchez, E.; Larman, M.; Díez, J. Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *43*, 2028–2035. [[CrossRef](#)]
21. Shoulders, M.D.; Raines, R.T. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 929–958. [[CrossRef](#)]
22. Hulshoff, M.S.; Rath, S.K.; Xu, X.; Zeisberg, M.; Zeisberg, E.M. Causal connections from chronic kidney disease to cardiac fibrosis. *Semin. Nephrol.* **2018**, *38*, 629–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Frangogiannis, N.G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 635–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. López, B.; González, A.; Lindner, D.; Westermann, D.; Ravassa, S.; Beaumont, J.; Larman, M. Osteopontin-mediated myocardial fibrosis in heart failure: A role for lysyl oxidase? *Cardiovasc. Res.* **2013**, *99*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tromp, J.; Khan, M.A.; Klip, I.T.; Meyer, S.; de Boer, R.A.; Jaarsma, T.; Voors, A.A. Biomarker profiles in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e003989. [[CrossRef](#)]
26. Lorenzen, J.; Krämer, R.; Kliem, V.; Bode-Boeger, S.M.; Veldink, H.; Haller, H.; Kielstein, J.T. Circulating levels of osteopontin are closely related to glomerular filtration rate and cardiovascular risk markers in patients with chronic kidney disease. *Eur. J. Clin. Investig.* **2010**, *40*, 294–300. [[CrossRef](#)]
27. Barreto, D.V.; Lenglet, A.; Liabeuf, S.; Kretschmer, A.; Barreto, F.C.; Nollet, A.; Massy, Z. Prognostic implication of plasma osteopontin levels in patients with chronic kidney disease. *Nephron. Clin. Pract.* **2011**, *117*, c363–c372. [[CrossRef](#)]
28. López, B.; Querejeta, R.; González, A.; Beaumont, J.; Larman, M.; Díez, J. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension* **2009**, *53*, 236–242. [[CrossRef](#)]
29. López, B.; González, A.; Beaumont, J.; Querejeta, R.; Larman, M.; Díez, J. Identification of a potential cardiac antifibrotic mechanism of torasemide in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *50*, 859–867. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).