

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

FIBROSIS MIOCÁRDICA EN LA ESTENOSIS AÓRTICA:

CARACTERIZACIÓN DE SUS MECANISMOS BIOLÓGICOS Y
APROXIMACIÓN A UNA ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN NO INVASIVA.

FÉLIX VALENCIA SERRANO

DIRECTORES DE LA TESIS:

DR. EDUARDO DE TERESA GALVÁN

DRA. BEGOÑA LÓPEZ SALAZAR

MÁLAGA 2009



SPICUM
servicio de publicaciones

AUTOR: Félix Manuel Valencia Serrano

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar,
transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de
la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

A mis pacientes

Agradecimientos

Expresar mi agradecimiento a Eduardo de Teresa Galván y Javier Díez Martínez que sin su interés y liderazgo científico el presente trabajo no hubiera sido posible. A Begoña López Salazar por su inestimable ayuda en cada de una de las etapas de desarrollo del presente proyecto y sus sabios consejos.

A mi padre por haberme enseñado a encontrar la curiosidad científica y satisfacción personal en el quehacer cotidiano.

A Miguel Ángel Martínez González, maestro y amigo, por haberme enseñado la metodología de la investigación clínica y su verdadero sentido: el servicio al paciente.

A Juan José Gómez Doblaz, agradecerle su apuesta por el presente trabajo, a él le debo el soporte logístico necesario para realizar las investigaciones que aquí se recogen.

A todo el personal del Área del Corazón del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, en particular a todo el equipo quirúrgico por su desinteresada y generosa colaboración y a Isabel Rodríguez Bailón por la obtención de los estudios ecocardiográficos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Estenosis aórtica: aspectos generales	1
1.1. Definición	1
1.2. Epidemiología	1
1.3. Remodelado ventricular en la estenosis aórtica	2
1.3.1. <i>Alteraciones estructurales</i>	3
a. Cambios en los cardiomiocitarios	4
Hipertrofia	
Apoptosis	
b. Cambios en el intersticio	5
c. Cambios a nivel vascular	6
1.3.2. <i>Remodelado ventricular: ¿un mecanismo compensador?</i>	7
2. Fibrosis miocárdica: distribución y metabolismo del colágeno fibrilar en el miocardio	7
2.1. Distribución del colágeno fibrilar	8
2.2. Metabolismo del colágeno tipo I en el miocardio	11
2.2.1. <i>Síntesis y formación de la molécula de colágeno tipo I</i>	12
2.2.2. <i>Formación y depósito de la fibra del colágeno tipo I</i>	15
2.2.3. <i>Degradación de la fibra de colágeno tipo I</i>	15
2.3. Factores que regulan la homeostasis del colágeno en la estenosis aórtica	18
2.3.1 Potenciales mecanismos	18

2.4. Consecuencias clínicas de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica	20
2.4.1. <i>Función ventricular sistólica</i>	21
2.4.2. <i>Función ventricular diastólica</i>	22
2.4.3. <i>Otras potenciales implicaciones</i>	23
3. Evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica.	23
3.1. Patrón de referencia: Biopsia miocárdica.	24
3.2. Métodos no invasivos:	24
3.2.1. <i>Ecocardiografía</i>	24
3.2.2. <i>Resonancia magnética cardiovascular</i>	25
a. Realce tardío con gadolinio	25
b. Tiempo de recuperación de imágenes potenciadas en T1	26
3.2.3. <i>Métodos bioquímicos</i>	26
a. Fundamentos	26
b. Requisitos	27
c. Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I	28
d. Cociente MMP-1/TIMP-1	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Diseño del estudio	36
1.1. Población del estudio	36

2. Estudios clínicos	37
2.1. Evaluación clínica general	37
2.2. Estudio ecocardiográfico	37
2.2.1. <i>Índices de severidad de la estenosis aórtica</i>	39
2.2.2. <i>Masa y geometría ventricular izquierda</i>	40
2.2.3. <i>Índices de post-carga ventricular</i>	40
2.2.4. <i>Índices de función ventricular sistólica</i>	41
a. Fracción de eyección	
b. Fracción de acortamiento mesocárdica	
2.2.5. <i>Índices de función ventricular diastólica</i>	42
3. Estudio histomorfológico	42
3.1. Obtención y procesado de muestras	42
3.2. Determinación del colágeno fibrilar	43
3.2.1. <i>Determinación de la fracción de volumen de colágeno</i>	43
3.2.2. <i>Análisis de la distribución del colágeno fibrilar</i>	44
3.3. Determinación del grado de entrecruzamiento: ensayos colorimétricos	45
4. Estudios de biología molecular	46
4.1. Obtención y procesado de muestras	46
4.2. Cuantificación de proteínas	46
4.3. Cuantificación de ARNm	48
5. Estudios bioquímicos	49

5.1. Obtención y procesado de muestras	49
5.2. Determinación de las concentraciones séricas de:	49
<i>5.2.1. Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP)</i>	49
<i>5.2.2. Metaloproteinasa de matriz tipo I (MMP-1)</i>	50
<i>5.5.3. Inhibidor de la metaloproteinasa de matriz tipo I (TIMP-1)</i>	50
<i>5.5.4. Cociente Metaloproteinasa de matriz tipo I y su inhibidor (MMP:TIMP1)</i>	50
<i>5.5.5. NT-proBNP</i>	50
6. Análisis estadístico	51

RESULTADOS

1. Caracterización de la fibrosis miocárdica	55
1.1. Fracción de volumen de colágeno total	55
1.2. Distribución del colágeno fibrilar en el miocardio	56
2. Características de los grupos	57
3. Parámetros ecocardiográficos	59
3.1. Índices de severidad de la estenosis aórtica	60
3.2. Remodelado ventricular izquierdo	60
3.3. Función ventricular izquierda	60
4. Evaluación de la síntesis y degradación del colágeno tipo I a nivel miocárdico	61
4.1. Evaluación de la síntesis y formación de las moléculas de colágeno tipo I	61
<i>4.1.1. RNAm de la cadena $\alpha 1$ del procolágeno tipo I</i>	

4.1.2. <i>Expresión miocárdica del sistema de la proteinasa C del procolágeno tipo I</i>	
4.1.3. <i>Expresión miocárdica del enhancer de la proteinasa C del procolágeno tipo I</i>	
4.2. Formación y depósito de las fibras de colágeno tipo I en el miocardio	64
4.2.1. <i>Expresión miocárdica de la lisil-oxidasa</i>	
4.2.2. <i>Grado de entrecruzamiento del colágeno en el miocardio</i>	
4.3. Evaluación de la degradación de colágeno tipo I a nivel miocárdico	66
5. Evaluación de la síntesis y degradación del colágeno tipo I a nivel bioquímico: marcadores séricos del metabolismo del colágeno tipo I	67
5.1. Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP)	67
5.2. Metaloproteinasa de matriz tipo I (MMP-1)	68
5.3. Inhibidor de la metaloproteinasa de matriz tipo I (TIMP-1)	68
5.4. Cociente de la metaloproteinasa de matriz tipo I y su inhibidor (MMP1:TIMP1).	68
6. Análisis de asociaciones	69
6.1. Parámetros asociados con el sistema de síntesis y degradación del colágeno tipo I	69
6.1.1. <i>Características generales</i>	69
6.1.2. <i>Severidad de la estenosis aórtica</i>	70
6.1.3. <i>Índices de postcarga ventricular</i>	70
6.2. Asociación entre parámetros del metabolismo del colágeno y alteraciones estructurales	74
6.2.1. <i>Fracción de volumen de colágeno</i>	74

6.2.2. <i>Grado de entrecruzamiento</i>	75
6.3. Asociación entre alteraciones estructurales y función ventricular izquierda	76
6.3.1. <i>Índices de función ventricular sistólica</i>	76
6.3.2. <i>Índices de función ventricular diastólica</i>	77
6.4. Utilidad de los péptidos derivados del metabolismo del colágeno como posibles marcadores del metabolismo del colágeno en el miocardio	79
6.4.1. <i>PICP marcador de síntesis y depósito de colágeno en el miocardio</i>	79
6.4.2. <i>Origen cardiaco de los péptidos derivados del metabolismo del colágeno</i>	80
CONCLUSIONES	83
DISCUSIÓN	
1. Fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica	87
1.1. Presencia, distribución y grados	87
1.2. Determinantes biológicos	88
1.2.1. <i>Factores hemodinámicos: postcarga ventricular</i>	88
1.2.2. <i>Factores no hemodinámicos: edad y sexo</i>	89
1.3. Mecanismos moleculares	90
1.3.1. <i>Síntesis y formación de la molécula de colágeno tipo I</i>	90
a. mRNA de la cadena α 1-procolágeno	
b. Proteinasa C del procolágeno tipo I	
1.3.2. <i>Formación y depósito de la fibra del colágeno tipo I</i>	92

1.3.3. <i>Degradación del colágeno tipo I</i>	92
1.4. Consecuencias	93
1.4.1. <i>Relevancia clínica</i>	93
1.4.2. <i>Relevancia fisiopatológica</i>	94
a. Función ventricular diastólica	
b. Función ventricular sistólica	
2. Evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica	96
2.1. PICP es marcador de síntesis y depósito de colágeno tipo I	96
2.2. Cociente MMP-1/TIMP-1 es marcador de degradación del colágeno tipo I	97
3. Limitaciones	98
REFERENCIAS	102

ABREVIATURAS

EAo	Estenosis aórtica
MVI	Masa ventricular izquierda
GPR	Grosor parietal relativo
AVAo	Área valvular aórtica
iAVAo	Área valvular aórtica indexada a superficie corporal
PAS	Presión arterial sistólica
PAD	Presión arterial diastólica
cESS	Estrés circunferencial telesistólico
mESS	Estrés meridional telesistólico
MWS	Fracción de acortamiento mesocárdica
IC	Insuficiencia cardiaca
FVC	Fracción de volumen de colágeno
MEC	Matriz extracelular
PICP	Propéptido carboxi terminal del procolágeno tipo I
PCP	Proteinasa C del procolágeno tipo I
PCPE	Enhancer de la proteinasa C del procolágeno tipo I
LOX	Lisil oxidasa
MMP	Metaloproteinasa de matriz
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz

INTRODUCCIÓN

1. Estenosis aórtica: aspectos generales

1.1. Definición

La estenosis aórtica (EAo) del adulto es una enfermedad crónica caracterizada por el desarrollo lentamente progresivo de una obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo a nivel valvular. Generalmente se debe a un daño de carácter degenerativo, es secundaria a enfermedad reumática o a anomalías congénitas del aparato valvular. Su historia natural se caracteriza por la presencia de un largo periodo asintomático, siendo la aparición de síntomas un fenómeno tardío y con significado pronóstico desfavorable. Actualmente la única opción terapéutica eficaz demostrada es el reemplazo valvular.

1.2. Epidemiología

La EAo es la valvulopatía más frecuente en nuestro medio y la principal indicación de sustitución valvular.

La prevalencia de EAo severa es de un 2-2.2% de la población por encima de los 50-65 años, siendo aún mayor en los sujetos mayores de 75 años. Estos datos provienen de dos estudios, uno de carácter transversal y otro prospectivo, en poblaciones seleccionadas de forma aleatoria en Europa y en Estados Unidos, en los que se evaluó tanto la presencia como la severidad de la enfermedad mediante ecocardiografía-doppler (*Lindroos y cols.*, 1993; *Stewart y cols.*, 1997).

Los datos del EuroHeart Survey sobre enfermedades valvulares (*lung y cols.*, 2003) ponen de manifiesto que la EAo es la principal indicación de cirugía de sustitución valvular en nuestro medio, proporciona además las características generales de estos pacientes; sujetos en la séptima década de la vida, con una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión, diabetes o enfermedad coronaria asociada.

Aunque existen datos conflictivos (*Roberts y Ko.*, 2005), se acepta que la forma degenerativa es la causa más frecuente de EAo en la actualidad. Teniendo en cuenta la asociación epidemiológica con factores de riesgo

cardiovascular clásicos (*Stewart y cols.*, 1997) y su amplia distribución en la población general, su asociación fisiopatológica con la enfermedad arterial aterosclerótica (*Rajamannan y cols.*, 2003; *Freeman y Otto.*, 2005) y el envejecimiento progresivo de la población en los países desarrollados se espera que la incidencia de EAO crezca de forma exponencial en las próximas décadas (*Bermejo y Yotti.*, 2007).

1.3. Remodelado ventricular en la estenosis aórtica

La EAO, como ya se introdujo anteriormente, se caracteriza por el desarrollo progresivo de una obstrucción al flujo sistólico anterógrado del ventrículo izquierdo a nivel valvular. En sujetos sanos, el área valvular aórtica (AVA) es similar a la de la aorta ascendente, entre 3 y 4 cm². La enfermedad no tiene relevancia funcional hasta que el área valvular se reduce aproximadamente un 50%, momento en el que se hace patente un gradiente sistólico transvalvular significativo que permite preservar un volumen latido adecuado. Una vez que es hemodinámicamente significativa, el desarrollo progresivo de una geometría concéntrica y un aumento de la masa ventricular izquierda (MVI), permite la normalización de la postcarga y el mantenimiento de función ventricular efectiva dentro de la normalidad (*Grossman y cols.*, 1975), prolongado el periodo asintomático de la enfermedad.

De acuerdo con la ley de Laplace, el estrés parietal se relaciona de forma directa con la presión intraventricular y con las dimensiones ventriculares, y de forma inversa con el grosor relativo de la pared (GRP). La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) concéntrica se define como un aumento combinado del índice de MVI (IMVI), y del GRP. Por el contrario, el remodelado concéntrico se caracteriza por un GRP aumentado en presencia de un IMVI normal. La reducción en las dimensiones ventriculares y el incremento del GRP anulan el exceso de presión intraventricular asociado con la EAO (Figura 1).

Sin embargo no todos los pacientes con EA severa desarrollan HVI. Su prevalencia es variable en función del método de detección y de la población de sujetos estudiada. En pacientes con EA severa sintomática, el

porcentaje de HVI es superior al 70% por criterios ecocardiográficos (*Kupari y cols., 2005*), mostrando un patrón de remodelado ventricular concéntrico aquellos que no presentan HVI (*Seiler y Jenni., 1996; Griffith y cols., 1991*).

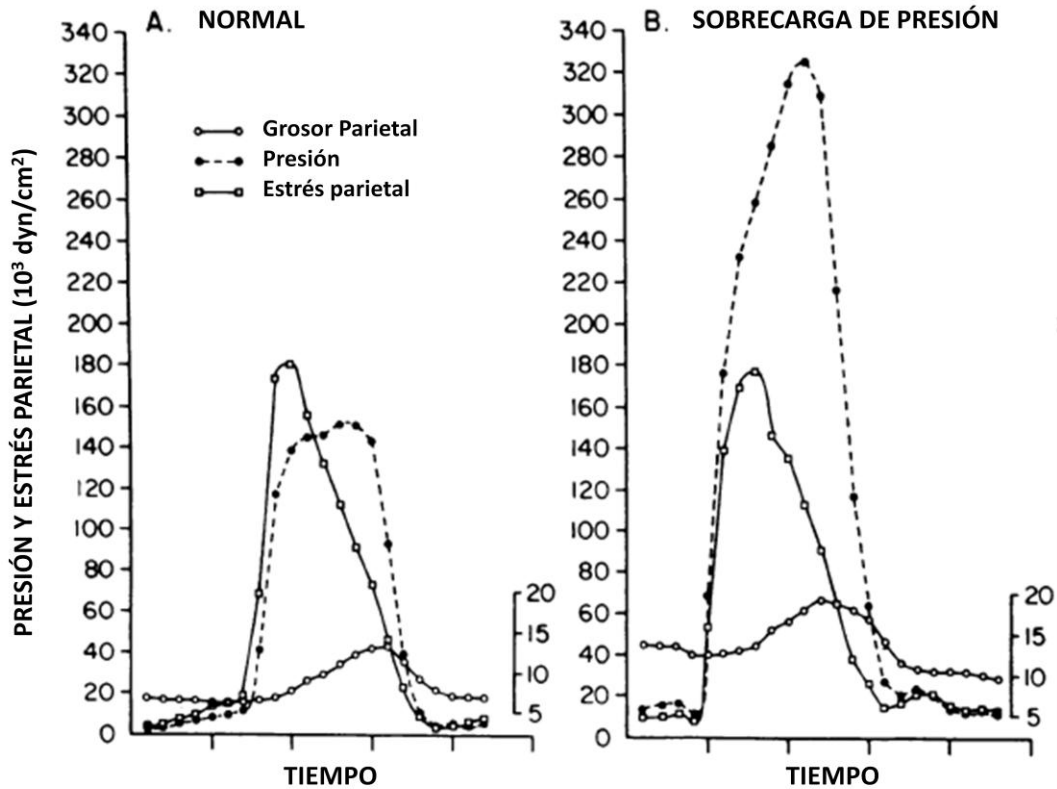


Figura 1. Comparación en los cambios de presión intraventricular, grosor parietal y estrés meridional a lo largo del ciclo cardiaco en un corazón sano y en un corazón sometido a sobrecarga de presión (Tomado de *Grossman y cols. 1975*).

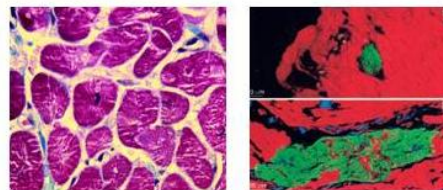
1.3.1. Alteraciones estructurales

En el contexto de la EA, la estructura del miocardio se modifica debido al crecimiento anormal del ventrículo izquierdo. Ese conjunto de modificaciones estructurales, se conoce con el nombre de remodelado ventricular y afectan a los distintos componentes del miocardio: cardiomiocitos, células no cardiomiocitarias, matriz extracelular (MEC) y vasos sanguíneos (Figura 2).

Componentes estructurales del remodelado ventricular en la estenosis aórtica.

Alteraciones cardiomiocitarias

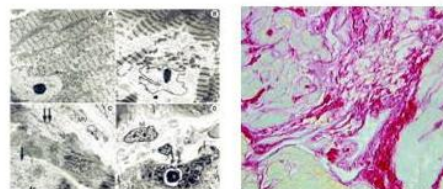
- Hipertrofia
- Cambios degenerativos
- Pérdida celular (apoptosis, oncosis)



Alteraciones intersticiales

Celulares

- Hiperplasia de fibroblastos
- Transformación en miofibroblastos
- Infiltrado inflamatorio de baja intensidad



No celulares

- Depósito de colágeno tipo I, III, fibronectina

Remodelado vascular

- Hipertrofia de arterias y arteriolas
- Disminución del número de capilares
- Aumento de la distancia de difusión.

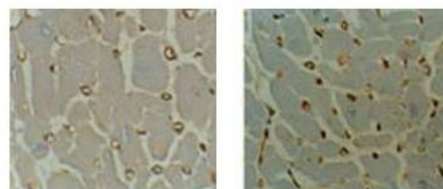


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes cambios estructurales que se producen en el miocardio ventricular de pacientes con estenosis aórtica.

a. Cambios en los cardiomiocitos

Hipertrofia

Una de las lesiones histológicas mejor descritas en relación con el remodelado ventricular en pacientes con EAo, es el aumento de tamaño de los cardiomiocitos (*Schaper y cols., 1981; Ritter y cols., 1988, Schwartzkopff y cols., 1992; Lund y cols., 1998*) por replicación en serie de los sarcómeros. En el miocardio de éstos pacientes se ha descrito de forma constante un aumento del diámetro transversal de los cardiomiocitos (*Krayenbuehl y cols., 1983*) y un aumento del tamaño y pérdida del aspecto fusiforme del núcleo celular (*Lund y cols., 1998*).

Cambios degenerativos

Además se producen cambios degenerativos evolutivos en los cardiomiocitos, apareciendo de forma precoz una pérdida preferencial de miofilamentos gruesos y proliferación focal de túbulos del retículo

sarcoplásmico (*Maron y cols., 1975; Maron y cols., 1975 bis*). En estadios avanzados aparece un daño miofibrilar extenso, una disminución del número de miofibrillas con aumento del número de mitocondrias y proliferación difusa del retículo sarcoplásmico (*Schwarz y cols., 1980; Schaper y cols., 1981*). La presencia de cardiomiocitos con cambios degenerativos avanzados se asocia con áreas de fibrosis marcada y pérdida de conexiones intercelulares (*Maron y cols., 1975 bis*).

Apoptosis

Por último, datos recientes demuestran la existencia de una pérdida cardiomiocitaria por apoptosis y oncosis en el miocardio de pacientes con EAO severa (*Hein y cols., 2003*), contribuyendo al deterioro estructural y funcional del ventrículo izquierdo de éstos pacientes.

b. Cambios a nivel intersticial

El intersticio miocárdico sometido de forma crónica a una sobrecarga de presión está expandido debido al aumento de sus elementos celulares y no celulares (*Olivetti y cols., 1994*).

En pacientes con EAO existe un aumento del contenido miocárdico de fibroblastos y miofibroblastos (*Polyakova y cols., 2004*). Estas células son fácilmente detectables por presentar unos núcleos celulares de menor tamaño que los de los cardiomiocitos. El origen de la hiperplasia de los fibroblastos está en el desequilibrio de las sustancias reguladoras del crecimiento celular existente en el miocardio de estos pacientes (*Fielitz y cols., 2001*), aunque también puede estar favorecida por la pérdida cardiomiocitaria (*Hein y cols., 2003*). Además está presente un infiltrado inflamatorio de baja intensidad compuesto por macrófagos y leucocitos activados (*Hein y cols., 2003*).

La principal alteración del componente intersticial es el depósito y acumulación del tejido fibroso que conduce a la distorsión de la proporción entre masa muscular y masa intersticial. Este proceso, denominado fibrosis miocárdica, y se caracteriza esencialmente por un exceso fundamentalmente de colágeno tipo I (*Polyakova y cols., 2004; Heymans y cols., 2005*) y tipo III

(*Heymans y cols.*, 2005), que son moléculas capaces de formar fibras (*Weber y cols.*, 1989), y que son sintetizadas fundamentalmente por los fibroblastos (*Sun y Weber*, 1996). Inicialmente predomina el depósito de fibras de colágeno alrededor de grupos de miocardiocitos (*Maron y cols.*, 1975), extendiéndose posteriormente alrededor de los vasos intramiocárdicas (*Heymans y cols.*, 2005) y el espacio intersticial (*Maron y cols.*, 1975 bis). En estadios avanzados aparecen depósitos de colágeno, sin un patrón concreto de distribución, asociados a áreas de degeneración cardiomiocitaria (*Maron y cols.*, 1975; *Hein y cols.*, 2003). Aunque la fibrosis miocárdica en pacientes con EAO es un proceso difuso, existe un gradiente de distribución transmiodiárdico, siendo más acusados estos cambios en la zona endocárdica y menos intensos en la epicárdica (*Villari y cols.*, 1993; *Heymans y cols.*, 2005).

Otros componentes de la MEC como la fibronectina se encuentran en exceso en el miocardio de pacientes con EAO severa (*Hein y cols.*, 2003; *Fielitz y cols.*, 2001).

c. Cambios a nivel vascular

La presencia de necrosis en bandas de contracción y vacuolización miocitaria subendocárdica sugieren la presencia de daño isquémico en el miocardio de pacientes con EAo, a pesar de no presentar lesiones significativas en las arterias coronarias epicárdicas (*Hutchins y cols.*, 1987). Aunque el diámetro de las arterias coronarias está aumentado en pacientes con EAo, el incremento en el diámetro de éstas es con frecuencia desproporcionado con la magnitud de los cambios en otros componentes miocárdicos, principalmente con el tamaño de los cardiomiocitos y magnitud de la hipertrofia (*Kaufmann y cols.*, 1996; *Villari y cols.*, 1992, *Marcus y cols.*, 1982; *Nadell y cols.*, 1983). Además en pacientes con EAo existe una disminución de la densidad de la red microvascular y un incremento de la distancia de difusión (*Julius y cols.*, 1997).

Otros factores potencialmente responsables de la reducción del flujo sanguíneo subendocárdico, y por tanto del daño isquémico no relacionado con lesiones coronarias significativas en estos pacientes, son la disminución

del tiempo de perfusión diastólica, alteraciones en la relajación diastólica precoz y el incremento del estrés parietal (Gouls, 1997).

1.3.2. Remodelado ventricular: ¿un mecanismo compensador?

Hoy en día, la visión clásica del remodelado ventricular como paradigma compensador del exceso de postcarga en pacientes con EAo, sigue vigente. Sin embargo, diversas observaciones en modelos animales de sobrecarga crónica de presión, así como hallazgos clínicos en pacientes con EAo, ponen en tela de juicio ésta visión clásica.

En modelos experimentales de sobrecarga crónica de presión, la inhibición del desarrollo de HVI, ya sea mediante modificaciones genéticas o farmacológicas, no se acompaña necesariamente del deterioro de la función ventricular sistólica, a pesar del consiguiente aumento en el estrés parietal, lo que sugiere que el corazón se puede adaptar a la sobrecarga de presión sin incremento significativo de la MVI, del desarrollo de hipertrofia cardiomiocitaria o del remodelado intersticial (Bartunek y cols., 2000; Hill y cols., 2000; Esposito y cols., 2002; Hill y cols., 2002; Antos y cols., 2003).

En pacientes con EAo el remodelado ventricular tiene consecuencias fisiopatológicas adversas a medio plazo, dando lugar a una disminución de la distensibilidad ventricular (Pellika y cols., 2005) y al desarrollo de disfunción ventricular diastólica (Kupari y cols., 2005), lo que se asocia con la aparición de síntomas (Hess y cols., 1981), el desarrollo de insuficiencia cardiaca (IC) clínica (Hess y cols., 1983), así como con peores resultados quirúrgicos a corto y medio plazo tras la cirugía de sustitución valvular.

2. Fibrosis miocárdica: distribución y metabolismo del colágeno fibrilar en el miocardio

Aproximadamente el 17% del miocardio ventricular (Popescu y cols., 2006) está constituido por MEC. Las proteínas estructurales de la matriz son elementos determinantes de la morfología funcional del miocardio y de sus alteraciones. Aunque la MEC en el miocardio está formada por distintas moléculas (colágeno, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos), el

colágeno fibrilar es su principal componente. Como ya se ha apuntado previamente, la fibrosis miocárdica, o acumulación exagerada del colágeno fibrilar que forma la MEC, es una de las características patológicas definitorias del remodelado estructural que sufre el miocardio en pacientes con EAO. Estudios post-mortem realizados en corazones humanos sometidos a sobrecarga crónica de presión (*Tanaka y cols.*, 1986; *Olivetti y cols.*, 1994; *Rossi*, 1998) han demostrado que la fracción de volumen del miocardio ocupada por fibras de colágeno tipo I y III (FVC) está anormalmente incrementada.

2.1. Distribución del colágeno fibrilar

Por definición, una molécula de colágeno es una proteína estructural de la MEC que contiene al menos un dominio con conformación característica de triple hélice (*Van Der Rest y cols.*, 1991), formada por tres cadenas polipeptídicas (α -cadenas). Los distintos tipos de colágeno 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 (*Van Der Rest y Bruckner*, 1993; *Vuorio y De Crombugghe*, 1990).

El colágeno fibrilar es el responsable del mantenimiento de la alineación de los cardiomiocitos durante el ciclo cardiaco, y da soporte estructural a los vasos coronarios en su recorrido en el intersticio. Las fibras de colágeno que interconectan los cardiomiocitos mantienen la integridad mecánica y facilitan la transmisión de la fuerza generada durante la contracción (*Caulfield y Borg*, 1979). Además, la energía elástica almacenada en las fibras de colágeno durante la contracción interviene en la relajación y el llenado diastólico ventricular (*Factor y Robinson*, 1988).

La matriz miocárdica de colágeno está en continuidad anatómica con el anillo fibroso valvular y las cuerdas tendinosas (*Robinson y cols.*, 1988). La geometría y anclajes del colágeno fibrilar, las concentraciones y el grado de entrecruzamiento de sus fibras, son determinantes de las propiedades mecánicas del miocardio. El colágeno se distribuye en la MEC

en diferentes estructuras denominadas “epimisio”, “perimisio” y “endomisio” (Figura 3).

Epimisio: el epimisio está formado por un entramado de colágeno fibrilar que se dispone a lo largo de las superficies endocárdica y epicárdica del miocardio. En el endocardio, el epimisio se encuentra por debajo de la barrera celular-lámina basal. Una de sus funciones es proteger las fibras musculares y sus unidades sarcoméricas del sobre-estiramiento al que están expuestas durante el ciclo cardiaco (*Robinson y cols., 1983*).

Perimisio: Desde el epimisio las fibras perimisiales se extienden en el miocardio en los espacios entre las bandas musculares (*Robinson y cols., 1988*). Las fibras perimisiales interconectan y rodean las bandas musculares. El perimisio previene el deslizamiento y mal-alineamiento de las bandas musculares, y facilita la transmisión de fuerzas entre ellas (*Factor y Robinson, 1988; Robinson y cols., 1988*). Las fibras perimisiales se disponen de forma paralela a las musculares sin alterar la rigidez miocárdica, siempre que su longitud máxima no se sobrepasa, y almacenan energía durante la contracción miocárdica contribuyendo a la restauración de la longitud de los cardiomiocitos durante la relajación ventricular (*Factor y Robinson, 1988*).

Endomisio: el colágeno endomisial forma un entramado que rodea los cardiomiocitos de forma individual (*Caulfield y Borg, 1979*). Las fibras endomisiales conectan a los cardiomiocitos entre sí y a los vasos sanguíneos y linfáticos presentes en la vecindad, contribuyendo así a la integridad anatómica y arquitectural de los cardiomiocitos. Al igual que las fibras perimisiales, las fibras endomisiales participan en el mantenimiento de la alineación de los cardiomiocitos y previenen su deslizamiento (*Factor y cols., 1988*).

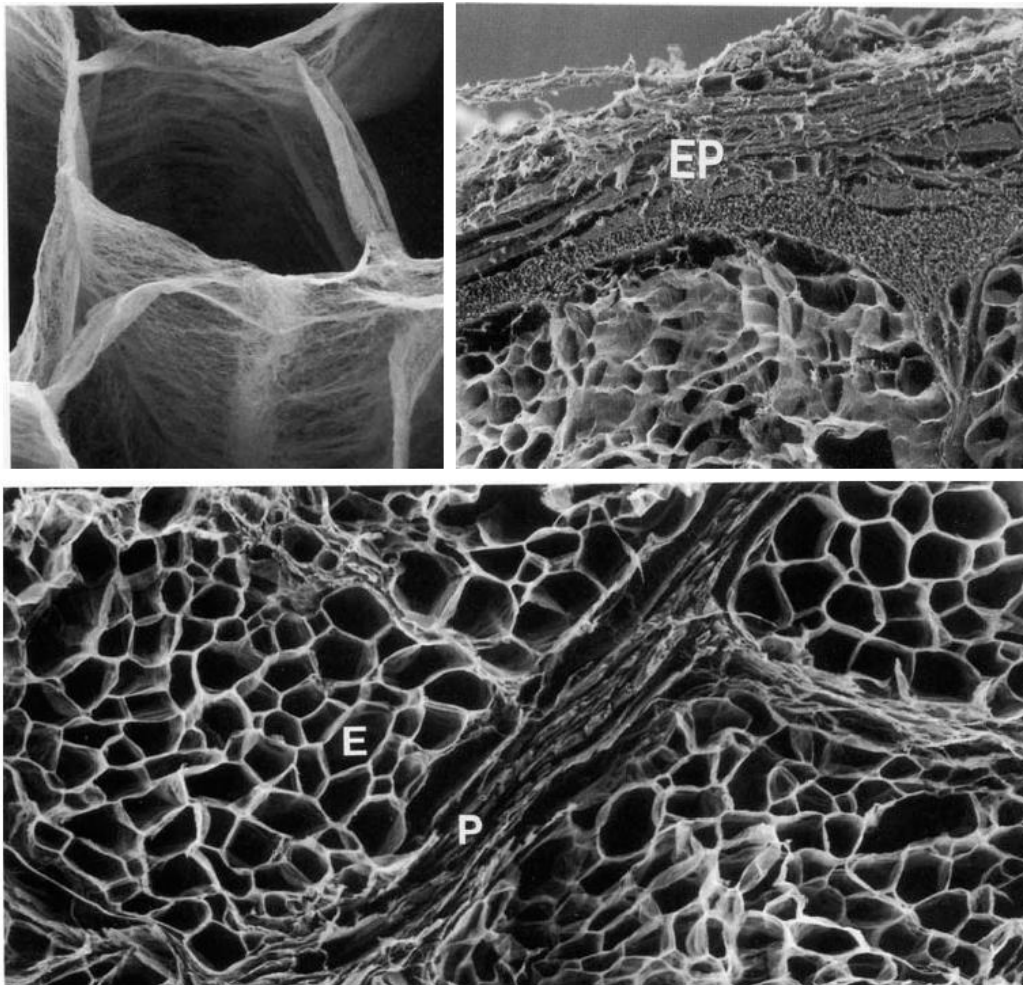


Figura 3. Epimisio (EP), perimisio (P) y endomisio (E) en imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (Tomado de *Nishimura y cols* 1994).

Los tipos de colágeno que forman el grupo de colágeno fibrilar, capaces de formar fibras, son los colágenos tipo I, II, III, V y XI. El colágeno tipo I está presente en la mayoría de los tejidos, y es la proteína más abundante en el organismo humano. El colágeno tipo III es el segundo tipo de colágeno más común, y se encuentra en asociación con el colágeno tipo I, excepto en los huesos, los cuales contienen casi únicamente colágeno tipo I. De entre todos los tipos de colágeno presentes en el corazón humano (Tabla 1), el colágeno tipo I constituye entre el 80-90 % de las fibras de colágeno que se acumulan en el miocardio enfermo (*Querejeta y cols*, 2004).

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de colágeno presentes en el miocardio.

Tipo	Cadena α predominante	Apariencia estructural	Cromosoma
I	COL1A1, COL1A2	Fibrilar, constituye fibras peri y epimisiales	17q21.3-q22 7q21.3-q22
III	COL3A1	Fibrilar, constituye fibras peri y epimisiales	2q24.3-31
IV	COL4A1, COL4A6	Membrana basal	13q34 Xq22
VI	COL6A1, COL6A3	No-fibrilar, adhesión	21q22.3 2q37

Tipos de colágeno en el miocardio humano, composición y apariencia estructural.

2.2. Metabolismo del colágeno tipo I en el miocardio

El mantenimiento de la homeostasis de la MEC implica la síntesis y la degradación de sus principales componentes, fundamentalmente del colágeno fibrilar tipo I. El colágeno tipo I es una molécula dinámica, cuyo ciclo biológico para formar la fibra de colágeno que se deposita en el miocárdico, se puede dividir conceptualmente en tres fases (Figura 4):

- 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.

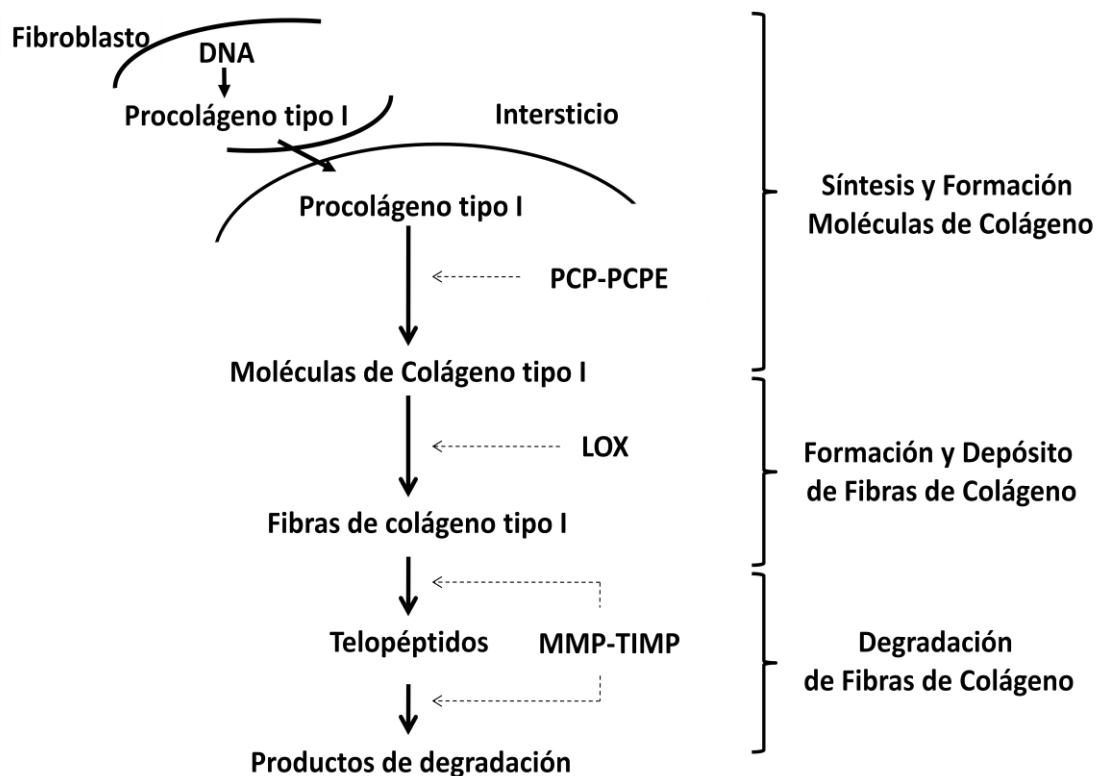


Figura 4. Diagrama representativo del ciclo del colágeno fibrilar tipo I. PCP; proteinasa C del procolágeno, PCPE; enhancer de la PCP, LOX; lisil-oxidasa, MMP-TIMP; sistema de metaloproteinasas y sus inhibidores.

2.2.1. Síntesis y formación de la molécula de colágeno tipo I

Diferentes células presentes en el miocardio humano (fibroblastos, células musculares lisas o endoteliales) pueden sintetizar colágeno, aunque la principal fuente del mismo son los fibroblastos. Los genes que codifican para las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ del colágeno tipo I están localizadas en los cromosomas 17 y 7, respectivamente. A pesar de localizarse separados uno del otro, la expresión de los dos genes está en condiciones normales co-regulada.

Inicialmente, al igual que otros tipos de colágeno fibrilar, el colágeno tipo I se sintetiza intracelularmente. La biosíntesis de colágeno sigue un patrón normal de síntesis de proteínas, pero difiere de la biosíntesis de muchas proteínas en que las nuevas cadenas α sufren un gran número de modificaciones post-traduccionales (*Kivirkko y Myllyla, 1987*). Una vez sintetizadas las cadenas α se ensamblan para formar moléculas de triple hélice, siendo posteriormente secretadas al espacio extracelular en forma de

procolágeno tipo I (Figura 5), precursor altamente soluble del colágeno tipo I (*Prockop y cols., 1979*). La molécula de procolágeno tipo I está constituida por tres elementos principales: un propéptido aminoterminal de 35 kDa, la futura molécula de colágeno tipo I de 139 kDa y un propéptido carboxi-terminal de 100 kDa. Las moléculas de procolágeno tipo I son incapaces de incorporarse a la red del colágeno fibrilar de la MEC hasta haber sufrido una serie de modificaciones extracelulares (*López y cols., 2005*). Dichas modificaciones obedecen a la pérdida de sus extremos amino y carboxi-terminales para dejar libre la molécula de colágeno tipo I.

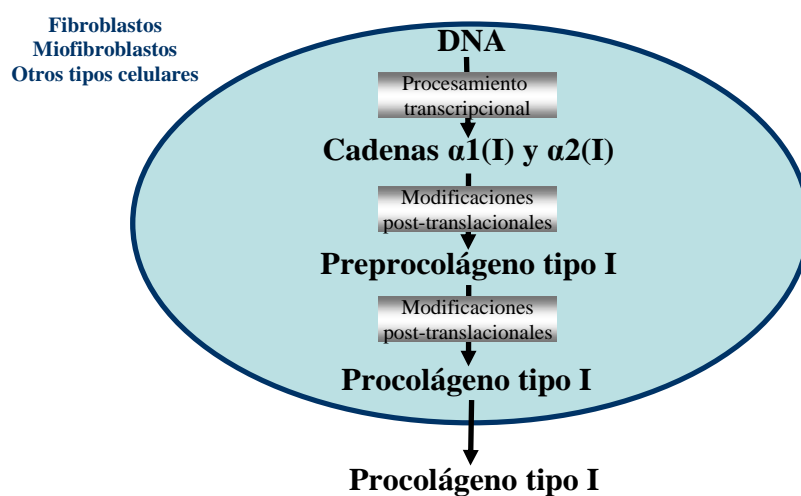


Figura 5. Síntesis y secreción del procolágeno tipo I

En concreto el procolágeno tipo I es procesado a colágeno tipo I por la endopeptidasa carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PCP) que hidroliza el péptido de 100 KDa del extremo carboxi-terminal del procolágeno: el propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I o PICP (Figura 6) y la endopeptidasa amino-terminal del procolágeno tipo I (PNP) que hidroliza el extremo amino-terminal (*Prockop y cols., 1998*). Se desconoce la función de los propéptidos, pero puede que actúen como moduladores del ensamblaje fibrilar o regulen retroactivamente la síntesis de precursores (*Fleischmajer y Perlish, 1986*). En cualquier caso los propéptidos, abandonan el espacio intersticial a través de los conductos linfáticos o cruzando la pared capilar (*Jensen y cols., 1992*). Una vez alcanzada la circulación sanguínea, el hígado

En condiciones patológicas, tanto los fibroblastos cardiacos como los cardiomiocitos, son capaces de sintetizar PCP y PCPE (López y cols, 2007). El potenciador de la enzima se sintetiza como una proteína de 55 kDa, pero puede estar presente como forma proteica completa o como un fragmento proteolítico de 36 kDa, siendo ambas formas igualmente activas (Adar y cols., 1986; Kessler y Adar, 1989). Por su parte, la PCP se sintetiza como proteína inactiva de 112 kDa (zimógeno) y es hidrolizada intracelularmente para dar lugar a la forma activa de 96 kDa (Bode y cols., 1992)

2.2.2. Formación y depósito de la fibra de colágeno tipo I

Una vez formadas las moléculas de colágeno tipo I en el intersticio, éstas se ensamblan con otras moléculas de colágeno mediante la formación de enlaces espontáneos, dando lugar a cadenas polipeptídicas de moléculas de colágeno (ensamblaje) (Figura 7). A su vez, las cadenas polipeptídicas adyacentes pueden establecer enlaces covalentes entre sí, permitiendo la formación de fibras de colágeno menos solubles y resistentes a las enzimas proteolíticas (entrecruzamiento) (López y cols., 2009) (Figura 7). Para que se produzcan estas reacciones químicas es necesario que la actividad de la enzima lisil oxidasa (LOX), que cataliza la oxidación de los grupos ϵ -amino en los residuos lysina e hidroxilysina de las moléculas de colágeno con la formación de los correspondientes grupos aldehído (Kagan, 1986; Kagan y Trackman, 1992). Estos grupos aldehído pueden formar enlaces espontáneos o establecer enlaces covalentes entre sí o con otros grupos ϵ -amino, permitiendo el ensamblaje y entrecruzamiento y por tanto, la formación y el depósito de las fibras de colágeno (Kagan, 1986; Kagan y Trackman, 1992; Uzel y cols., 2001) (Figura 7).

En condiciones patológicas, la enzima LOX es sintetizada, tanto por los fibroblastos como por los cardiomiocitos (López y cols, 2009), como un precursor inactivo, prolil-LOX, el cual es transformado posteriormente a su forma activa LOX (Trackman, 1992).

Es importante destacar que la actividad de ésta enzima está regulada por la PCP, que es capaz de convertir la prolil-LOX en LOX (Cronshaw y cols., 1995; Panchenko y cols., 1996). Por lo tanto, el sistema de la PCP y su

potenciador, juega un papel crítico tanto en formación de las moléculas de colágeno tipo I, como la posterior formación y depósito de las fibras de colágeno tipo I en el miocardio.

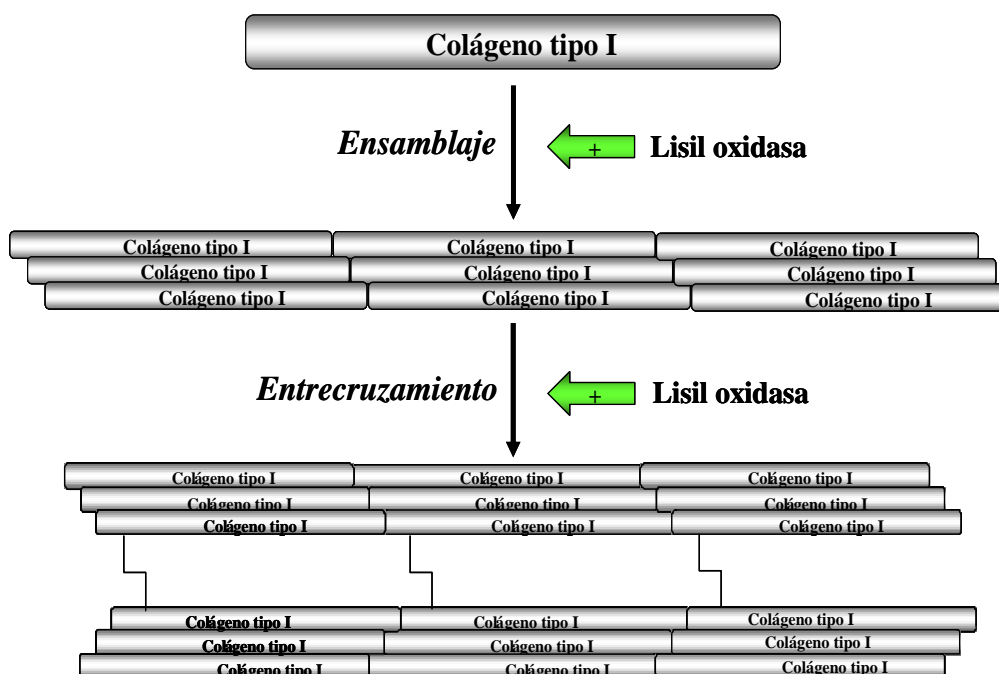


Figura 7. Procesos de ensamblaje y entrecruzamiento de las moléculas de colágeno tipo I para la formación de la fibra de colágeno tipo I final que se deposita en el miocardio.

2.2.3. Degradación de la fibra de colágeno tipo I

Aunque las fibras de colágeno tipo I depositadas son fibras muy robustas, tras 100-110 días, son degradadas por la acción consecutiva de diferentes enzimas de la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMPs). El primer paso de este proceso, es la degradación de cada una de las moléculas de colágeno tipo I que forman la fibra en en dos fragmentos: un telopéptido grande equivalente al 75% de la molécula y un telopéptido pequeño equivalente al 25% restante (Figura 8), merced a la acción de la MMP tipo 1 (MMP-1) o colagenasa, siendo éste el paso limitante del proceso (*Denhart y cols.*, 1993; *Alexander y Werb*, 1991). El péptido de mayor tamaño, es degradado en péptidos de gelatina, que a su vez son degradados a pequeños péptidos por la acción adicional de otras MMPs, las gelatinasas, en concreto

la MMP-2 y -9. El péptido de menor tamaño (12 kDa) es el telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I, que pasa a la sangre (*Risteli y cols.*, 1993) (Figura 8).

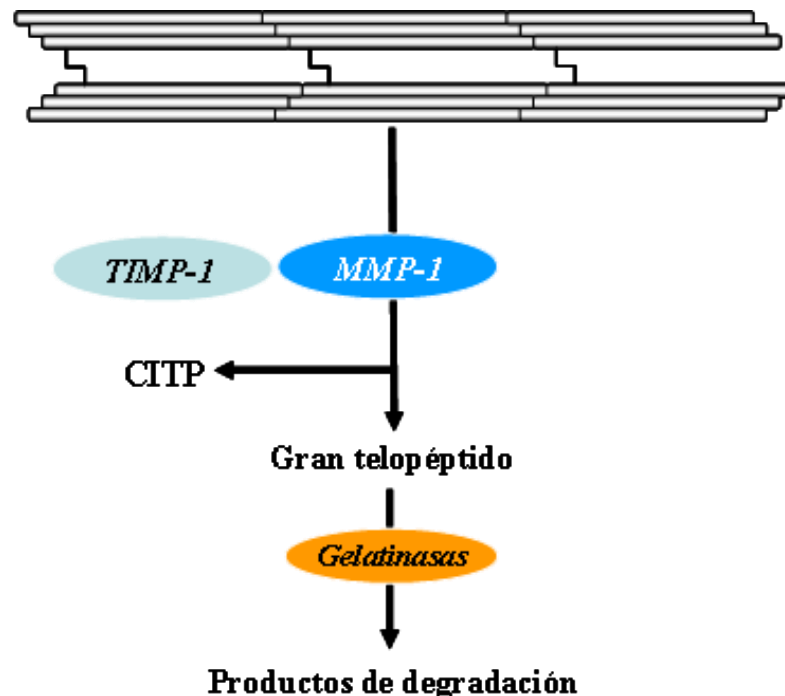


Figura 8. Proceso de degradación de las fibras de colágeno tipo I.

Aunque las principales células encargadas de sintetizar MMP-1 en el corazón, son los fibroblastos y miofibroblastos, en condiciones patológicas los cardiomiocitos son fuente productora de dicha enzima (*López y cols.*, 2006). La MMP-1 se sintetiza como un precursor zimogénico inactivo, que requiere una escisión proteolítica para ser activa. La colagenasa activa se puede inhibir por la interacción con 4 inhibidores tisulares específicos de las MMPs (TIMPs) (*Denhardt y cols.*, 1993). Por lo tanto, la La regulación de la actividad de la MMP-1 es un proceso complejo que se produce a diferentes niveles: activación de la transcripción, conversión del zimógeno en la forma activa e inhibición directa de su actividad enzimática. El inhibidor tisular más específico de la MMP-1, es el tipo 1 (TIMP-1), e interfiere tanto en la conversión en la forma activa como en la inhibición directa de su actividad, siendo por tanto uno de los elementos principales implicado en la regulación de la actividad proteolítica de esta MMP. Por lo tanto al actividad neta de la MMP-1, depende no solo de las concentraciones relativas de la forma activa

de la enzima, sino también de la las concentración de su inhibidor tisular (*Dollery y cols.*, 1995).

2.3. Factores que regulan la homeostasis del colágeno tipo I en la estenosis aórtica

La homeostasis del colágeno fibrilar, al igual que del resto de componentes de la MEC, implica un balance equilibrado entre su síntesis, depósito y degradación (Figura 9) (*Laurent*, 1987). En condiciones normales los factores que inciden sobre ese balance se regulan recíprocamente. Una alteración de esta relación podría propiciar el predominio de la síntesis (con el resultado del desarrollo de fibrosis miocárdica), de la degradación (con el resultado de disrupción de la red de colágeno).

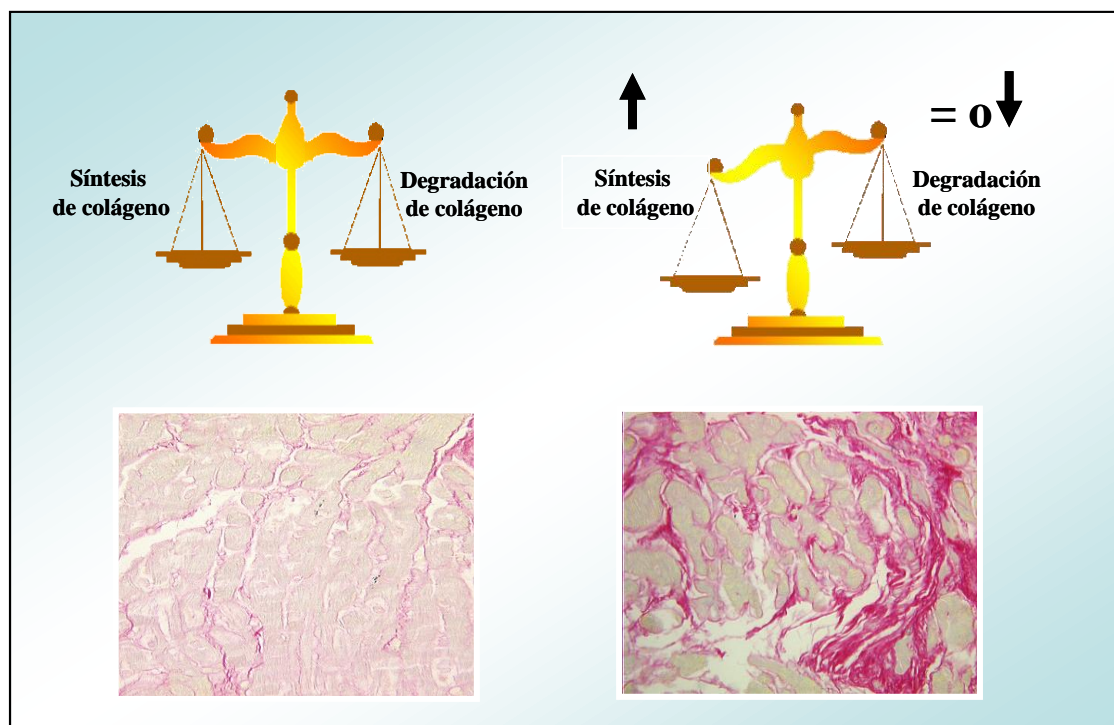


Figura 9. Un balance desequilibrado entre la síntesis y la degradación de las moléculas de colágeno resulta en el desarrollo de la fibrosis miocárdica.

2.3.1. Potenciales mecanismos

Múltiples factores de crecimiento celular, citoquinas y hormonas se deben considerar como potenciales promotores de la hiperplasia de los fibroblastos y de la síntesis aumentada de colágeno por parte de los mismos (Tabla 2: factores profibróticos). Dichos factores utilizan diferentes vías de transducción

de señal, receptores acoplados o no a tirosín kinasas, proteína G acoplada a receptores transmembrana, receptores de citoquinas e integrinas, y una conjunto de protein-kinasas (protein-kinasa C, MAP kinasas, JAK/STAT kinasas) (*Booz y Baker, 1995*), que finalmente modifican la expresión génica de las diferentes proteínas que serán responsables de las modificaciones del fenotipo de la MEC. Algunas de estas vías de señalización y moléculas implicadas en la regulación del metabolismo del colágeno están estimuladas en pacientes con EAo y se han asociado con la magnitud de la producción de colágeno, principalmente el sistema renina angiotensina aldosterona local y el factor transformante B.

Tabla 2. Factores que regulan el metabolismo del colágeno fibrilar en el miocardio

Factores profibróticos	Factores antifibróticos
Angiotensina II	Bradikinina
TGF- β	Prostaglandinas
Aldosterona	Oxido nítrico
Endotelina-1	Péptidos natriuréticos
Catecolaminas	TNF- α
Interleukina-1	Interferon gamma
Moléculas de adhesión	Glucocorticoides
Osteopontina	

TGF- β , factor de crecimiento transformante-beta; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa.

Los reguladores más importantes de la fibrosis miocárdica son los componentes del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Además, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un estimulador potente de la fibrosis miocárdica. *Fielitz y cols. (2001)* encontraron una activación de ambos en el miocardio de pacientes con EA. En este estudio, la expresión miocárdica de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se asociaba directamente con la expresión miocárdica del TGF- β 1, y este a su vez, se asociaba directamente con la expresión de colágeno tipo I y III, sugiriendo la implicación directa del SRAA y su mediador el TGF- β 1 en la

fibrosis miocárdica asociada a la EAo. En modelos in vivo e in vitro, se ha demostrado que la angiotensina II activa la síntesis y secreción del TGF- β (*Boluyt y cols.*, 1994; *Weber*, 1999). Del mismo modo, estudios in vitro sugieren que el estrés biomecánico puede estimular de forma directa la expresión de la ECA y del TGFB en fibroblastos y cardiomiocitos (*Bishop y Lindahl*, 1999; *Wakatsuki y cols.*, 2004). La presencia de un gradiente trans-cardíaco ([seno coronario] < [aorta ascendente]) en las concentraciones circulantes de angiotensina II y aldosterona en pacientes con EAo (*Wasywich y cols.*, 2006), sugiere que es la producción local de éstas sustancias y sus efectos autocrinos y paracrinos los principales causantes del remodelado de la MEC.

Parece lógico suponer con éstos datos que son los estímulos mecánicos durante el periodo sistólico, los que promueven un exceso de síntesis de colágeno, y por tanto la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo. Sin embargo se desconoce cuales son estos determinantes, el índice que mejor los define o la relación de éste con el estado de los elementos implicados en el metabolismo de colágeno miocárdico. Además, otros factores como la edad o el sexo modifican la magnitud y el patrón de depósito de colágeno en el miocardio de pacientes con EAo.

2.4. Consecuencias clínicas de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica

Las diferentes alteraciones de la MEC descritas en el miocardio de pacientes con EAo (expansión del compartimento intersticial del miocardio –fibrosis- y alteraciones en el patrón de depósito del colágeno -alteraciones arquitecturales-) se han relacionado con la aparición de disfunción ventricular y con la progresión hacia la IC. Como describe en la figura 10, el remodelado de la MEC se asocia con diversas alteraciones que potencialmente pueden predisponer a la aparición de disfunción ventricular, disminución de la reserva coronaria y arritmias ventriculares.

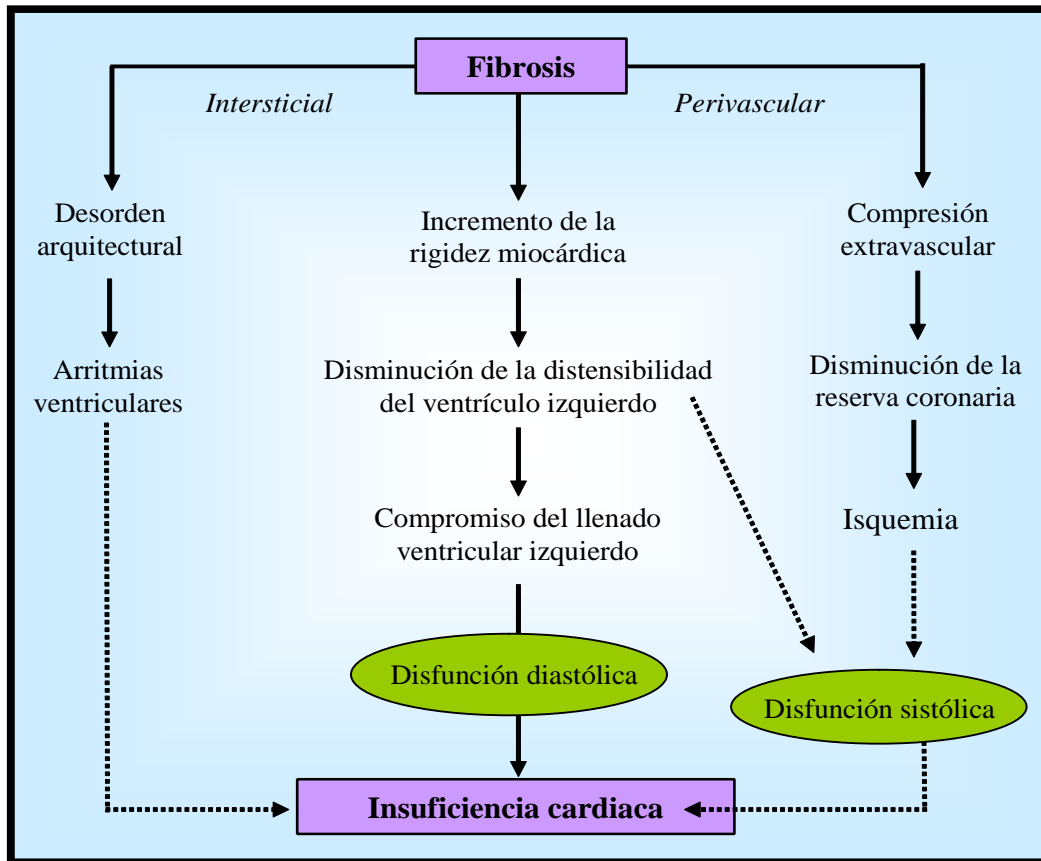


Figura 10. Consecuencias adversas de la fibrosis miocárdica en el corazón.

2.4.1. Función ventricular sistólica

Oldershaw y cols. (1980) describieron por primera vez una correlación inversa entre el grado de fibrosis miocárdica cuantitativamente determinada y la fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo en una serie de 55 pacientes con EAo severa. Estos hallazgos se han reproducido de forma consistente por otros grupos (Oldershaw y cols., 1980; Schaper y cols., 1981; Polyakova y cols., 2004; Di Bello y cols., 2004; Hein y cols., 2005). Además las alteraciones en la distribución espacial del colágeno en la MEC, en contraposición al exceso cuantitativo de su depósito, son las determinantes del incremento de la rigidez ventricular sistólica y del deterioro de la FE del ventrículo izquierdo en pacientes con EAo (Villari y cols., 1994). En este sentido, Polyakova y cols. (2004) han descrito que la disrupción de la MEC junto con el depósito excesivo de colágeno, favorece la dilatación ventricular y la progresión a disfunción ventricular sistólica, siendo las alteraciones en el equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores en el miocardio de éstos pacientes, los responsables de éste proceso.

Los estudios que han analizado la correlación entre las alteraciones histopatológicas y funcionales en el miocardio de pacientes con EAo se han centrado en uno u otro de sus compartimentos: intersticial o cardiomiocitario. Sin embargo, el único estudio disponible que analizó de forma simultánea la importancia relativa de ambos en esta población sugiere que son las alteraciones en el compartimento cardiomiocitario las principales determinantes del deterioro en los índices de función ventricular sistólica en contraposición a las alteraciones del compartimento no cardiomiocitario (*Lund y cols.*, 1995).

2.4.2. Función ventricular diastólica

La disfunción ventricular diastólica es la primera alteración funcional detectable en pacientes con EAo. Esta puede preceder al desarrollo de síntomas en la historia natural de la enfermedad y a las alteraciones en la función ventricular sistólica. Las alteraciones de la MEC presentes en pacientes con EAo se han asociado de forma consistente con las alteraciones en los índices de función ventricular diastólica. El incremento cuantitativo del depósito de colágeno en el miocardio de estos pacientes es el principal determinante de las propiedades elásticas del ventrículo izquierdo y por tanto del incremento en la constante de rigidez ventricular diastólica observado en esta población (*Villari y cols.*, 1994). Además, la progresión del grado de fibrosis miocárdica se asocia con el patrón de llenado ventricular en pacientes con EAo severa (*Heymans y cols.*, 2005). La persistencia o empeoramiento de las alteraciones de la función ventricular diastólica tras la cirugía de sustitución valvular se explica por una regresión tardía de las alteraciones en la MEC en comparación con la regresión precoz de la hipertrofia cardiomiocitaria, determinando un incremento transitorio de la rigidez ventricular diastólica en los primeros años tras la cirugía (*Villari y cols.*, 1995).

2.4.3. Otras potenciales implicaciones

La presencia de áreas macroscópicas de fibrosis miocárdica (*Debl y cols.*, 2006; *Rudolph y cols.*, 2009;) y de fibrosis intersticial difusa (*Maron y cols.*, 1975) en el miocardio ventricular de pacientes con EAo pueden predisponer a la aparición de arritmias ventriculares malignas debido a la formación de circuitos macro-reentrantes y a la aparición de post-potenciales ventriculares, al aumentar la heterogeneidad de los tiempos de repolarización del miocardio ventricular. Estudios en miocardiopatía hipertrófica y dilatada apoyan la primera de las hipótesis (*Wu y cols.*, 2008; *Assomul y cols.*, 2006). Sin embargo, estas consideraciones son especulativas y no han sido exploradas en la literatura científica, entre otras razones, por la ausencia de métodos validados para la evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en ésta población.

3. Evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica

La presencia de fibrosis miocárdica en pacientes con EAo es conocida desde hace más de 30 años, habiéndose relacionado con el deterioro estructural del ventrículo izquierdo y clínico de los pacientes. A pesar de la estrecha relación morfo-estructural y funcional entre el remodelado de la MEC y las alteraciones de la función ventricular sistólica, diastólica y curso post-operatorio de estos pacientes, son escasos los datos que proporcionan estrategias de evaluación no invasiva aplicables en la práctica clínica que permitan profundizar en la historia natural de la enfermedad y monitorizar el impacto de estrategias terapéuticas específicas diseñadas para modificar el sustrato estructural determinante de las alteraciones en la función ventricular. Por tanto, existe un creciente interés por la validación de diferentes métodos, aunque los datos disponibles son escasos y el significado biológico, clínico y pronóstico de éstos aún no está establecido.

3.1. Patrón de referencia: Biopsia miocárdica

La fibrosis miocárdica es un concepto anatomopatológico, así el estudio histológico de muestras de tejido miocárdico mediante técnicas capaces de identificar el depósito exagerado de los distintos componentes de la MEC, constituye el patrón de referencia para su estudio. Sin embargo, la naturaleza cruenta de la biopsia endomiocárdica, obtenida durante la cirugía de sustitución valvular o mediante técnicas de cardiología intervencionista, constituye un factor limitante para su aplicación en la práctica clínica de forma rutinaria y su uso se ha limitado a protocolos experimentales.

3.2. Métodos no invasivos

3.2.1. Ecocardiografía

Se han propuesto diversas técnicas ecocardiográficas como herramientas para la identificación de las alteraciones en la composición miocárdica o de las consecuencias patológicas de éstas.

El análisis integrado de ecos dispersos de alta frecuencia (integrated backscatter analysis) ha demostrado ser un método válido para la caracterización tisular del miocardio humano. De hecho, el grado de dispersión de estas señales se asocia con el contenido de colágeno en el miocardio humano (*Di Bello y cols., 2001*). *DiBello y cols. (2004)* han mostrado una asociación inversa entre el grado de dispersión de éstos ecos de alta frecuencia (indexados a la reflectividad del pericardio) y la relación miocardio/fibrosis miocárdica determinada histológicamente en pacientes con EAo severa e IC por disfunción ventricular sistólica. Resultados similares se han descrito en otras cardiopatías asociadas a sobrecarga crónica de presión (*DiBello y cols., 2003; Maceira y cols., 2002*).

La aplicación de técnicas de Doppler tisular (strain y strain rate) permiten caracterizar las velocidades de desplazamiento miocárdico y la deformación del mismo a lo largo del ciclo cardiaco. El grupo de, *Weidemann y cols. (2007)*, demostró que en pacientes con EAo, existía una asociación entre los patrones regionales de deformación sistólica y las áreas de fibrosis

focal, identificadas mediante realce tardío con gadolinio en un estudio en el que se empleó resonancia magnética. Estos datos sugieren que estas técnicas de Doppler tisular son útiles en la detección de las consecuencias adversas asociadas a áreas macroscópicas de fibrosis, pero no caracterizan la composición miocárdica, y por tanto no son un método que permita una cuantificación directa de la fibrosis miocárdica.

3.2.2. Resonancia magnética cardiovascular

a. Realce tardío con gadolinio

Las áreas de realce tardío con gadolinio en imágenes de resonancia magnética cardiovascular, representan áreas de expansión intersticial con un tiempo largo de lavado del contraste (*Moon, 2007*). La presencia, localización y extensión de éstas zonas de realce tardío se asocian con la presencia, extensión y localización de cicatrices macroscópicas en pacientes con infarto de miocardio (*Wu y cols., 2001*) y en pacientes con miocardiopatía hipertrófica (*Moon y cols., 2004*). La prevalencia de realce tardío en pacientes con EAo es aproximadamente del 20%, asociándose su presencia con el grado de severidad de la enfermedad (*Rudolph y cols., 2009; Debl, 2006*). Sin embargo en esta población se desconoce el significado biológico de estas zonas pues no se empleó método alguno como referencia en el diagnóstico de fibrosis miocárdica. Es más, la relación entre la presencia de focos macroscópicos de realce tardío y la presencia de fibrosis intersticial difusa no está establecida (ver figura 11). En cualquier caso, dado que la fibrosis miocárdica es una característica fundamental del corazón de los pacientes con EAo, y la prevalencia de áreas de realce tardío en estos pacientes es baja, la identificación de las mismas sería un marcador poco sensible y específico de fibrosis en esta población.

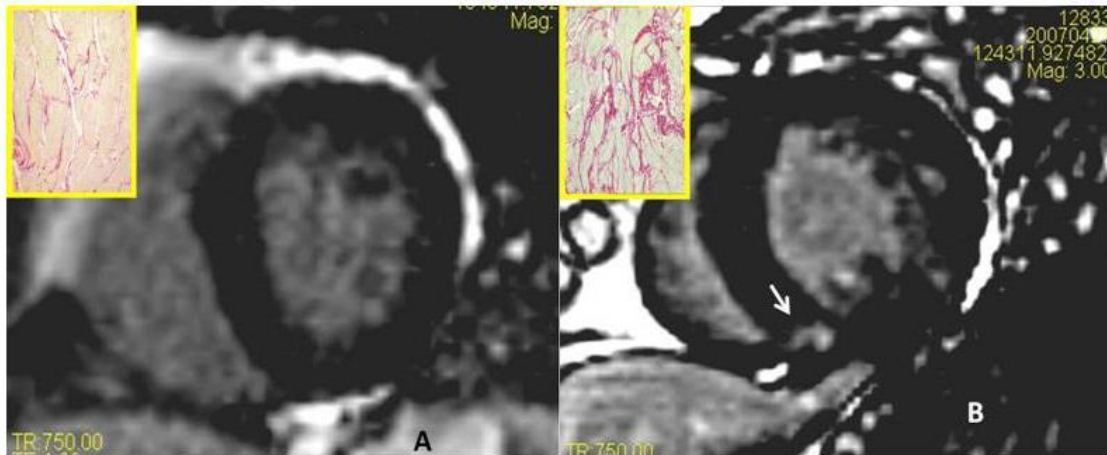


Figura 11. Imágenes representativas del estudio histomorfológico y de resonancia magnética cardiovascular de dos pacientes con estenosis aórtica, uno sin (A) y otro con áreas de realce tardío (B) con gadolinio.

b. Tiempo de recuperación de imágenes potenciadas en T1

Recientemente se ha propuesto que el tiempo de recuperación de imágenes potenciadas en T1, en estudios con gadolinio, constituye un índice de fibrosis intersticial en pacientes con miocardiopatía dilatada (Iles y cols. 2008). En 9 de los 20 pacientes estudiados, este tiempo se asoció de forma directa con el grado de fibrosis miocárdica determinado histológicamente, y fue significativamente mayor en los pacientes con miocardiopatía dilatada que en los sujetos control. Su aplicación en pacientes con EAo podría proporcionar una herramienta útil para la evaluación cuantitativa de fibrosis miocárdica, aunque actualmente no existen datos que corroboren esta hipótesis.

3.2.3. *Métodos bioquímicos*

La medición en sangre de las diversos moléculas implicadas o derivadas del el metabolismo del colágeno tipo I constituyen una herramienta no establecida, pero atractiva para la evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo.

a. Fundamentos

Estos métodos se basan en la medición en sangre de un péptido producido durante la síntesis y formación de la molécula de colágeno fibrilar y de unas moléculas implicadas en su degradación, de manera que sus

concentraciones permiten evaluar indirectamente el estado del metabolismo del colágeno fibrilar. Dado que como ya se ha comentado, el depósito de colágeno tipo I es más abundante que el de colágeno tipo III en enfermedad cardiaca asociada a la sobrecarga crónica de presión (*Panizo y cols.*, 1995; *Pardo-Mindán y Panizo*, 1993; *Querejeta y cols*, 2004), los péptidos y moléculas que se van a evaluar en el presente trabajo se centran en el metabolismo del colágeno tipo I.

b. Requisitos

González y cols. (2008) ha propuesto recientemente los criterios que debería cumplir una molécula circulante para considerarse un marcador bioquímico potencialmente aplicable en la práctica clínica. Estos criterios propuestos son los siguientes:

- 1) Relación entre el parámetro de interés (por ejemplo, el depósito exagerado de colágeno en el miocardio) y las concentraciones en sangre del marcador propuesto.
- 2) Gradiente positivo del seno coronario a la sangre de circulación periférica: lo que determina el origen cardiaco del posible marcador.
- 3) Asociación entre las concentraciones del potencial marcador con los parámetros cardiacos que reflejan la alteración clave de la patología que está en estudio.
- 4) Demostración de que el marcador bioquímico se modifica de forma paralela a los cambios, inducidos de forma espontánea o por intervenciones terapéuticas, en el parámetro de interés (por ejemplo, el depósito exagerado de colágeno en el miocardio).

c. Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I

Como se ha señalado previamente, durante la conversión del procolágeno tipo I en colágeno tipo I, la PCP hidroliza el extremo C-terminal del procolágeno o PICP. Este péptido excisionado es vertido a la sangre en relación estequiométrica 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 (*Smedrod y cols.*, 1990) (Fig. 12).

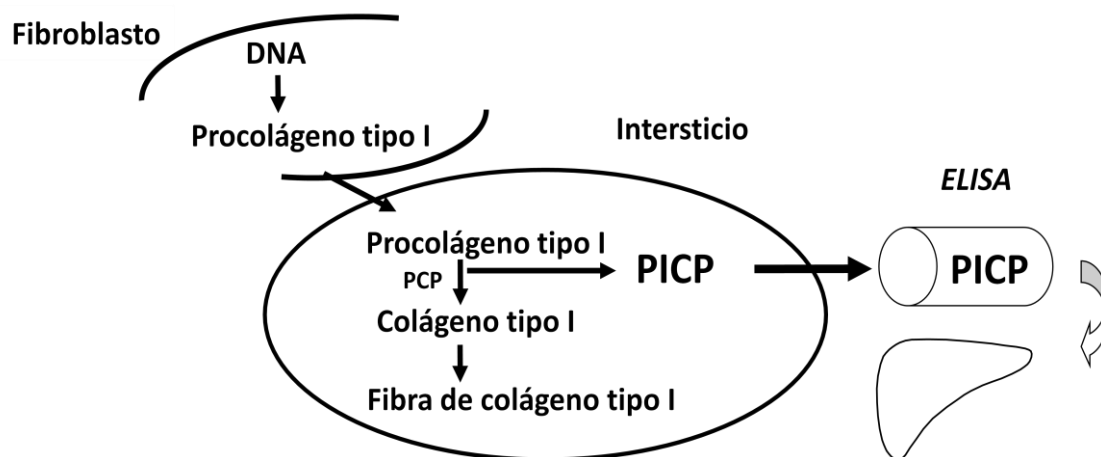


Figura 12. La molécula de procolágeno tipo I es sintetizada y secretada al espacio extracelular, donde por acción de la proteínasa C del procolágeno (PCP) se escinde su extremo carboxi-terminal (PICP; propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I). Este pasa a sangre y finalmente su degradación es hepática.

Por tanto la concentración de éste propéptido circulante en pacientes con EAo podría constituir tanto un índice de actividad de la PCP, así como del depósito de colágeno tipo I en el miocardio, aunque éstas hipótesis no se han analizado en la literatura científica hasta la fecha.

En pacientes con cardiopatía hipertensiva (CH) se ha demostrado de forma consistente una asociación directa entre la concentración del PICP en sangre y la FVC, o depósito de colágeno en el miocardio determinado histológicamente en biopsias cardiacas (*Querejeta y cols*, 2000; *López B y cols.*, 2001; *Querejeta y cols*, 2004). En esos mismos estudios, se ha demostrado además que el PICP tiene origen cardiaco en la CH (*Querejeta y cols*, 2004). Aunque las concentraciones en sangre de éste péptido se ha empleado en estudios clínicos en otras cardiopatías (miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica), no se ha demostrado que en éstas el PICP se asocie con la fibrosis miocárdica determinada histológicamente, ni que las concentraciones séricas de dicho péptido tengan de origen cardiaco. Por otra parte, niveles elevados de PICP se asocian a fibrosis de órganos como el hígado y el pulmón (*Risteli y Risteli*, 1990). Además dado que la eliminación de éste péptido es por metabolización hepática, alteraciones avanzadas de

la función hepática pueden erosionar la relación entre la fibrosis miocárdica y las concentraciones séricas del PICP. Por tanto, el significado biológico de éstos péptidos puede variar de forma relevante según el contexto clínico del paciente y por tanto éste constituye un elemento relevante de valoración.

d. Cociente MMP-1/TIMP-1

Como ya se ha mencionado anteriormente, el paso limitante de la degradación extracelular del colágeno tipo I en el miocardio lo constituye la actividad de la MMP-1 o colagenasa intersticial. La actividad de ésta enzima es responsable de la degradación de más del 40% del colágeno sintetizado en diversos tejidos. El nivel neto de actividad de la MMP-1 depende de las concentraciones relativas de la forma activa de la enzima, y de su relación con los niveles plasmáticos de los inhibidores tisulares de la MMP-1, principalmente del inhibidor tisular tipo 1 o TIMP-1 (*López y cols., 2004*).

López y cols (2006) han demostrado recientemente que el incremento en el cociente MMP-1/TIMP-1 se asocia a una mayor degradación de la red de colágeno fisiológica o misial, lo que provoca la disrupción de la MEC y la consiguiente dilatación de la cámara ventricular izquierda en pacientes con IC sistólica.

Dado que la determinación de estas 2 moléculas en sangre es sencilla, reproducible y de bajo coste la relación entre ambas podría representar un índice útil para la valoración del estado de degradación del colágeno en el miocardio de pacientes con EAo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Dada la alta prevalencia de EAo y la relevancia fisiopatológica de las alteraciones de la MEC como determinantes de la función ventricular y del curso clínico pre y post-operatorio de éstos pacientes se hace necesario caracterizar los mecanismos biológicos implicados en la misma, sus determinantes fisiopatológicos y evaluar estrategias para su evaluación no invasiva en la práctica clínica.

Basándonos en resultados preliminares en otras cardiopatías, nuestro trabajo se fundamenta en la hipótesis de que los sistemas enzimáticos PCP/PCPE, LOX y MMP-TIMP-1, implicados en la formación, depósito y degradación de las fibras de colágeno, juegan un papel crucial en el desarrollo de la fibrosis miocárdica en la EAo, que la determinación de los niveles séricos del PICP pueden reflejar la actividad del sistema enzimático PCP/PCPE así como el depósito de colágeno en el miocardio y finalmente que la determinación del cociente MMP-TIMP-1 puede reflejar el estado del sistema de degradación del colágeno en el miocardio en estos pacientes.

OBJETIVOS

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

- 1-. Establecer la presencia y grados de fibrosis miocárdica, así como su distribución el miocardio de pacientes con EAo mediante la valoración histopatológica de biopsias cardiacas obtenidas durante la cirugía de sustitución valvular.
- 2-. Analizar los principales sistemas y mecanismos implicados en la formación, depósito y degradación de las fibras de colágeno en el miocardio de los pacientes con EAo (PCP y PCPE, LOX, MMP-1 y TIMP-1).
- 3-. Estudiar las posibles asociaciones entre estos sistemas y el desarrollo de fibrosis miocárdica, así como entre la fibrosis miocárdica y los parámetros clínicos y ecocardiográficos en dichos pacientes

4-. Determinar el valor de los péptidos relacionados con el metabolismo del colágeno tipo I en sangre periférica como herramienta clínica para la evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo severa.

INTERÉS

El interés científico-médico del estudio se fundamenta por:

1-. De un lado el esclarecer el papel de los sistemas enzimáticos implicados en el desarrollo de fibrosis miocárdica puede proporcionar potenciales dianas terapéuticas que modifiquen el sustrato estructural de las alteraciones de la función ventricular presentes en la EAo.

2-. Por otra parte, analizar la posible utilidad de los péptidos derivados del metabolismo del colágeno tipo I como método sencillo, incruento y aplicable en la práctica clínica que permita 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 del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria (Málaga). Todos los sujetos incluidos fueron informados sobre las características del estudio y firmaron un documento consintiendo su participación en el mismo. La inclusión, estudios clínicos y ecocardiográficos así como la cirugía de sustitución valvular aórtica se llevaron a cabo en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria (Málaga).

1.1. Población del estudio

Los criterios de inclusión en el estudio fueron los siguientes:

- Presencia de EAo severa, definida como: AVA $< 1 \text{ cm}^2$ (o $< 0.6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$) y/o un gradiente medio transvalvular $> 40 \text{ mmHg}$ (Bonow y cols. 2006). Presentando además al menos un grado moderado de calcificación valvular.
- Indicación de cirugía de sustitución valvular aórtica: síntomas atribuibles a la EAo (angina, síncope, disnea o insuficiencia cardíaca) o presencia de disfunción ventricular sistólica (fracción de eyección del ventrículo izquierdo $< 50\%$).

Fueron causa de exclusión del estudio:

- Antecedente de infarto agudo de miocardio.
- Presencia de insuficiencia aórtica o mitral significativa asociada (definida como grados mayores a moderados).
- Situaciones asociadas con niveles elevados del PICP en sangre periférica como: hepatopatía crónica, osteopatía metabólica e hipertiroidismo (Querejeta y cols. 2000).

Como muestras control se utilizaron un grupo de 10 corazones (6 hombres y 4 mujeres con una edad media de 59 años y un intervalo de 40 a 68 años), que se empleó para determinar el depósito miocárdico de colágeno fibrilar representativo de la normalidad. Estos 10 corazones se seleccionaron

de un total de 100 autopsias consecutivas, efectuadas en la Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona) durante los años 1998-1999, de acuerdo con los siguientes criterios:

- Fallecimiento por accidente traumático.
- Ausencia de historia o hallazgos anatómicos de enfermedad cardiovascular.
- Ausencia de algún tipo de enfermedad sistémica.
- Ausencia de aterosclerosis en arterias coronarias mayores.
- Peso normal del corazón.
- Ausencia de hipertrofia ventricular macroscópica.

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 presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se determinó en posición sentada durante la exploración ecocardiográfica, usando para ello un esfigmomanómetro de mercurio. Para la lectura de la PAS se utilizó la fase I de Korotkoff y para la lectura de la PAD se utilizó la fase V de Korotkoff.

2.2. Estudio ecocardiográfico

La exploración ecocardiográfica se llevó a cabo en todos los pacientes en la semana previa a la cirugía de sustitución valvular aórtica de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (*Quinones y cols.* 2002). Las dimensiones en modo-M del ventrículo izquierdo se obtuvieron a partir del eje largo para-esternal 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) y tele-sístole (s), tal y como se muestra en la figura 13.

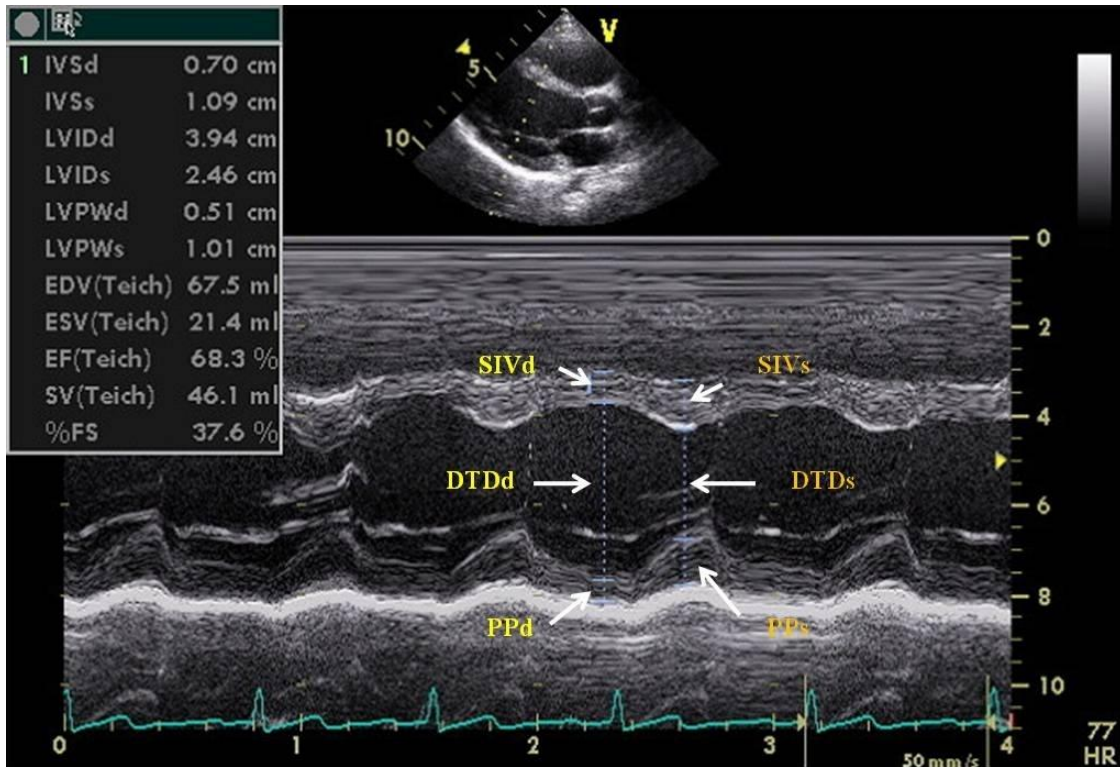


Figura 13. Imagen representativa en modo-M del ventrículo izquierdo en el eje para-esternal largo. SIV; septo interventricular, DTD; diámetro tele-diastólico, PP; pared posterior, d; diástole, s; sístole.

Con el empleo de Doppler pulsado se obtuvo el espectro de velocidades del flujo sistólico en el tracto de salida del ventrículo izquierdo, y con Doppler continuo el espectro de velocidades del flujo trans-valvular. El diámetro del tracto de salida del ventrículo izquierdo se determinó mediante ecocardiografía bidimensional (Figura 14).

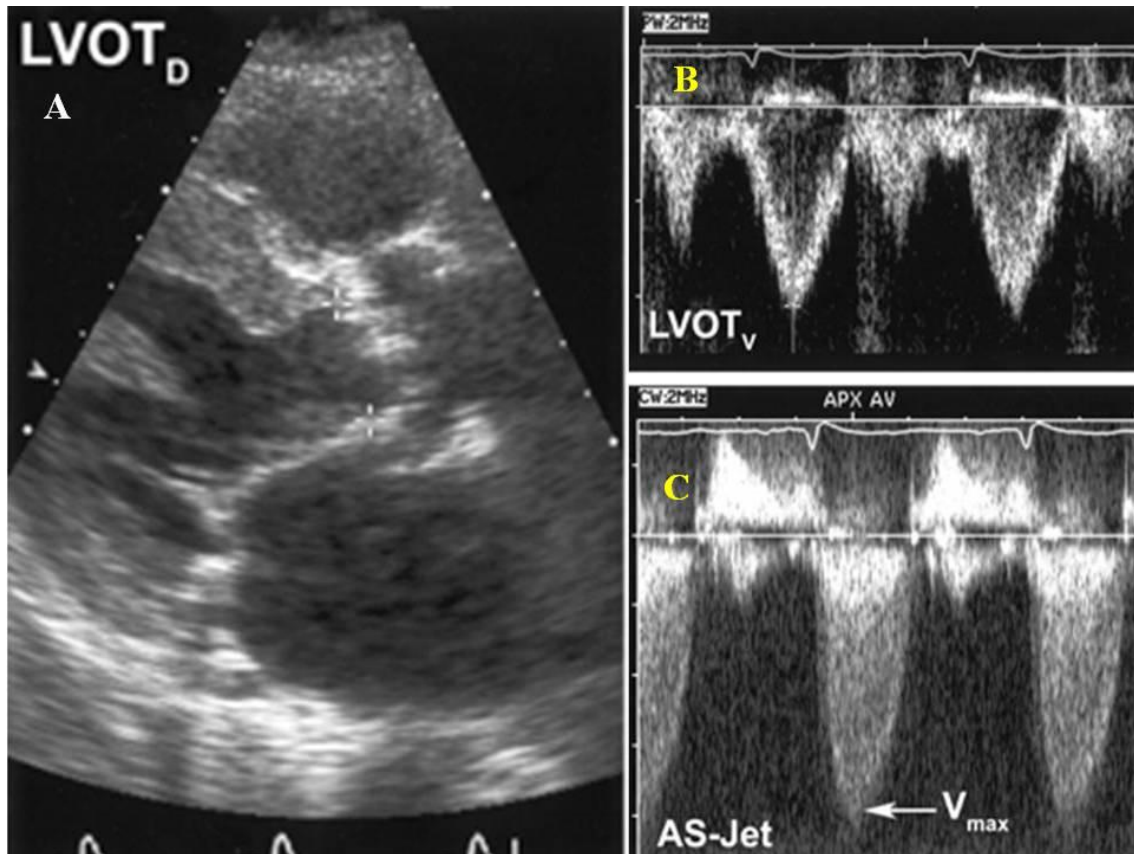


Figura 14. Imagen A: medida del tracto de salida del ventrículo izquierdo en modo 2-D en el eje largo para-esternal. Imagen B: espectro de velocidades con Doppler pulsado del flujo sistólico a nivel del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Imagen C: espectro de velocidades con Doppler de onda continua del flujo sistólico aórtico. (Tomado de *Otto CM*, 2006).

2.2.1. Índices de severidad de la estenosis aórtica

Los gradientes de presión transvalvular, medio y máximo, se derivaron de las velocidades obtenidas mediante Doppler empleando la ecuación simplificada de Bernoulli:

$$\Delta P = 4 \cdot v^2$$

Donde ΔP , representa el gradiente de presión transvalvular (máximo o medio) y v , representa la velocidad del flujo transvalvular (máxima para la determinación del ΔP máximo, o la integral tiempo velocidad del flujo sistólico aórtico para la determinación del ΔP medio).

El AVA se calculó de acuerdo a la ecuación de continuidad, según la siguiente expresión matemática (*Skaerpe y cols.* 1985):

$$AVAo = (AreaTSVI \cdot ITVTSVI) / ITVAo$$

AVAo; área valvular aórtica, AreaTSVI; área del tracto de salida del ventrículo izquierdo, ITVTSVI; integral tiempo velocidad del flujo sistólico a nivel de tracto de salida del ventrículo izquierdo, ITVAo; integral tiempo velocidad del flujo transvalvular sistólico aórtico.

Por último, el índice de área valvular aórtica se obtuvo dividiendo el AVA por la SC.

2.2.2. Masa y geometría ventricular izquierda

La MVI se calculó de acuerdo con la fórmula modificada de *Devereux y cols.* (1977):

$$MasaVI = 0,80 \cdot \{1,04 \cdot [SIVd + PPd + DVId]^3 - [DVI]^3\} + 0,6$$

El GRP se calculó según la siguiente fórmula:

$$GPR = (SIVd + PPd) / DVId$$

2.2.3. Índices de post-carga ventricular

El estrés circunferencial y meridional sistólico (cESS y mESS, respectivamente) se calcularon de acuerdo a los métodos propuestos y validados por *Gaasch y cols.* (1989) y *Reichek y cols.* (1982) según las siguientes expresiones matemáticas:

$$cESS = \{P \cdot (DVI/2)^2 \cdot [1 + (DVI/2 + PPs)/(DVI/2 + PPs/2)]\} / [(DVI/2 + PPs)^2 - (DVI/2)^2]$$

y

$$mESS = (0.33 \cdot P \cdot DVI) / \{PPs \cdot [1 + (PPs/DVI)]\}$$

2.2.4. Índices de función ventricular sistólica

a. Fracción de eyección

La FE se calculó como la relación del volumen sistólico y el volumen tele-diastólico y se expresó como porcentaje. Éstos índices se derivaron según el método de Teicholtz.

b. Fracción de acortamiento mesocárdica

El acortamiento mesocárdico (MWS) se calculó según el modelo descrito por Shimizu y cols. (1985), y modificado por de Simone y cols (1988), con objeto de evitar la sobreestimación del mismo debido a asunciones de comportamiento homogéneo de las distintas capas miocárdicas durante el periodo sistólico y diastólico, según la siguiente fórmula:

$$\text{MWS} = [(DVI_d + H_d/2) - (DVI_s + H_s/2)] / (DVI_d + H_d/2)$$

Donde H es el grosor de la pared posterior y el septo interventricular combinados para cualquier momento del ciclo cardiaco (n), asumiéndose constante la MVI a lo largo del mismo, se deriva Hn de la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \{[(DVI_d/2 + H_d/2)^3 - (DVI_d/2)^3] / [(DVI_d/2 + H_d)^3 - (DVI_d/2)^3]\} \\ & = \\ & \{[(DVI_n/2 + H_n/2)^3 - (DVI_n/2)^3] / [(DVI_s/2 + H_n)^3 - (DVI_n/2)^3]\} \end{aligned}$$

Con objeto de eliminar el efecto de la post-carga sobre el MWS, éste se ajustó a los niveles de cESS mediante la determinación de la razón entre el acortamiento observado respecto al esperado en cada sujeto. Los valores de la fracción de acortamiento mesocárdico esperados se calcularon empleando la ecuación de la regresión lineal entre el cESS y la MWS descrita por de Simone y cols (1994).

2.2.5. 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. 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).
- La constante de rigidez del ventrículo izquierdo se calculó como $(0.07/t. \text{deceleración})^2$ (García y cols. 2001).

3. Estudio histomorfológico

3.1. Obtención y procesado de muestras

La toma de biopsia miocárdica se realizó durante la cirugía de sustitución valvular una vez resecada la válvula aórtica nativa, mediante inspección directa. A efectos de la cuantía de fibrosis miocárdica, datos previos demuestran que en el corazón humano sometido a sobrecarga de presión, el septo interventricular presenta lesiones similares y representativas a las de la pared libre del ventrículo izquierdo. La muestra miocárdica se fijó inmediatamente en formol al 4%, se incluyó en parafina y se cortó en secciones seriadas de 4 y 20 μm para los estudios histológicos y colorimétricos, respectivamente (Figura 15).

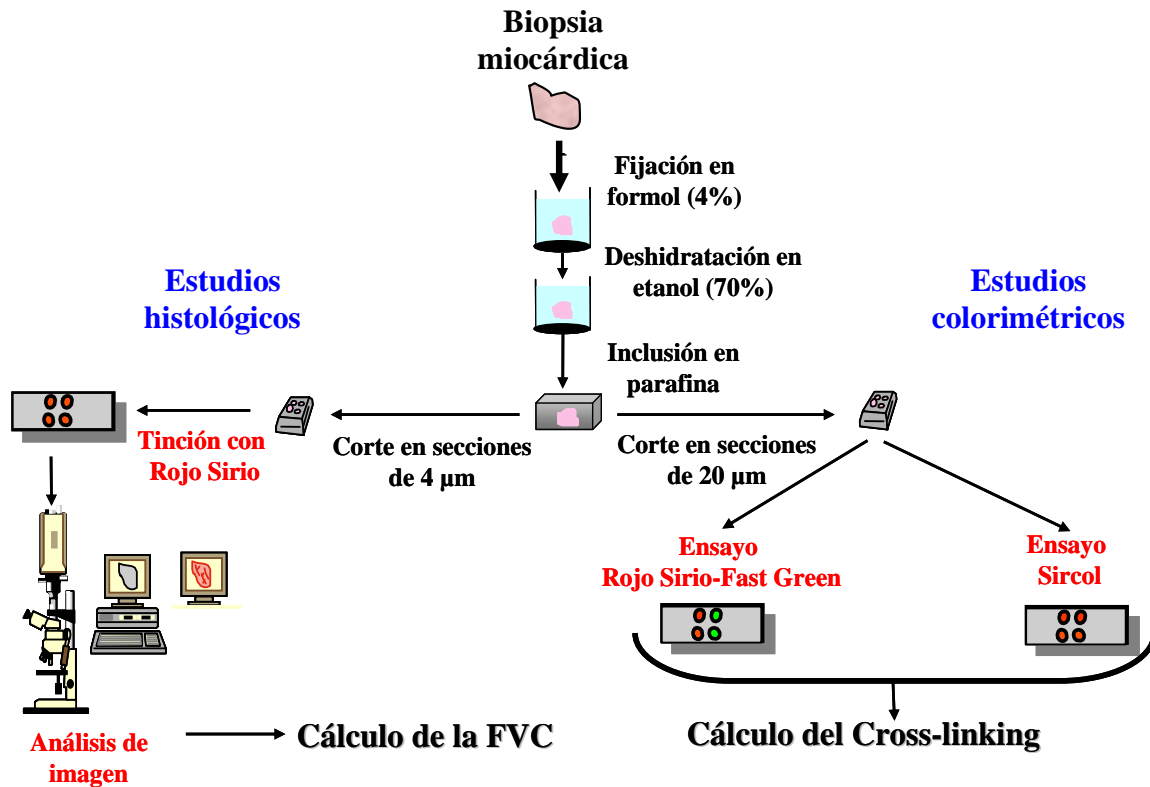


Figura 15. Esquema representativo del proceso seguido por las muestras miocárdicas para los estudios histomorfológicos.

3.2. Estudio histológico para la determinación del depósito de colágeno fibrilar

3.2.1. Determinación de la fracción de volumen de colágeno

Tal y como muestra la imagen 16, la FVC se determinó en secciones de miocardio de 4 µm teñidas con el colorante específico para colágeno (Rojo Picrosirio F3BA) de acuerdo con *Dolber y Spach (1987)*, y el análisis se realizó mediante morfometría cuantitativa con un sistema de análisis de imagen automatizado (AnalySYS, Soft Imaging System GmbH, Hammer, Germany). Para ello, las secciones se analizaron al microscopio (x20). Todos los campos de la muestra se digitalizaron para obtener imágenes con una resolución final de 20 µm²/pixel. Una vez digitalizadas las imágenes, se procesaron para mejorar la uniformidad de la iluminación en todos los campos y, posteriormente, mediante umbralización (“thresholding”) interactiva por niveles de grises, para segmentar las áreas teñidas (oscuras), correspondientes al colágeno. Las regiones subendocárdicas se descartaron.

La FVC se calculó como la suma de todas las áreas de colágeno dividido por la suma de todas las áreas de colágeno y tejido muscular en todos los campos analizados en cada sección y se expresó como porcentaje.

3.2.2. Análisis de la distribución del colágeno fibrilar

Tal y como se muestra en la figura 16, según la localización del depósito de colágeno en el miocardio se definieron y cuantificaron los siguientes patrones:

- *Depósito peri-vascular:* aquel localizado rodeando los vasos intramiocárdicos.
- *Depósito cicatricial:* depósitos de colágeno desorganizados no relacionados con las fibras musculares.
- *Depósito misial:* aquel colágeno asociado con grupos de células (perimisio) y aquel que rodea e interconecta células individuales (endomisio).

Se calculó de forma automatizada la FVC total, perivascular y cicatricial. El depósito de colágeno misial se derivó como la diferencia entre la FVC total y la FVC perivascular y cicatricial (Lopez y cols. 2006).

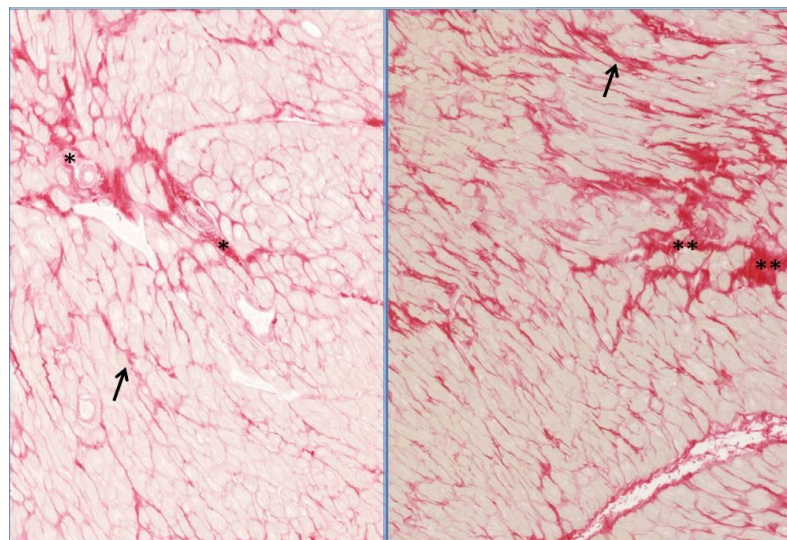


Figura 16. Imágenes representativas del estudio histológico en dos pacientes con estenosis aórtica severa, mostrando la distribución del colágeno fibrilar. *; fibrosis perivascular, **; fibrosis cicatricial, →; fibrosis misial.

3.3. Estudios colorimétricos para la determinación del grado de entrecruzamiento

Con objeto de evaluar el grado de entrecruzamiento de las moléculas de colágeno para formar fibras de colágeno, se determinó la cantidad de colágeno entrecruzado o capaz de formar fibras de colágeno (colágeno insoluble) y no entrecruzado o incapaz de formar fibras de colágeno (colágeno soluble), mediante el empleo de dos ensayos colorimétricos. Para realizar estos estudios se utilizaron los cortes de 20 µm, tal y como se muestra en la figura 17. El ensayo de Fast Green-Sirius Red (Lopez de Leon y Rojkind, 1985), se empleó para obtener la cantidad de colágeno total, y el ensayo basado en Sicrol (Lii y cols. 2001) para obtener la cantidad de colágeno en forma soluble. El colágeno insoluble se calculó restando a la cantidad de colágeno total, el colágeno en forma soluble (Figura 17). El grado de entrecruzamiento se calculó como la razón entre la cantidad de colágeno insoluble y soluble (Figura 17).

G. Entrecruzamiento= Colágeno Insoluble : Colágeno Soluble

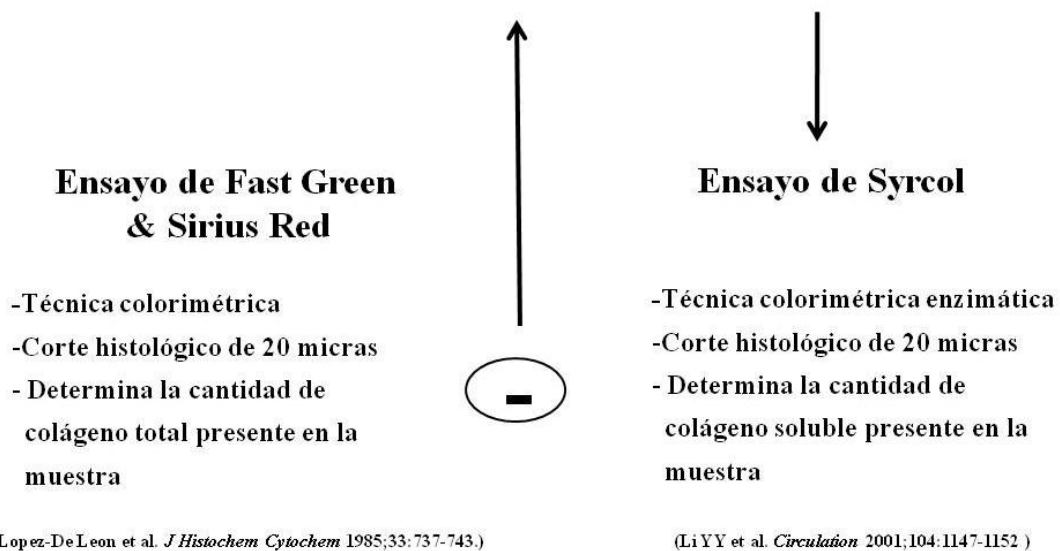


Figura 17. Representación esquemática de la determinación del grado de entrecruzamiento de las moléculas de colágeno tipo I en el miocardio.

4. Estudios de biología molecular

4.1. Obtención y procesado de las muestras

Al igual que para el estudio histológico, la biopsia miocárdica destinada a estudios moleculares se obtuvo durante la cirugía de sustitución valvular aórtica una vez resecada la válvula aórtica nativa, mediante inspección directa del tejido miocárdico del septo interventricular a nivel subvalvular. Sin embargo, esta muestra destinada a estudios moleculares, se dividió en 2 partes y se congelaron de forma inmediata en nitrógeno líquido y se conservaron a -80° centígrados hasta su posterior procesado.

Una de las muestras fue destinada a la extracción de proteína, y otra a la extracción de ARN.

4.2. Cuantificación de proteínas en tejido

4.2.1. Extracción de las proteínas a partir del tejido

Las muestras miocárdicas destinadas al análisis de expresión de proteínas, que estaban congeladas a -80 °C, fueron pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido con un micropistilo. Se les añadió Buffer de lisis urea-thiourea y se procesaron para obtener las proteínas totales. Estas fueron congeladas a -80 °C hasta su posterior cuantificación.

4.2.2. Inmunodetección

La cantidad de proteína total de todas las muestras, se cuantificó mediante el método de Bradford (*Bradford*, 1976). Para evaluar la expresión de las proteínas citadas en el diseño experimental se utilizó la técnica de Western blot.

Western blot

Para la técnica de Western blot se realizó una electroforesis en geles de acrilamida. Los geles superiores tenían una concentración de acrilamida del 4%, y los inferiores una concentración que permitiera separar

adecuadamente cada proteína, dependiendo de su peso molecular. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa empleando el método húmedo, Las condiciones de cada inmunodetección, incluyendo las condiciones de bloqueo, de incubación con el anticuerpo primario y de incubación con el anticuerpo secundario, fueron puestas a punto en este estudio y se encuentran resumidas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de inmunodetección para cada proteína

Proteína	Anti-Cuerpo 1 y dilución	Anti-Cuerpo 2 y dilución
PCP	anti-Mouse, R&D Systems, Deutschland, UK 1:500	Amersham Biosciences 1:5000
PCPE	anti-Mouse, R&D Systems, Deutschland, UK 1:1000	Amersham Biosciences 1:2500
LOX	Anti-Mouse, R&D Systems, Deutschland, UK 1:500	Amersham Biosciences 1:10000
MMP-1	anti-Mouse, Oncogene, San Diego, CA, USA 1:2000	Amersham Biosciences 1:10000
TIMP-1	anti-Mouse, Chemicon, Temecula, CA, USA 1:200	Amersham Biosciences 1:5000

PCP; proteinasa C del procolágeno tipo I, PCPE; enhancer o potenciador de la PCP, LOX; lisil-oxidasa, MMP-1; metaloproteinasa de matriz tipo I, TIMP-1; inhibidor tisular de las metaloproteinasas de matriz tipo I.

Los distintos anticuerpos policlonales se identificaron mediante incubación con IgG anti- Mouse conjugado con peroxidasa, permitiendo la visualización por quimioluminiscencia de las distintas bandas. Ésta visualización se llevó a cabo con el sistema de Quimioluminiscencia ECL-Plus (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), los autorradiogramas se analizaron empleando un densitómetro automatizado (Quantity One, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las bandas se compararon con el empleo de un anticuerpo

monoclonal frente a la β -actina (Sigma, Saint Louis, MO, USA) como referencia control. Los datos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias (UDA) en relación a la expresión de β -actina.

4.3. Cuantificación del ARNm

4.3.1. Extracción del ARNm

El ARN mensajero se aisló del ARN total mediante el uso del kit mRNA Oligotex (Qiagen, Hilden, Germany).

Las muestras de miocardio que estaban destinadas al análisis de expresión del ARN mensajero, y se encontraban congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fueron pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido con un micropistilo. Se les añadió un buffer de lisis comercial (Applied Biosystems) y se homogeneizaron con el Ultraturax T25 (IKA). Con esta solución, y para finalmente extraer el ARN, se utilizó el método de aislamiento de ARN de ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante.

4.3.1. Cuantificación del ARNm mediante PCR en tiempo real

La medida de la concentración del ARN fue determinada por electrofotometría ultravioleta con el espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop (NanoDrop Technologies Inc., Willmington, USA) empleando $1\text{ }\mu\text{L}$ de volumen de muestra. Se realizaron mediciones a dos longitudes de onda, 260nm y 280nm .

Para cuantificar el nivel de ARNm de la cadena $\alpha 1$ del procolágeno tipo 1, se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real empleando una sonda fluorescente específica. La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, como ya se ha descrito (López y cols, 2007). Se emplearon las siguientes sondas fluorescentes TaqMan MGB específicas para humano (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): procolágeno $\alpha 1$ (I)

(Hs 00164004-m1), ARN ribosomal de 18S (4333760F), como control endógeno.

5. Estudios bioquímicos

5.1. Obtención y procesado de muestras

Para determinar los distintos parámetros séricos se extrajeron muestras de sangre en ayunas, de los pacientes con EAo, tanto de la vena antecubital, como de seno coronario, durante la cirugía de sustitución valvular. La sangre de seno coronario se obtuvo una vez sondado éste, previo al paso de la cardiopejía retrógrada. 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 conservó a -20°C. Las determinaciones de las distintas moléculas, se efectuaron simultáneamente para todos los pacientes, tanto en suero de sangre periférica como de sangre de seno coronario. En el momento de las determinaciones se ignoraba la procedencia de cada muestra individual y los resultados del estudio histomorfológico.

5.2. Determinación de las concentraciones en sangre de los péptidos y moléculas implicadas en el metabolismo del colágeno tipo I

5.2.1. Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP).

La concentración sérica del PICP se determinó mediante técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) tanto en sangre de seno coronario como de circulación periférica, con el ensayo comercial de Quidel Corporation tras ser modificado en el laboratorio del Area de Fisiopatología Cardiovascular de Centro de Investigación Médica Aplicada (*García-Bolao y cols.* 2006). Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron del 6.3% y 6.4% respectivamente. La sensibilidad (límite inferior de detección) fue de 1 µg por litro.

5.2.2. 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 y cols.* (1993), 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 pertenece a la casa Amersham Biosciences. Este anticuerpo no presenta reacción cruzada con la α 2-macroglobulina. El coeficiente de variación inter e intraensayo en la determinación de la MMP-1 fue del 13% y 8% respectivamente. La sensibilidad (límite inferior de detección) fue de 1.7 ng por mililitro.

5.2.3. Inhibidor de la metaloproteinasa de matriz tipo I (TIMP-1)

La concentración del TIMP-1 total se determinó mediante la técnica de ELISA de captura descrita por *Kodama y cols.* (1990), con un anticuerpo monoclonal específico para el TIMP-1, en las muestras de plasma de cada uno de los pacientes. Este ELISA es comercial y pertenece, al igual que el de la MMP-1, a la casa Amersham Biosciences. Éste anticuerpo no muestra reacción cruzada con el TIMP-2 y TIMP-3. El coeficiente de variación inter e intraensayo en la determinación de TIMP-1 fueron del 15% y del 11% respectivamente. La sensibilidad (límite inferior de detección) fue de 1.25 ng por mililitro.

5.2.4. Cociente Metaloproteinasa de matriz tipo I y su inhibidor (MMP-1:TIMP-1)

La razón entre las concentraciones totales MMP-1 y TIMP-1 en plasma, se empleo como índice del balance entre la MMP-1 y su inhibidor, y por lo tanto como un indicador indirecto de la actividad de la MMP-1.

5.2.5. 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 y cols.* (1995), empleando el ensayo comercial de la casa Biomedica Gruppe.

6. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas continuas se expresaron como media aritmética \pm error estándar, las variables categóricas se expresan como número de pacientes con la característica de interés.

Las diferencias entre los pacientes con EAo y las muestras control se llevó a cabo aplicando el test de la t de Student para variables distribuidas normalmente o mediante el test de la U de Mann-Whitney en caso contrario.

Las comparaciones entre los distintos grupos de pacientes con EAo se llevaron a cabo mediante el análisis de la varianza conjunta (ANOVA) seguido por comparaciones dos a dos (según el procedimiento de Bonferroni) para variables distribuidas normalmente, en caso contrario se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por comparaciones dos a dos mediante el test de la U de Mann-Whitney.

Las variables categóricas se compararon mediante el test de la χ^2 . En caso de que alguna de las frecuencias esperadas fuese menor de 5, se aplicó el test exacto de Fisher.

El grado y dirección de la asociación entre variables continuas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson siempre que las dos variables cumpliesen el supuesto de normalidad. En caso contrario, se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se emplearon diagramas de dispersión para la representación gráfica de las distintas asociaciones. El efecto de terceras variables relacionadas con las de interés, se estudió mediante análisis de correlaciones parciales.

Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., 2007).

RESULTADOS

1. Caracterización de la fibrosis miocárdica

1.1 Fracción de volumen de colágeno total

El análisis de la FVC en los pacientes con EAo y en las muestras control confirmó la presencia de un depósito exagerado de colágeno fibrilar en todos los pacientes del estudio.

Mientras que la FVC media en las muestras control fue de $1.95 \pm 0.07\%$ (con un rango de valores entre 1.39% y 2.15%), la de los pacientes con EAo fue de $17.33 \pm 1.90\%$, (con un rango de valores entre 3.98% y 39.8%), siendo significativamente mayor que la de las muestras control (Figura 18).

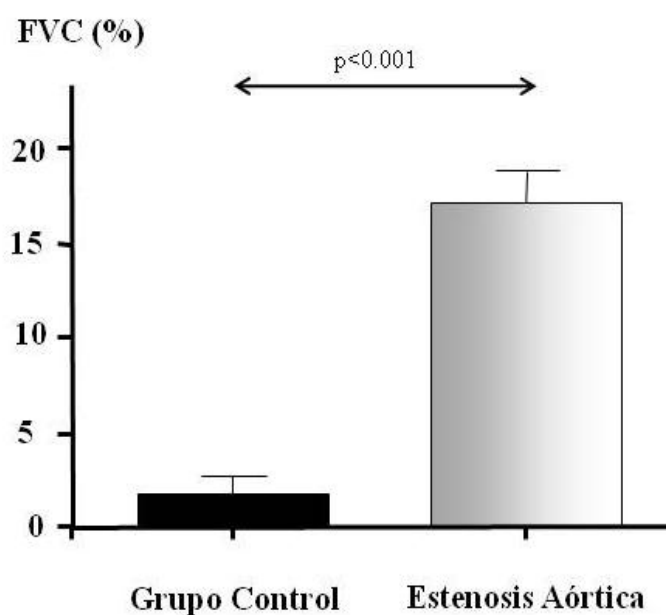


Figura 18. Las barras representan el valor medio \pm error estándar de la fracción de volumen de colágeno (FVC) en los sujetos del grupo control y en los pacientes con estenosis aórtica.

Dado el amplio rango de valores de FVC en los pacientes con EAo, con objeto de su mejor caracterización, los pacientes se agruparon de acuerdo a terciles de FVC en tres grupos:

- Grupo I o con fibrosis miocárdica leve (FVC $\leq 9.61\%$, n=11, FVC media= $6.13\% \pm 0.69$)

- Grupo II o con fibrosis moderada (FVC entre 9.62% y 20.78%, n=12, FVC media= 15.15% ± 1.09)
- Grupo III o con fibrosis severa (FVC ≥ 20.79, n=11, FVC media=30.89% ± 1.91).

Tal y como se muestra en la figura 19, el depósito de colágeno fibrilar en los pacientes con EAo fue significativamente mayor para cualquier grado de fibrosis miocárdica comparada con las muestras control.

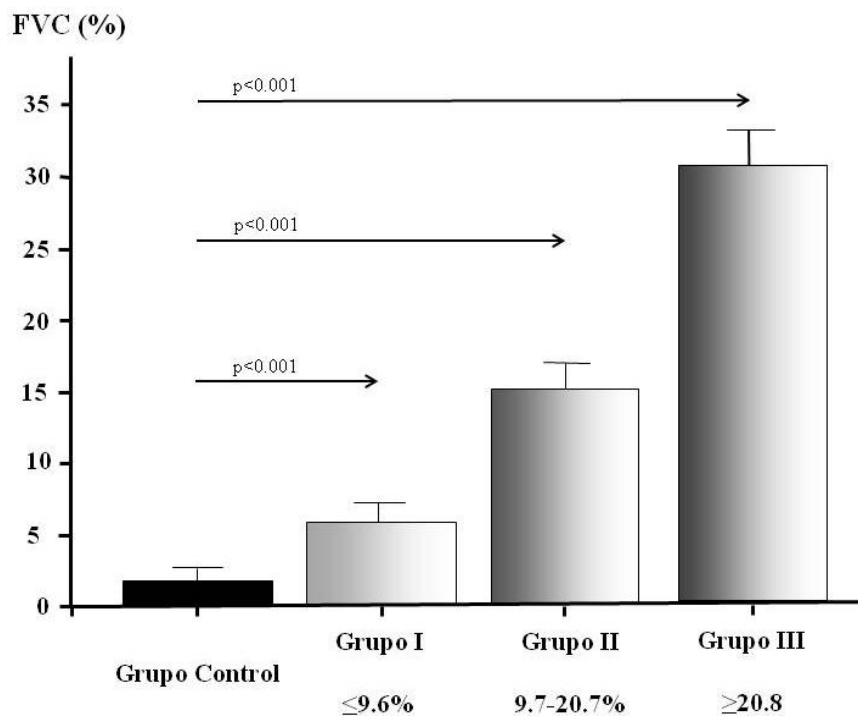


Figura 19. Las barras representan el valor medio ±error estándar de la fracción de volumen de colágeno (FVC) en los sujetos del grupo control y en los pacientes con estenosis aórtica agrupados de acuerdo a la cuantía del depósito de colágeno en el miocardio. Grupo I (fibrosis leve), grupo II (fibrosis moderada) y grupo III (fibrosis severa).

1.2. Distribución del colágeno fibrilar en el miocardio

La distribución de colágeno fibrilar en los pacientes con EAo aumentó de forma significativa en términos absolutos, tanto a nivel misial, cicatricial como perivascular, cuanto más severo era el grado de fibrosis miocárdica. Sin embargo, la importancia relativa de cada uno de estos componentes, determinada como porcentaje, se modificó conforme el grado de fibrosis miocárdica fue mayor. Así, el depósito cicatricial aumentó en términos

relativos como componente de la FVC total conforme el grado de fibrosis miocárdica aumentó mientras que los depósitos misial y perivascular disminuyeron con mayores grados de fibrosis miocárdica.

Tabla 4. Distribución del depósito de colágeno en el miocardio en los distintos grupos.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
FVC misial	2.6 ±0.6*	5.0 ±0.9	7.7 ±1.4‡	0.005	0.001
FVC perivascular	0.6 ±0.2*	0.8 ±0.1	1.4 ±0.3‡	0.023	0.001
FVC cicatricial	3.0 ±0.4*	9.4 ±0.7†	21.8 ±1.9‡	<0.001	<0.001
% FVC misial	40.2 ±5.8	31.3 ±4.7	25.3 ±3.9	0.111	0.039
% FVC perivascular	9.2 ±2.2	4.9 ±0.9	4.4 ±0.7	0.047	0.026
% FVC cicatricial	50.6 ±5.8*	63.7 ±4.8	70.3 ±3.8	0.026	0.008

FVC: fracción de volumen de colágeno. p: valor p para test de ANOVA. p*: valor p para test de tendencia lineal. *: p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

2. Características de los tres grupos de pacientes con estenosis aórtica

Las características generales de los pacientes en los distintos grupos establecidos según el grado de fibrosis miocárdica, se detallan en la tabla.5.

La edad media de la población fue de 71 ±1 años, sin encontrarse diferencias significativas entre los 3 grupos. El sexo femenino fue el predominante del estudio (24 de 34 pacientes). La superficie corporal media fue de 1.70 ±0.03 unidades, sin haber diferencias entre los grupos. La población del estudio mostró una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, aunque éstos se distribuyeron de forma homogénea entre los pacientes agrupados en función a la cuantía de colágeno en el miocardio, excepto por la prevalencia de fibrilación auricular permanente, que mostró una tendencia lineal significativa a ser más frecuente con el aumento de la FVC. Finalmente, el depósito creciente de colágeno en el miocardio se asoció con una mayor frecuencia de IC como síntomas de presentación de la EAo.

Tabla 5. Características generales.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
Edad (años)	71 ±2	70 ±3	72 ±2	0.283	0.654
Sexo (femenino)	10	7	7	0.191	0.167
SC (m2)	1.68 ±0.04	1.67 ±0.06	1.70 ±0.05	0.853	0.753
Antecedentes médicos					
HTA	9	6	9	0.151	1.000
Diabetes Mellitus	4	6	2	0.279	0.379
FA permanente	1	1†	6‡	0.007	0.009
Enfermedad Coronaria	5	5	2	0.346	0.187
1 vaso	3	3	2	0.872	0.620
2 vasos	1	0	0	0.341	0.214
3 vasos	0	2	0	0.143	1.000
Síntomas					
Angina	8	8†	2‡	0.019	0.012
Síncope	1	2	2	0.811	0.553
Insuficiencia Cardíaca	5	4†	10‡	0.015	0.034
Tratamiento					
IECA	2	3	1	0.662	0.648
ARA-2	2	2	1	0.679	0.701
Antialdosterónicos	0	1	1	0.580	0.339
Diurético	7	7	9	0.237	0.207
B-bloqueantes	5	4	3	0.571	0.776
NT-proBNP	1812 ±323	2223 ±298	3473 ±532	0.437	0.221

FVC: fracción de volumen de colágeno. SC: superficie corporal, HTA; hipertensión arterial, IECA; inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina, ARA2; antagonistas del receptor de la aldosterona tipo 2. p: valor p para test de χ^2 de Pearson para comparación de variables categóricas o de ANOVA para variables continuas. p*: valor p para test de tendencia lineal. *: p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

3. Parámetros ecocardiográficos

Las características ecocardiográficas de los pacientes con EAo agrupados de acuerdo a la cuantía de fibrosis miocárdica se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Características ecocardiográficas.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
AVAo (cm ²)	0.58 ±0.07	0.69 ±0.05	0.64 ±0.08	0.524	0.575
iAVAo (cm ² /m ²)	0.34 ±0.04	0.42 ±0.03	0.36 ±0.05	0.328	0.706
G. Max. (mmHg)	96.4 ±6.0	72.2 ±5.4	77.0 ±9.1	0.046	0.060
G. Medio (mmHg)	64.3 ±3.6*	46.2 ±3.8	50.2 ±6.2	0.019	0.035
Masa VI (gr)	224.8 ±23.5	248.3 ±16.4	274.3 ±29.7	0.353	0.153
iMasa VI (gr/m ²)	133.4 ±14.1	150.9 ±10.3	158.4 ±14.5	0.396	0.189
% HVI	6*	11	10‡	0.046	0.038
GPR	0.63 ±0.04	0.60 ±0.04	0.63 ±0.05	0.736	0.845
% >0.45	10	9	9	0.490	0.928
FE (%)	75.0 ±2.5	58.7 ±5.5	65.4 ±5.0	0.056	0.148
FAM (%)	13.7 ±1.0	11.4 ±0.9	13.2 ±0.9	0.202	0.659
FAMc (%)	72.9 ±5.4	62.1 ±4.6	74.1 ±5.1	0.186	0.163
Onda E (m/s)	0.85 ±0.09	0.79 ±0.06	1.05 ±0.14	0.163	0.162
Onda A (m/s)	1.04 ±0.08	0.91 ±0.09	0.87 ±0.18	0.487	0.260
Relación E/A	0.91 ±0.17	0.97 ±0.21	1.46 ±0.70	0.498	0.304
T. Dec. (ms)	267.7 ±23.9	317.2 ±50.4	293.7 ±25.5	0.634	0.624
TRIV (ms)	61.9 ±14.7	101.9 ±8.3	127.3 ±17.8‡	0.012	0.004

FVC: fracción de volumen de colágeno. AVAo: área valvular aórtica, G. Máx: gradiente transvalvular máximo, G. Medio: gradiente transvalvular medio, VI: ventrículo izquierdo, HVI: hipertrofia ventricular izquierda, GPR: grosor parietal relativo, FE: fracción de eyección, FAM: fracción de acortamiento mesocárdico, FAMc: fracción de acortamiento mesocárdica ajustada a post-carga. T. Dec.: tiempo de deceleración, TRIV: tiempo de relajación isovolumétrica. p: valor p para test de X² de Pearson para comparación de variables categóricas o de ANOVA para variables continuas. p*: valor p para test de tendencia lineal. *: p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

3.1. Índices de severidad de la estenosis aórtica

Tal y como se muestra en la tabla 7, ni el AVAo, ni el iVAo mostraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes con EAo severa agrupados de acuerdo a terciles de FVC, sin embargo, el gradiente transvalvular medio fue significativamente menor en los pacientes con un depósito moderado de colágeno en el miocardio, comparado con los pacientes con una fibrosis miocárdica leve.

3.2. Remodelado ventricular izquierdo

La prevalencia de HVI aumentó de forma lineal y significativa con el aumento de la cuantía de colágeno en el miocardio, en los pacientes con EAo (Tabla 7). Sin embargo, a pesar de que tanto la MVI, como el IMVI, aumentaron con la severidad de la fibrosis miocárdica, esta tendencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 7).

3.3. Función ventricular izquierda

Tal y como se muestra en la tabla 7, a pesar de que el grupo de pacientes con un grado moderado de fibrosis miocárdica tendía a mostrar peores índices de función ventricular sistólica, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.

Entre los parámetros de función diastólica analizados, sólo se observó un aumento lineal y significativo en los valores del TRIV a medida que el grado de fibrosis miocárdica era más severo.

4. Evaluación de la síntesis y degradación del colágeno tipo I a nivel miocárdico

4.1. Evaluación de la síntesis y formación de las moléculas de colágeno tipo I

4.1.1. Síntesis del precursor de I colágeno tipo I: RNAm de la cadena $\alpha 1$ del procolágeno tipo I

La transcripción de la cadena alfa del procolágeno tipo I estaba significativamente aumentada en los pacientes con EAo comparada con la del grupo control (287.8 ± 34.2 u.a. vs. 37.5 ± 7.4 u.a. respectivamente, $p < 0.001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la transcripción del mismo entre los distintos grupos de pacientes con EAo ($p = 0.494$).

4.1.2. Formación de las moléculas del colágeno tipo I

a. Expresión miocárdica del sistema de la proteinasa C-terminal del procolágeno tipo I

Ni la expresión miocárdica del zimógeno de la PCP (112 kDa), ni de su forma activa (96 kDa), difirió significativamente entre los pacientes con EAo y el grupo control (Figura 20). Sin embargo el grado de activación de la misma (relación forma activa/zimógeno), fue significativamente mayor en los pacientes con EAo comparado con los del grupo control (Figura 20).

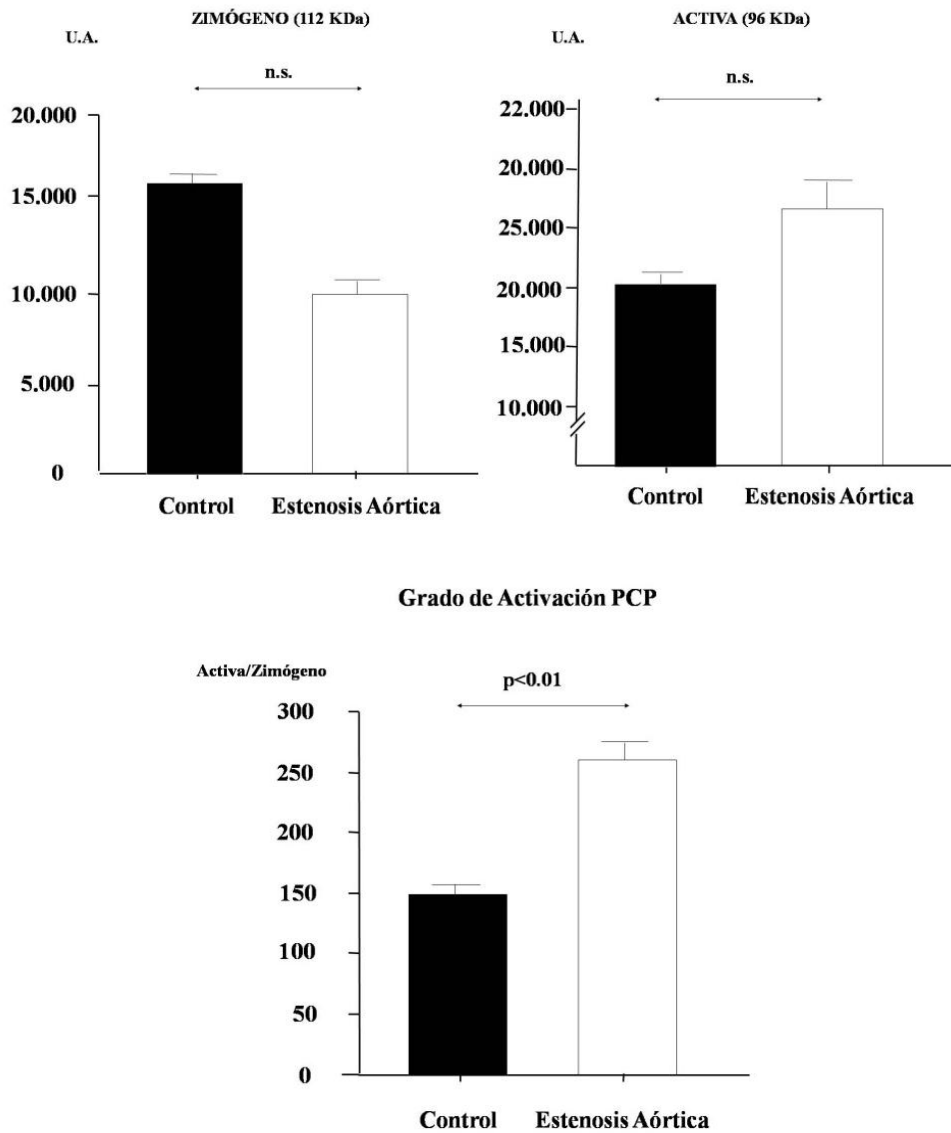


Figura 20. Las barras representan el valor medio \pm error estándar el grado de activación (relación forma activa/zimógeno) de la proteinasa C del procolágeno tipo I en los sujetos del grupo control y en los pacientes con estenosis aórtica.

Tanto la PCP en sus formas de 112 y 96 kDa, como la relación entre ambas o grado de activación aumentaron de forma lineal y significativa con el mayor grado de fibrosis miocárdica en los pacientes con EAO (Tabla 8).

Tabla 8. Expresión miocárdica la PCP en sus dos formas.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
PCP 112 kDa (*103)	6.44 ±0.67	9.51 ±2.12	12.95 ±2.56	0.084	0.028
PCP 96 kDa (*103)	12.9 ±1.3	23.8 ±7.4	43.9 ±11.5‡	0.032	0.010
PCP-Activación	2.48 ±0.20	2.33 ±0.18†	3.35 ±0.27‡	0.005	0.010

FVC: fracción de volumen de colágeno. PCP: proteinasa C del procolágeno tipo I. U.A.: unidades arbitrarias. Los valores representan media ±error estándar. p: valor p para test de ANOVA. p*: valor p para test de tendencia lineal. *: p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

b. Expresión miocárdica del enhancer de la proteinasa C-terminal del procolágeno tipo I

A diferencia de la expresión miocárdica de la PCP, la expresión de su enhancer estaba significativamente aumentada, tanto en su forma completa (55 kDa), como en su fragmento proteolítico (36 kDa), en los pacientes con EAo comparada con la de los sujetos del grupo control (3.0.7 ±0.28 U.A. vs. 0.32 ±0.03 U.A., p<0.01 y 1.72 ±0.16 U.A. vs. 0.28 ±0.02 U.A., p<0.01 respectivamente). Además, la expresión de ambas formas aumentó de forma lineal con el aumento del contenido de colágeno tipo I depositado en el miocardio de los pacientes con EAo (Tabla 9).

Tabla 9. Expresión miocárdica del enhancer de la PCP.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
PCP-Enhancer 55 kDa	2.09 ±0.15	2.77 ±0.49	4.36 ±0.49	0.002	0.001
PCP-Enhancer 36 kDa	1.20 ±0.08	1.63 ±0.32†	2.34 ±0.25‡	0.011	0.003

FVC: fracción de volumen de colágeno. PCPE: enhancer de la proteinasa C-terminal del procolágeno tipo I. U.A.: unidades arbitrarias. Los valores representan media ±error estándar. p: valor p para test de ANOVA. p*: valor p para test de tendencia lineal. *: p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

4.2. Formación y depósito de las fibras de colágeno tipo I en el miocardio

4.2.1. Expresión miocárdica de la lisil-oxidasa

En los pacientes con EAo, la expresión miocárdica de la LOX mostró una tendencia significativa al aumento lineal con mayores grados de fibrosis miocárdica (4.31 \pm 0.26 en el grupo de pacientes con fibrosis ligera, 5.29 \pm 0.42 en el grupo de pacientes con fibrosis moderada y 5.59 \pm 0.31 en el grupo de pacientes con fibrosis severa.) (Figura 21).

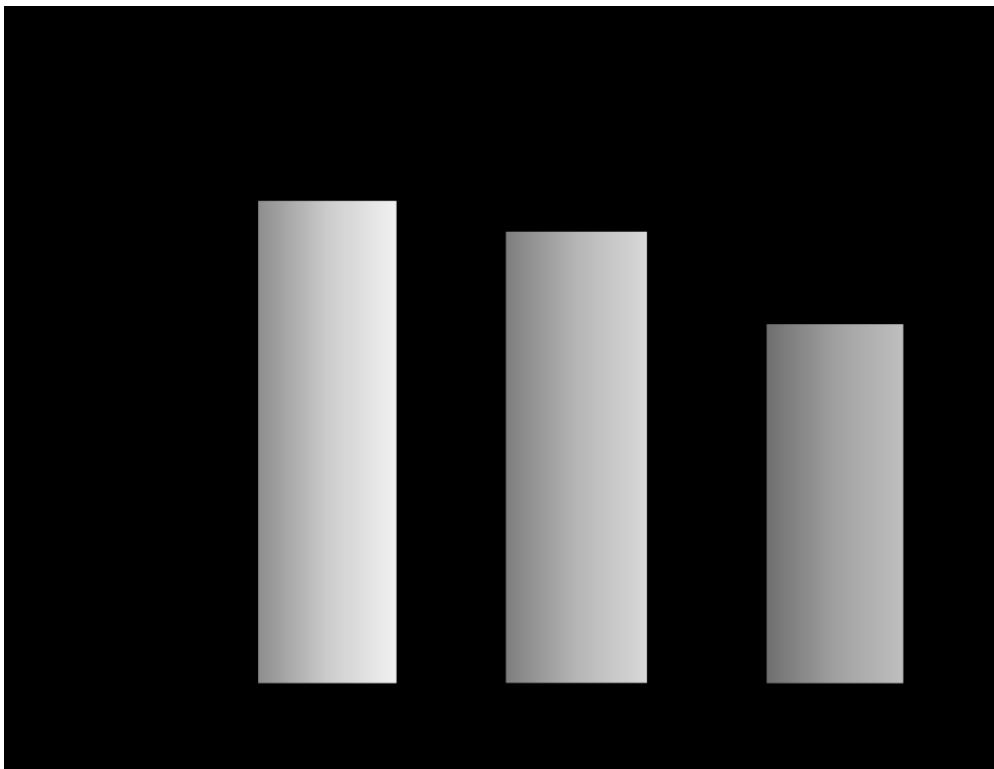


Figura 21. Las barras representan el valor medio \pm error estándar de la fracción de volumen de colágeno (FVC) en los pacientes con estenosis aórtica agrupados de acuerdo a la severidad del depósito de colágeno en el miocardio.

4.2.2. Grado de entrecruzamiento del colágeno en el miocardio

Los pacientes con EAo mostraron mayores niveles, tanto de colágeno soluble como insoluble, comparados con las muestras control, así como un mayor grado de entrecruzamiento del mismo (Figura 22).

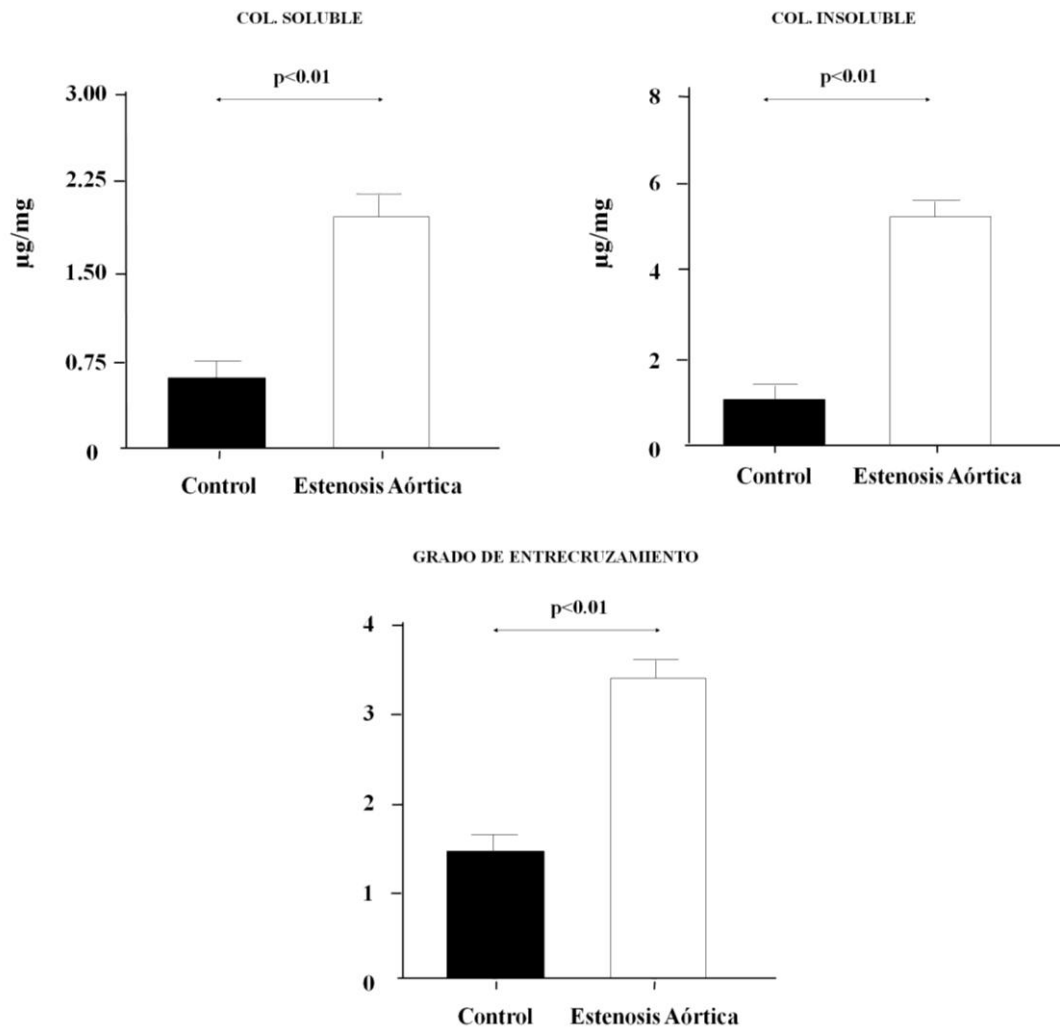


Figura 22. Contenido miocárdico de colágeno (COL.) soluble e insoluble así como grado de entrecruzamiento en pacientes con estenosis aórtica y grupo control. $\mu\text{g}/\text{mg}$: microgramo por miligramo de tejido miocárdico.

Como muestra la siguiente tabla 10, aunque el contenido de colágeno soluble tendió a disminuir y el de colágeno insoluble a aumentar con la progresión de la severidad de la fibrosis miocárdica, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Del mismo modo, se observó una tendencia al aumento del grado de entrecruzamiento entre las fibras de colágeno a medida que aumentaba el grado de severidad de la fibrosis miocárdica, aunque de nuevo esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 10. Análisis del grado de entrecruzamiento de colágeno.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
Colágeno Soluble	2.37 ±0.36	2.06 ±0.31	1.58 ±0.20	0.183	0.070
Colágeno Insoluble	4.92 ±0.64	6.27 ±1.19	5.51 ±0.62	0.560	0.662
Entrecruzamiento	2.79 ±0.65	3.83 ±0.80	3.81 ±0.44	0.450	0.285

FVC: fracción de volumen de colágeno. Los valores representan media ±error estándar. p: valor p para test de ANOVA. p*: valor p para test de tendencia lineal. *, p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

4.3. Evaluación de la degradación de colágeno tipo I a nivel miocárdico

Aunque la expresión miocárdica de la MMP-1 fue mayor en los pacientes con EAo (1.17 ± 0.19 U.A.) comparada con la de las muestras del grupo control (0.96 ± 0.16 U.A.), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, la expresión de TIMP-1 fue menor (p<0.01) en los pacientes con EAo (0.52 ± 0.08 U.A.) comparada con los sujetos control (1.16 ± 0.21 U.A.).

Mientras la expresión miocárdica de la MMP-1 disminuyó de forma significativa y lineal con la progresión de la severidad de la fibrosis miocárdica en los pacientes con EAo (Tabla 11), la expresión de su inhibidor no siguió esta tendencia, siendo significativamente menor en el grupo de pacientes con fibrosis moderado con respecto a los otros dos grupos (Tabla 11).

Tabla 11. Sistema de degradación.

	FVC (%)			p	p*
	≤9.6	9.7-20.7	≥20.8		
MMP-1 (u.a.)	1.80 ±0.47	0.95 ±0.25	0.78 ±0.22	0.085	0.039
TIMP-1 (u.a.)	0.75 ±0.19*	0.25 ±0.07	0.60 ±0.13	0.036	0.454

FVC: fracción de volumen de colágeno. MMP-1: metaloproteinasa tipo 1. TIMP-1: inhibidor de la metaloproteinasa tipo 1. U.A., unidades arbitrarias. Los valores representan media ±error estándar. p: valor p para test de ANOVA. p*: valor p para test de tendencia lineal. *, p<0.05 Grupo I vs. II, †; p<0.05 grupo II vs. III, ‡; p<0.05 grupo I vs. III.

5. Evaluación de la síntesis y degradación del colágeno tipo I a nivel bioquímico: Moléculas derivadas del metabolismo del colágeno tipo I

5.1. Propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PICP)

La concentración en sangre periférica del PICP estaba significativamente aumentada en los pacientes con EAo ($135.3 \pm 9.1 \mu\text{g/L}$) comparada con la concentración en el grupo de sujetos control ($65.7 \pm 4.8 \mu\text{g/L}$). Además, dicho aumento fue gradual a medida que el grado de severidad de la fibrosis miocárdica fue mayor ($103.9 \pm 6.7 \mu\text{g/L}$, $110.7 \pm 5.5 \mu\text{g/L}$, $193.5 \pm 14.7 \mu\text{g/L}$, $p < 0.001$).

La concentración de PICP en sangre de seno coronario fue mayor que en sangre periférica en los pacientes con EAo ($168.3 \pm 11.3 \mu\text{g/L}$ vs. $135.3 \pm 9.1 \mu\text{g/L}$ respectivamente), siendo esta diferencia además estadísticamente significativa (Figura 23).

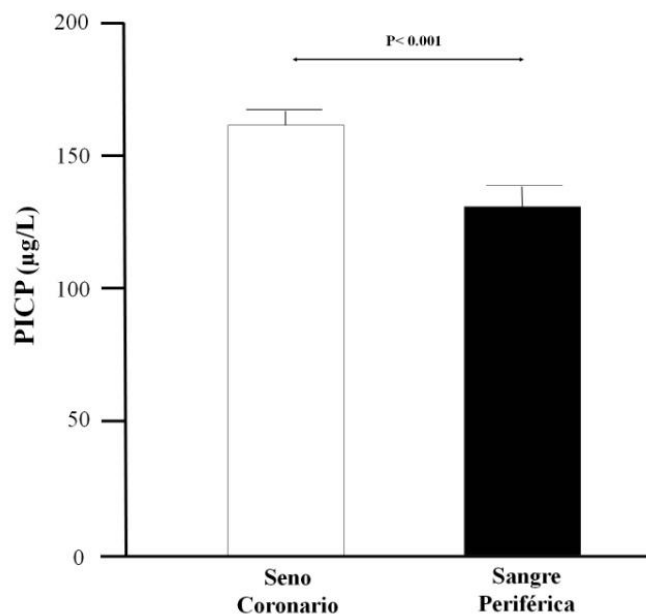


Figura 23. Comparación de las concentraciones del propéptido C-terminal de procolágeno tipo I (PICP) en sangre periférica (SgP) y en sangre de seno coronario (SgC).

5.2. Metaloproteinasa de matriz tipo I (MMP-1)

La concentración plasmática de la MMP-1 se encontraba aumentada significativamente en el grupo de pacientes con EAo (8.37 ± 0.56) con respecto al grupo control (4.91 ± 0.55). No obstante, se encontró una tendencia inversa entre los niveles de la MMP-1 y el depósito de colágeno fibrilar en el miocardio, de manera que la concentración plasmática de la MMP-1 disminuía cuanto más severo era el grado de fibrosis miocárdica presente en los pacientes con EAo (grupo I: 9.47 ± 0.89 ng/ml, grupo II: 8.14 ± 1.15 ng/ml y grupo III: 7.80 ± 0.69 ng/ml), aunque esta tendencia no fue significativa.

La concentración en sangre de seno coronario del MMP-1 fue mayor que la concentración de la misma en sangre periférica (15.57 ± 1.55 ng/ml vs. 8.37 ± 0.56 , $p < 0.001$). Además, ambas concentraciones mostraron una correlación directa y significativa entre ellas ($r = +0.389$, $p = 0.022$).

5.3. Inhibidor de la metaloproteinasa de matriz tipo I (TIMP-1)

Las concentraciones plasmáticas del TIMP-1 se encontraron significativamente aumentadas en los pacientes con EAo (1083.9 ± 56.6 ng/ml) comparada con la concentración determinada en el grupo de sujetos control (290.4 ± 47.1 ng/ml). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la concentración de TIMP-1 entre los 3 grupos de pacientes clasificados en función a la FVC (grupo I: 1043.3 ± 110.6 ng/ml, grupo II: 980.9 ± 80.2 ng/ml, grupo III: 1231.5 ± 82.7 ng/ml).

5.4. Cociente de la metaloproteinasa de matriz tipo I y su inhibidor (MMP1:TIMP1)

A diferencia de sus componentes por separado, la relación entre las concentraciones en sangre periférica de la MMP-1 I y su inhibidor disminuyeron de forma lineal y estadísticamente significativa en los pacientes con EAo conforme progresó el grado de fibrosis miocárdica determinada histológicamente (grupo I: 1.02 ± 0.13 , grupo II: 0.75 ± 0.07 , grupo III: 0.66 ± 0.08 , p del Anova = 0.044 y p de tendencia = 0.017) (Figura 24).

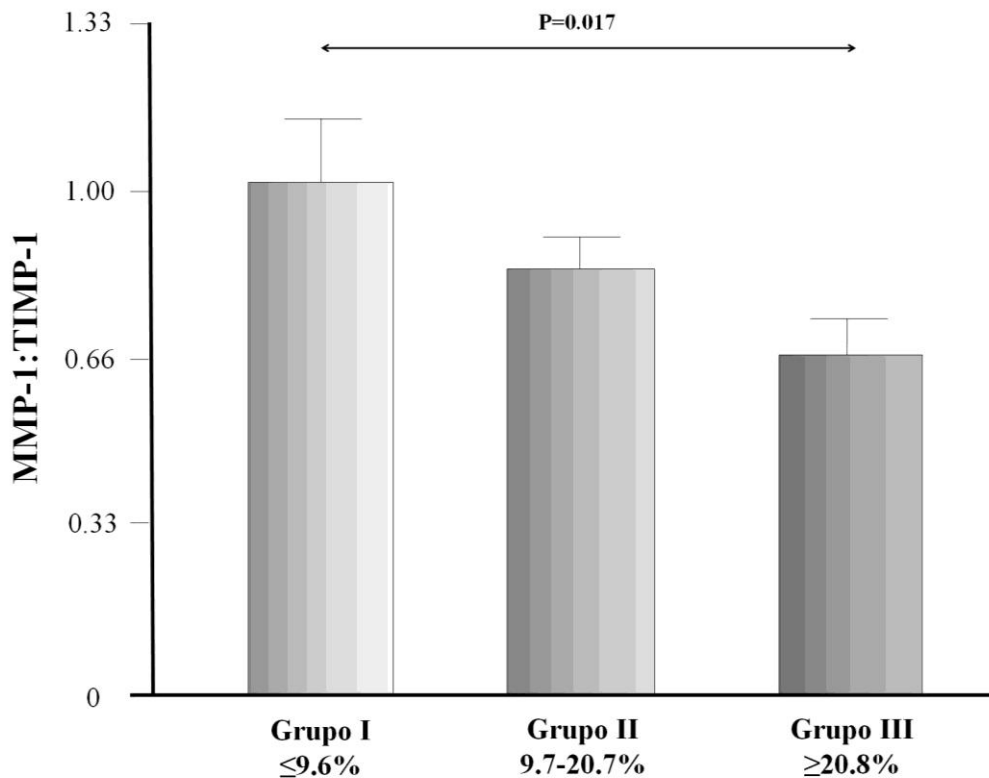


Figura 24. Cociente entre las concentraciones en sangre periférica de metaloproteinasas de matriz tipo I y su inhibidor (MMP1:TIMP1) en los grupos de pacientes con estenosis aórtica severa agrupados en función de la fracción de volumen de colágeno en el miocardio. P: valor p para test de tendencia lineal.

6. Análisis de asociaciones

6.1. Parámetros asociados con el sistema de síntesis y degradación del colágeno tipo I

6.1.1. Características generales

Tal y como se muestra en la tabla 12, no se encontró asociación entre las características generales de los pacientes (edad, sexo, distribución de factores de riesgo cardiovascular) y las distintas isoformas de la PCP. Sin embargo, el sexo femenino se asoció de forma inversa con la forma de 55 kDa del enhancer de la PCP, del mismo modo que la hipertensión arterial con la forma de 36 kDa del mismo. Por último, se encontró una asociación inversa entre la expresión de MMP-1 en el miocardio y la edad.

Ni la PAS ni la PAD se asociaron con los sistemas de síntesis y degradación del colágeno tipo I. Sin embargo la frecuencia cardíaca se asoció de forma inversa con e la expresión miocárdico de la isoforma de 36 kDa del PCPE.

6.1.2. Severidad de la estenosis aórtica

No se observaron asociaciones significativas entre los distintos elementos implicados en la síntesis y degradación de colágeno tipo I en el miocardio y el gradiente transvalvular aórtico máximo o medio. Tanto el AVAo como el iAVAo se asociaron de forma directa con la expresión de MMP-1 determinada por técnicas de biología molecular (Tabla 12).

6.1.3. Índices de postcarga ventricular

El estrés parietal sistólico del ventrículo izquierdo, tanto meridional como circunferencial, se asoció de forma directa y significativa con las distintas formas de la PCP, así como con la expresión miocárdica de la LOX en el miocardio de los pacientes EAo (ver tabla 13). No se observaron otras asociaciones significativas entre postcarga ventricular y el sistema de síntesis y formación y degradación del colágeno fibrilar. Estas asociaciones no se modificaron de forma significativa en función de la edad, el sexo, el antecedente de hipertensión arterial o la frecuencia cardíaca (Tabla 14).

Tabla 12. Análisis de asociaciones I.

	PCP 112		PCP 96		PCP Act		PCPE 55		PCPE 36		LOX		MMP-1		TIMP-1	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad	0.154	0.192	0.187	0.145	0.212	0.114	-0.113	0.263	-0.162	0.180	-0.184	0.149	-0.441	0.005	-0.062	0.363
Sexo	-0.191	0.139	-0.231	0.095	-0.274	0.059	-0.402	0.009	-0.281	0.054	-0.293	0.046	-0.044	0.403	-0.004	0.492
Hipertensión arterial	-0.069	0.349	-0.013	0.471	0.046	0.399	-0.282	0.053	-0.309	0.038	-0.216	0.110	-0.043	0.404	-0.054	0.380
Enfermedad Coronaria	-0.040	0.411	-0.075	0.337	-0.068	0.352	-0.073	0.341	-0.040	0.410	-0.074	0.338	-0.007	0.483	-0.018	0.459
PAS	-0.050	0.390	-0.012	0.473	0.057	0.373	0.093	0.301	0.168	0.171	-0.117	0.255	0.101	0.285	0.119	0.251
PAD	-0.230	0.096	-0.185	0.148	-0.175	0.161	-0.039	0.414	0.006	0.487	0.030	0.433	-0.004	0.491	-0.203	0.125
Frec. Cardíaca	0.017	0.461	-0.052	0.384	-0.134	0.225	-0.184	0.149	-0.291	0.047	0.123	0.243	-0.170	0.168	-0.182	0.151
Gradiente Máximo	-0.091	0.304	-0.147	0.204	-0.169	0.169	-0.269	0.062	-0.200	0.129	-0.150	0.198	0.167	0.172	0.103	0.282
Gradiente Medio	-0.065	0.360	-0.084	0.322	-0.046	0.400	-0.213	0.117	-0.170	0.172	-0.130	0.236	0.156	0.193	0.084	0.322
AVAo	-0.066	0.355	-0.050	0.390	-0.228	0.097	0.171	0.166	0.114	0.260	-0.080	0.326	0.357	0.019	0.174	0.163
iAVAo	-0.157	0.195	-0.175	0.169	-0.383	0.015	0.108	0.279	0.123	0.251	-0.161	0.189	0.412	0.010	0.170	0.176
NT-proBNP	0.036	0.420	-0.046	0.406	0.156	0.189	0.349	0.022	0.324	0.031	0.318	0.033	-0.133	0.227	-0.141	0.214

PCP; proteinasa C-terminal del procolágeno tipo I, PCPE; enhancer de PCP, LOX; lisil oxidasa, MMP-1: metaloproteínasa de matriz tipo I, TIMP-1; inhibidor de la MMP-1, AVAo; área valvular aórtica, iAVAo; AVAo indexada, PAS; presión arterial sistólica, PAD; presión arterial diastólica, Frec; frecuencia. r; coeficiente de correlación de Pearson, p valor de probabilidad.

Tabla 13. Análisis de asociaciones II

	cESS		mESS	
	r	P	r	p
PCP 112 kDa	0.460	0.004	0.474	0.003
PCP 96 kDa	0.472	0.003	0.480	0.003
PCP Act	0.274	0.064	0.260	0.075
PCPE 55	0.213	0.121	0.180	0.163
PCPE 36	0.156	0.197	0.123	0.251
LOX	0.463	0.004	0.473	0.003
MMP-1	0.127	0.245	0.095	0.303
TIMP-1	0.033	0.428	0.004	0.491

PCP; proteinasa C del procolágeno tipo I, PCPE; enhancer de la proteinasa C del procolágeno tipo I, LOX; lisil oxidasa, MMP-1: metaloproteinasa de matriz tipo I, TIMP-1; inhibidor de la metaloproteinasa 1 de matriz tipo I. r; coeficiente de correlación de Pearson, p valor de probabilidad.

Tabla 14. Análisis de asociaciones III

	cESS								mESS							
	PCP 112 kDa		PCP 96 kDa		PCP Act		LOX		PCP 112 kDa		PCP 96 kDa		PCP Act		LOX	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad	0.547	0.001	0.573	<0.001	0.373	0.019	0.425	0.009	0.563	<0.001	0.582	<0.001	0.358	0.024	0.436	0.007
Sexo	0.482	0.003	0.496	0.002	0.216	0.122	0.427	0.008	0.508	0.002	0.512	0.002	0.197	0.144	0.442	0.006
HTA	0.450	0.006	0.475	0.003	0.290	0.057	0.407	0.012	0.466	0.004	0.484	0.003	0.276	0.067	0.416	0.010
Frec.	0.459	0.005	0.471	0.004	0.291	0.056	0.454	0.005	0.466	0.004	0.481	0.003	0.282	0.062	0.463	0.004

PCP; proteinasa C del procolágeno tipo I, PCPE; enhancer de la proteinasa C del procolágeno tipo I, Lox; lisil oxidasa, MMP-1: metaloproteínasa de matriz tipo I, TIMP-1; inhibidor de la metaloproteínasa 1 de matriz tipo I. Frec.; frecuencia cardíaca, r; coeficiente de correlación de Pearson, p valor de probabilidad.

6.2. Asociación entre los sistemas enzimáticos que controlan el metabolismo del colágeno y alteraciones estructurales que se producen en el miocardio

6.2.1. Fracción de volumen de colágeno

Tal y como se muestra en la tabla 15 los sistemas enzimáticos implicados en la síntesis y formación de las fibras de colágeno tipo I (la PCP y su potenciador, así como la enzima LOX) se asociaron de forma directa con el depósito de colágeno en el miocardio y de forma inversa con la MMP-1. Estas asociaciones no se modificaron de forma significativa en función de la edad, sexo o la hipertensión arterial antecedente.

Tabla 15. Análisis de asociaciones IV

	FVC	
	r	p
PCP 112 kDa	0.396	0.010
PCP 96 kDa	0.442	0.004
PCP Act	0.391	0.011
PCPE 55	0.486	0.002
PCPE 36	0.403	0.009
LOX	0.387	0.012
MMP-1	-0.318	0.033
TIMP-1	-0.087	0.313

PCP; proteinasa C del procolágeno tipo I, PCPE; enhancer de la proteinasa C del procolágeno tipo I, LOX; lisil oxidasa, MMP-1: metaloproteinasa de matriz tipo I, TIMP-1; inhibidor de la metaloproteinasa 1 de matriz tipo I. r; coeficiente de correlación de Pearson, p valor de probabilidad.

6.2.2. Grado de entrecruzamiento

Ni la cantidad de colágeno tipo I soluble, insoluble o el grado de entrecruzamiento del mismo se asoció con los sistemas enzimáticos implicados en la síntesis o degradación del colágeno.

Sin embargo, la expresión miocárdica de LOX se relacionó de forma inversa con la cuantía de colágeno soluble y de forma directa con la de colágeno insoluble. Finalmente, el grado de entrecruzamiento del colágeno tipo I se asoció de forma intensa, directa y estrecha con la expresión de la LOX en el miocardio, (Tabla 16 y figura 24).

Tabla 15. Análisis de asociaciones V

	LOX	
	r	p
Colágeno soluble	-0.441	0.006
Colágeno insoluble	0.588	<0.001
G. entrecruzamiento	0.731	<0.001

Análisis de asociación entre la cuantía de colágeno soluble, insoluble, grado de entrecruzamiento del colágeno y la expresión miocárdica de la lisil-oxidasa (LOX). r; coeficiente de correlación de Pearson, p valor de probabilidad.

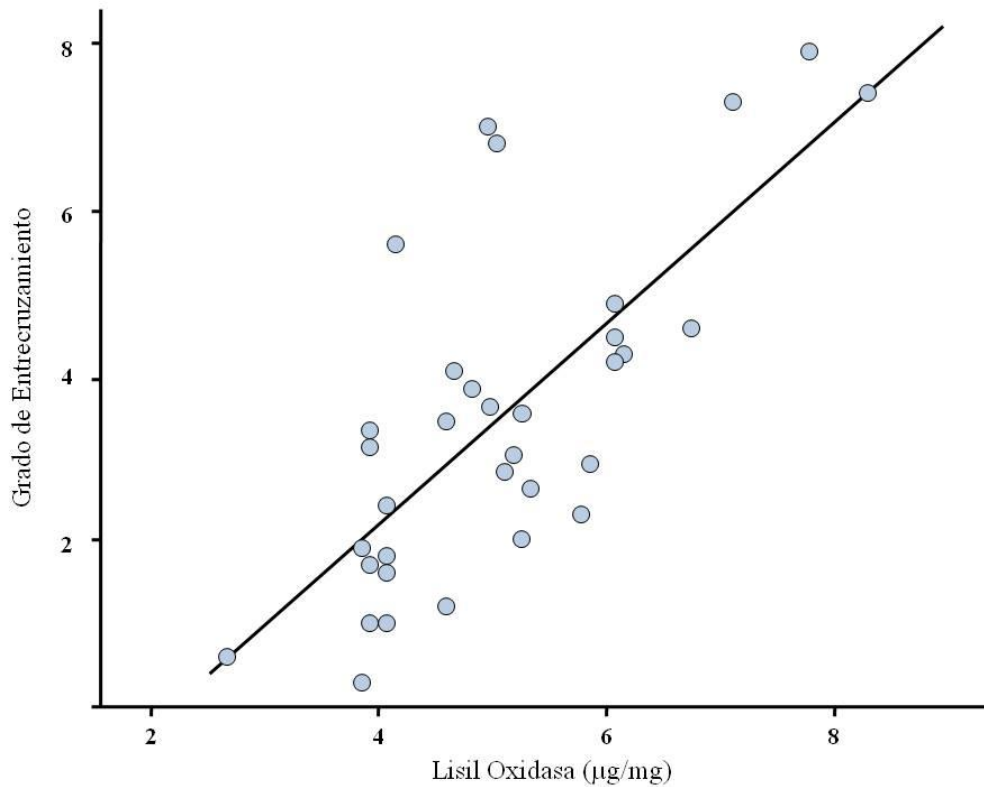


Figura 24. Diagrama de dispersión y recta de ajuste del análisis univariado ($y=-2.7+1.2x$) entre la expresión miocárdica de la lisil oxidasa y el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno en el miocardio.

6.3. Asociación entre alteraciones estructurales y función ventricular izquierda

6.3.1. Índices de función ventricular sistólica

Ni la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, el acortamiento mesocárdico corregido, los volúmenes telediastólico o telesistólico se asociaron de forma significativa con la FVC o con el grado de entrecruzamiento del mismo. Sin embargo tanto la FVC ($r=-0.309$, $p=0.043$) como el grado de entrecruzamiento de las fibras ($r=-0.365$, $p=0.024$) se asociaron de forma inversa con el índice de volumen latido (Figura 25).

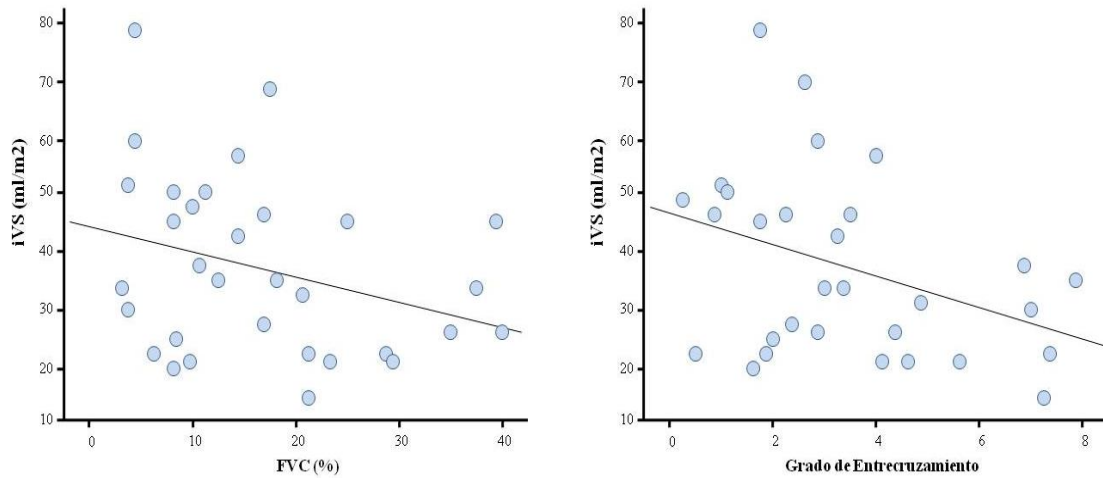


Figura 25. Diagrama de dispersión y recta de ajuste entre el índice de volumen latido (iVS) y la fracción de volumen de colágeno (FVC) y el grado de entrecruzamiento de las fibras ($x=44.8-0.45y$ y $x=46.5-2.1y$ respectivamente).

6.3.2. Índices de función ventricular diastólica

Tanto la cuantía, evaluada por la FVC, como la calidad del colágeno, representada por el grado de entrecruzamiento del colágeno tipo I en el miocardio, se asociaron con alteraciones de la función ventricular diastólica, aunque en distintos momentos del ciclo cardíaco.

La FVC se asoció de forma directa y significativa con el TRIV ($r=0.604$, $p=0.003$, $x=54.2+2.8y$) pero no con otros índices de función ventricular diastólica (onda E de llenado mitral, onda A, relación EA o tiempo de deceleración).

El grado de entrecruzamiento del colágeno aunque no se asoció con el TRIV, sí mostró asociaciones significativas con la onda A de llenado mitral, con la relación EA, con el TD (Tabla 16) así como de forma inversa con la KVI ($r=-0.384$, $p=0.016$, ver figura 26). Esta última asociación se debió principalmente a la aumento del contenido de colágeno insoluble en el miocardio ($r=0.301$, $p=0.050$) y no tanto a la disminución de la forma soluble ($r=0.209$, $p=0.130$).

Tabla 17. Análisis de asociaciones VI.

	FVC (%)		Grado de entrecruzamiento	
	r	p	r	p
TRIV	0.604	0.003	-0.081	0.378
Onda E	0.205	0.122	0.180	0.162
Onda A	-0.195	0.160	-0.534	0.002
Relación E/A	0.128	0.258	0.386	0.026
T. Deceleración	0.021	0.454	-0.303	0.046

TRIV; tiempo de relajación isovolumétrica, r; coeficiente de correlación de Pearson.

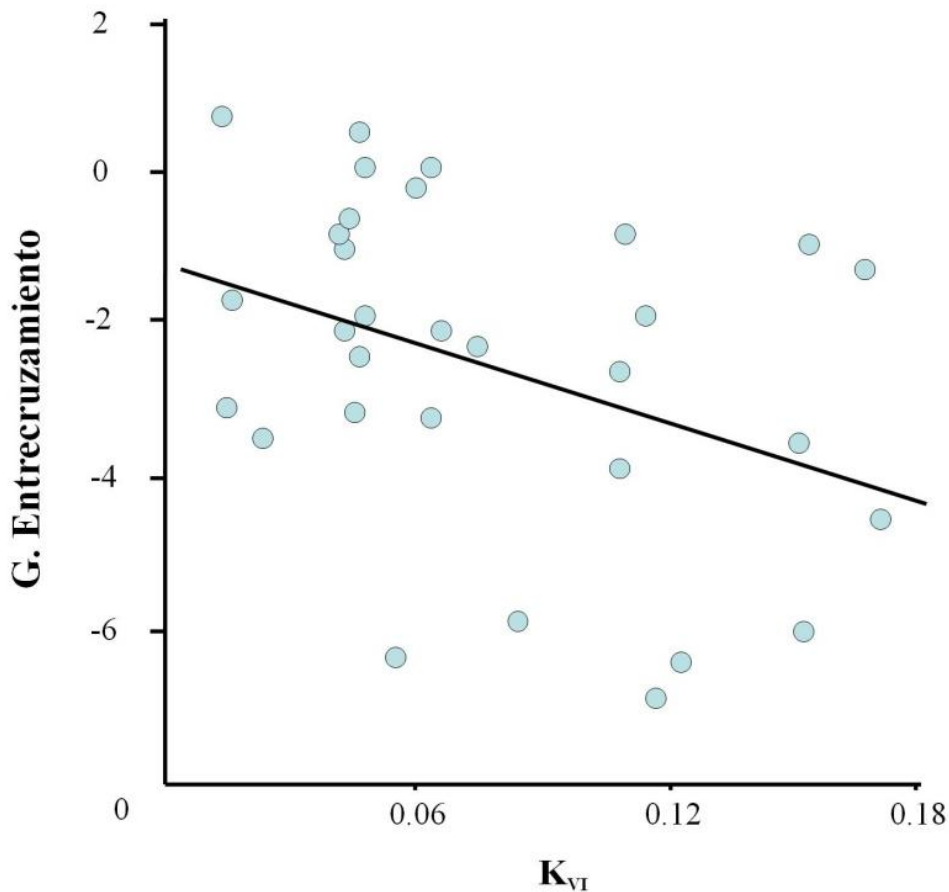


Figura 26. Diagrama de dispersión y recta de ajuste ($x=47 \cdot 10^{-3}+8 \cdot 10^{-3}y$) entre el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno y la constante de rigidez ventricular izquierda (K_{vi}).

6.4. Utilidad de los péptidos derivados del metabolismo del colágeno como posibles marcadores del metabolismo del colágeno en el miocardio

6.4.1. PICP marcador de síntesis y depósito de colágeno en el miocardio

Las concentraciones del PICP en las muestras de sangre periférica se asociaron de forma directa y estrecha ($r=+0.788$, $p<0.001$) con la FVC en el miocardio así como con el grado de activación de la PCP ($r=+0.291$, $p=0.047$) (Figura 27).

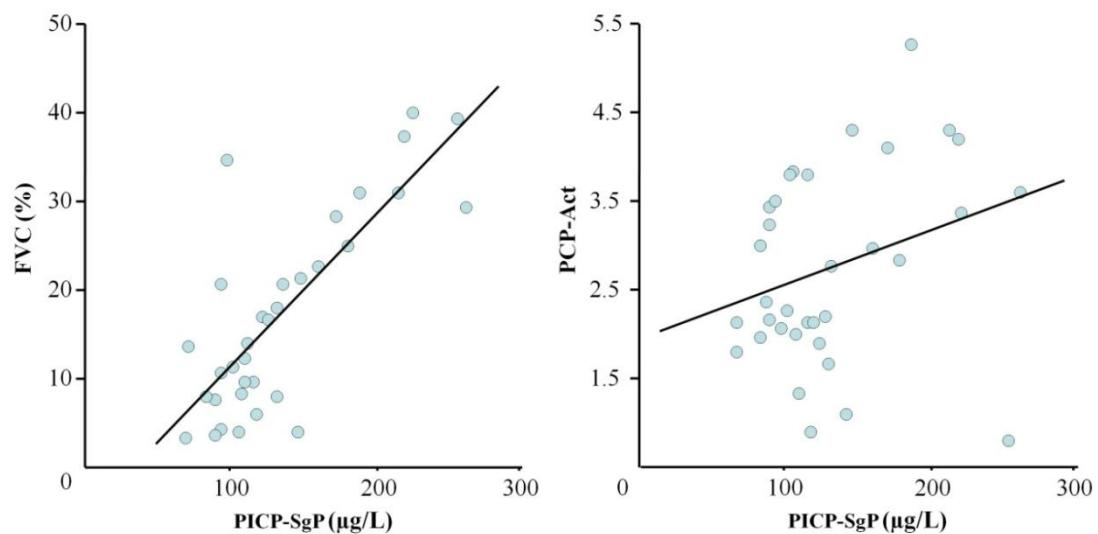


Figura 27. Diagrama de dispersión y recta de ajuste del análisis univariado entre las concentraciones del propéptido carboxi-terminal de procolágeno I (PICP) en sangre periférica (SgP), la fracción de volumen de colágeno (FVC) en el miocardio y el grado de activación de la proteinasa del procolágeno I (PCP-Act), $x=72+4y$ y $x=8+1y$ respectivamente.

6.4.2. Origen cardiaco de los péptidos derivados del metabolismo del colágeno

Las concentraciones de PICP, MMP-1, TIMP-1 y el cociente obtenido entre ambas en muestras procedentes de seno coronario y sangre periférica mostraron una asociación directa, estrecha y significativa en pacientes con EAo (Tabla 18).

Tabla 15. Análisis de asociaciones V.

	r	p
PICP	0.958	<0.001
MMP-1	0.398	0.011
TIMP-1	0.298	0.046

Análisis de asociación entre las concentraciones entre seno coronario y sangre periférica del propéptido carboxi-terminal del procolágeno I (PICP), metalproteinasa de matriz I (MMP-1) y del inhibidor tisular de las metaloproteinasas de matriz tipo I (TIMP-1). r; coeficiente de correlación de Pearson, p valor de probabilidad.

CONCLUSIONES

1. La EAo se asocia con un aumento invariable del contenido de colágeno en el miocardio, siendo éste de diversa cuantía. Mayores grados de fibrosis miocárdica se asocian con insuficiencia cardíaca como síntoma de presentación clínica y con mayor prevalencia de fibrilación auricular permanente.

2. La fibrosis miocárdica en pacientes con EAo es debida a una mayor eficiencia del sistema de síntesis de colágeno tipo I en el miocardio así como a menor degradación del mismo dado que una mayor FVC implica:
 - a. Un incremento lineal del grado de activación de la PCP así como de su enhancer.
 - b. Una disminución progresiva del contenido miocárdico de MMP-1 libre o activa en el miocardio.

3. La postcarga ventricular izquierda está involucrada en la regulación de la actividad de la PCP y de la LOX en pacientes con EAo dado que el estrés circunferencial y meridional sistólico se asociaron de forma directa con:
 - a. El contenido miocárdico de PCP en sus dos formas.
 - b. El contenido miocárdico de LOX.

4. El incremento del grado de activación de PCP regula el mayor depósito de colágeno tipo I en el miocardio en la EAo severa. El grado de activación de ésta enzima se asoció con la FVC, como índice de depósito miocárdico de colágeno.

5. El incremento de LOX en el miocardio implica un mayor grado de entrecruzamiento del colágeno tipo I. De hecho el contenido miocárdico de LOX se asoció:
 - a. De forma inversa con el contenido de colágeno soluble.
 - b. De forma directa con el contenido de colágeno insoluble.
 - c. De forma directa con el grado de entrecruzamiento de las fibras de colágeno tipo I en el miocardio.

6. La severidad cuantitativa de la fibrosis miocárdica, evaluada como FVC, implica una relajación ventricular alterada (mayor tiempo de relajación isovolumétrica) y con un menor índice de volumen latido (peor función ventricular sistólica) en pacientes con EAo.

7. La alteración cualitativa del colágeno tipo I en el miocardio, evaluada como grado de entrecruzamiento de las fibras, se asocia con un patrón de llenado ventricular de carácter restrictivo, una mayor rigidez ventricular y con un menor índice de volumen sistólico.

8. El PICP es un excelente marcador en sangre periférica del grado de síntesis y depósito de colágeno en el miocardio en pacientes con EAo:
 - a. La concentración en sangre periférica de PICP se asoció de forma estrecha y directa tanto con la FVC como con el grado de activación de la proteinasa C del procolágeno tipo I.
 - b. La presencia de un gradiente de concentración entre seno coronario y sangre periférica así como la estrecha asociación entre ambas concentraciones confirman el origen cardiaco de éste marcador en pacientes con EAo.

9. El cociente entre la MMP-1 y su inhibidor en sangre refleja el estado del sistema de degradación del colágeno tipo I en el miocardio en pacientes con EAo severa.

DISCUSIÓN

1. Fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica

1.1. Presencia, distribución y grados

La EAo se asocia con un aumento invariable del contenido de colágeno en el miocardio (*Maron y cols., 1975; Schaper y cols., 1981; Krayenbuehl y cols., 1989*). De acuerdo con estos estudios, la presencia de fibrosis miocárdica en nuestro trabajo fue invariable. Todos los pacientes mostraron una FVC superior al valor representativo de la normalidad. Además la FVC media en los pacientes con EAo fue significativamente mayor que en las muestras control.

A pesar de las consideraciones previas, existió una amplia variabilidad en el grado de fibrosis miocárdica entre los pacientes con EAo. De hecho, la agrupación de estos pacientes en función de la cuantía de fibrosis miocárdica mostró relevancia tanto estructural como clínica.

Desde el punto de vista estructural, grados mayores de fibrosis miocárdica se asociaron a un aumento del depósito de colágeno tanto a nivel misial, perivascular como cicatricial. Sin embargo en términos relativos la importancia de los depósitos cicatriciales aumentó con la severidad de la fibrosis miocárdica. De acuerdo con nuestros hallazgos, Maron y cols. describieron la presencia de algún grado de fibrosis misial en todos los pacientes con EAo mientras que solo aquellos que mostraban áreas de degeneración miocitaria severa presentaban focos de fibrosis cicatricial (*Maron y cols., 1975*). De hecho ambos procesos, fibrosis miocárdica y degeneración cardiomiocitaria, participan como sustrato estructural al daño miocárdico asociado a la sobrecarga crónica de presión impuesta por la EAo (*Hein y cols., 2003*).

La presencia de fibrosis misial y cicatricial está bien caracterizada en pacientes con EAo severa (*Maron y cols., 1975; Hein y Schaper, 2001*). Sin embargo, *Schwartzkopff y cols. (1992)* describieron la ausencia de fibrosis perivascular en pacientes con EAo a diferencia de lo que ocurre en la cardiopatía hipertensiva. Esto podría ser debido a que en la EAo el lecho

vascular coronario no está sometido a la sobrecarga crónica de presión al ser la obstrucción subcoronaria. La evidencia actual soporta nuestros hallazgos de un depósito exagerado de colágeno perivascular en pacientes con EAo, debido a: 1) la relevancia de factores no hemodinámicos en la fisiopatología de la fibrosis miocárdica en éstos pacientes (*Fielitz y cols.*, 2001), 2) el papel que desempeña el remodelado ventricular en la disminución de la reserva coronaria (*Vasalli y cols.*, 1995; *Julius y cols.*, 1997), 3) la importancia de las alteraciones del lecho vascular en la fisiopatología de la EAo (*Briand y cols.*, 2005; *Hachicha y cols.*, 2007; *Arani y Carleton*, 1967).

1.2. Determinantes biológicos

1.2.1. Factores hemodinámicos: postcarga ventricular

La EAo determina un incremento del estrés biomecánico al que se encuentra sometido el miocardio. La obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo implica un aumento de la presión intraventricular que es necesario generar para eyectar la sangre al lecho vascular. El aumento de la tensión a la que se someten los distintos componentes del miocardio (cardiomiocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos, etc) durante el ciclo cardiaco determina una serie de respuestas biológicas encaminadas a normalizar la postcarga ventricular, aumentar la rigidez sistólica del ventrículo izquierdo y a aumentar/mantener la capacidad de eyectiva del mismo (*Opie*, 2004). Entre estas respuestas se encuentra la fibrosis miocárdica. La transducción de la sobrecarga crónica de presión en señales biológicas que modifican el fenotipo miocárdico no están bien establecidas (*Díez y cols.*, 2005). Se ha implicado la deformación mecánica del citoesqueleto y la disrupción de conexiones intercelulares y de la interfase celular-matriz extracelular.

Nuestros datos sugieren que el principal determinante del aumento de la síntesis de colágeno tipo I en el miocardio de pacientes con EAo es la postcarga ventricular, evaluada como estrés circunferencial sistólico. Éste se asoció de forma directa, significativa y de forma consistente con elementos clave en la síntesis y maduración del colágeno tipo I extracelular: PCP en sus dos formas y LOX. Además estas asociaciones no se modificaron por co-

factores relevantes en el remodelado ventricular en pacientes con EAo como la edad, el sexo o la hipertensión arterial (*Villari y cols.*, 1995 y 1997; *Douglas y cols.*, 1998; *Taruma y cols.*, 1999; *Chambers y cols.*, 2004). Esta asociación no se produjo con los componentes de la postcarga ventricular de forma aislada: PAS y gradiente transvalvular aórtico. Tampoco se observó asociación entre los índices de postcarga ventricular y el sistema de degradación de colágeno tipo I en el miocardio.

Estudios *in vitro* han mostrado que la síntesis de colágeno tipo I está estimulada en fibroblastos sometidos a sobrecarga de presión (*Bishop y Lindahl*, 1999) y que la deformación mecánica que ésta implica, activa múltiples vías de señalización celular potencialmente implicadas en la fibrosis miocárdica (*Wakatsuki y cols.*, 2004). Observaciones clínicas previas apoyan, de forma indirecta, el papel de la postcarga ventricular en la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo. *Krayenbuehl y cols.* (1989) han descrito como la corrección quirúrgica de la sobrecarga crónica de presión se acompaña de forma tardía con una regresión del depósito excesivo de colágeno tipo I en el miocardio en pacientes con EAo.

1.2.2. Factores no hemodinámicos

Otros factores como la edad o el sexo constituyen modificadores del efecto biológico de la sobrecarga de presión en el remodelado ventricular izquierdo en pacientes con EAo.

La senescencia se asocia con mayores grados de fibrosis miocárdica y alteraciones más severas de los índices de llenado ventricular en pacientes con EAo para un mismo grado de severidad de la enfermedad (*Villari y cols.*, 1997). Nuestros datos demuestran una asociación inversa y significativa entre el contenido miocárdico de MMP-1 y la edad, sugiriendo que la inhibición de la degradación de colágeno tipo I podría constituir un elemento de especial importancia en pacientes añosos como causante de fibrosis miocárdica.

De forma análoga, el sexo también determina diferencias en el remodelado ventricular y de la MEC en pacientes con EAo. Los pacientes

varones tienden a tener alteraciones estructurales más avanzadas de la MEC que las mujeres (*Villari y cols.*, 1995) para el mismo grado de severidad hemodinámica de la enfermedad, reproduciéndose estos hallazgos en modelos murinos de EAO (*Douglas y cols.*, 1998; *Tamura y cols.*, 1997). El enhancer de la proteinasa C de 55 kDa y la lisil oxidasa se asociaron de forma inversa y significativa con el sexo femenino en nuestro estudio. Estas diferencias podrían justificar al menos en parte las observaciones clínicas comunicadas por *Villari y cols* (1995).

1.3. Mecanismos moleculares

La producción neta y depósito de colágeno en el miocardio depende del balance entre su síntesis y degradación. Se ha propuesto que la fibrosis miocárdica es resultado de un aumento en la síntesis en presencia de una degradación no modificada o disminuida (*Weber y Eghbali*, 1991). A pesar de la sólida evidencia científica que respalda el papel que desempeña la fibrosis miocárdica en la fisiopatología de la EAO, pocos datos aportan conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en ella, siendo éstos de interés al ser dianas terapéuticas potenciales.

1.3.1. Síntesis y formación de la molécula de colágeno tipo I

Nuestros datos permiten inferir que la presencia de fibrosis miocárdica en pacientes con EAO se debe, en parte, tanto a una activación transcripcional de su precursor (cadena $\alpha 1$ del procolágeno) como a una mayor eficiencia del sistema enzimático de su procesamiento extracelular. El contenido miocárdico de ARNm de la cadena $\alpha 1$ del procolágeno fue significativamente mayor en los pacientes con EAO comparado con las muestras control. Además estos pacientes mostraron: a) un mayor grado de activación de la PCP (sin un aumento cuantitativo del mismo), b) una mayor disponibilidad de su potenciador o enhancer en sus dos formas.

Sin embargo, la severidad de la fibrosis miocárdica se debió solo a una mayor eficiencia del sistema enzimático de su procesamiento extracelular y no a un aumento transcripcional de su precursor, ya que con mayores grados

de fibrosis miocárdica: a) la expresión del ARNm de la cadena $\alpha 1$ -procolágeno no difirió significativamente y b) se observó un aumento lineal de la PCP en sus dos formas, de su grado de activación así como de ambas formas de su enhancer.

a. ARNm de la cadena $\alpha 1$ -procolágeno

Datos previos demuestran el aumento transcripcional de la cadena $\alpha 1$ procolágeno en pacientes con EAo severa comparado con muestras control (*Fielitz y cols.*, 2001; *Heymans y cols.*, 2005) y que éste aumento transcripcional implica un mayor contenido de colágeno tipo I en el miocardio (*Heymans y cols.*, 2005; *Polyakova y cols.*, 2004). La activación de vías de señalización celular en las que participan el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y el sistema renina-angiotensina-aldosterona local podrían ser las responsables de este aumento transcripcional (*Fielitz y cols.*, 2001). No existen datos previos que hayan explorado la presencia de un aumento transcripcional de la cadena $\alpha 1$ del procolágeno como responsable de la severidad de la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo.

b. Proteinasa C del procolágeno tipo I

Pocos datos hay disponibles que establezcan el papel que desempeña la pcp y su enhancer en el metabolismo y depósito del colágeno tipo I en pacientes con EAo. *Heymans y cols.* (2005) demostraron una activación transcripcional tanto de la PCP como de su enhancer en pacientes con EAo. Nuestros datos muestran además su implicación directa en la síntesis y depósito de moléculas de colágeno tipo I en el miocardio: el grado de activación de la PCP se asoció de forma estrecha y significativa con las concentraciones del PICP circulante y con la FVC.

1.3.2. Formación y depósito de la fibra del colágeno tipo I

a. Lisil oxidasa y grado de entrecruzamiento

La LOX cataliza la formación de puentes entre las distintas moléculas de colágeno y es activada por la acción de la PCP (*Cronshaw y cols.*, 1995; *Panchenko y cols.*, 1996). *Sivakumar y cols.* (2008) han descrito una

regulación al alza de ésta en pacientes con miocardiopatía dilatada. *Heymans y cols.* (2005) encontraron resultados similares en pacientes con EAo. Sin embargo el papel específico de la LOX y sus implicaciones fisiopatológicas en el remodelado de la MEC en el miocardio humano no están establecidos.

En nuestro estudio, el contenido miocárdico de LOX aumentó de forma lineal entre los pacientes agrupados en función de la cuantía de colágeno en el miocardio, existiendo además una correlación estrecha y significativa entre el grado de entrecruzamiento del colágeno y las concentraciones de LOX. Finalmente, el grado de entrecruzamiento se asoció de forma directa con la constante de rigidez ventricular diastólica. Sin embargo, no hubo asociación entre el grado de entrecruzamiento y la cuantía de colágeno en el miocardio. Estos datos demuestran por primera vez la implicación directa de la LOX en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno en el miocardio humano enfermo sometido a una sobrecarga de presión pura y su implicación en las alteraciones de las propiedades elásticas del ventrículo izquierdo. Se ha de destacar que las alteraciones cualitativas del colágeno (grado de entrecruzamiento) no se asociaron de forma directa con las alteraciones cuantitativas (FVC).

1.3.3. Degradación del colágeno tipo I

Existe evidencia, en modelos animales y en patología humana, que sustenta el concepto de que una reducción en la actividad de las metaloproteinasas en el miocardio podría favorecer el depósito de colágeno y por tanto la fibrosis miocárdica (*Spinale, 2002; López y cols., 2004*). En nuestro estudio el contenido de MMP-1 libre disminuyó de forma lineal con mayores grados de fibrosis, sin apreciarse esta tendencia en el TIMP-1. *Heymans y cols.* (2005) han comunicado una asociación directa entre el contenido miocárdico de TIMP-1 y la severidad de la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo severa. La actividad de éste sistema de proteasas y sus inhibidores es el resultado del equilibrio entre ambos, produciéndose ésta relación de forma estequiométrica (1:1). En el miocardio de pacientes con EAo la actividad gelatinolítica de distintos componentes de la familia de las MMPs está disminuida. Así los datos disponibles que valoran cuantitativa o

cualitativamente (actividad gelatinolítica) este sistema demuestran una tendencia a la inhibición del mismo como responsable de la fibrosis miocárdica en pacientes con EAo.

1.4. Consecuencias

1.4.1 Relevancia clínica

Desde el punto de vista clínico la fibrosis miocárdica se asoció con una mayor prevalencia de IC clínica y con una mayor prevalencia de fibrilación auricular permanente.

La aparición de síntomas es un hecho clave en la historia natural de la EAo (*Chizner y cols.*, 1980; *Horstkotte y Loogen*, 1988; *Turina y cols.*, 1987). Estando además el pronóstico relacionado con el tipo de síntoma en la presentación (*Ross y Braunwald*, 1968). En nuestro estudio, mayores grados de fibrosis miocárdica se asociaron con una mayor prevalencia de IC. Estos hallazgos sugieren la existencia de una asociación entre la fibrosis miocárdica, la presencia y tipo de síntomas así como con el pronóstico del paciente con EAo severa. *Oldershaw y cols.* (1980) comunicaron resultados similares en 55 pacientes con EAo, en los que el grado de fibrosis miocárdica histológicamente determinado se asoció con la presencia de síntomas clínicos de IC y con la mortalidad. Sin embargo, a pesar de la abundancia de datos mostrando la relevancia del remodelado de la MEC en la progresión a disfunción ventricular diastólica y sistólica en la EAo, sólo los estudios de *Oldershaw y cols.*(1980), *Lund y cols* (1998), *Hein y cols* (2003) y nuestros datos asocian la fibrosis miocárdica con la presencia de síntomas clínicos de IC.

Por otra parte, en nuestros pacientes la presencia de mayores grados de fibrosis miocárdica se asociaron con una mayor prevalencia de fibrilación auricular. Ésta constituye un fenómeno tardío en la historia natural de la enfermedad (*Douglas y cols.*, 1993), implica un compromiso del llenado diastólico y por tanto del volumen sistólico del ventrículo izquierdo (hasta un 25% del mismo), así como un peor pronóstico perioperatorio y a largo plazo

en pacientes con EAo grave con disfunción ventricular sistólica avanzada (Levy y cols., 2008).

1.4.2. Relevancia fisiopatológica

a. Función ventricular diastólica

Las alteraciones de la función ventricular diastólica generalmente preceden a las alteraciones de la función sistólica en la historia natural de la EAo (Douglas y cols., 1993). Aparecen en relación con un aumento cuantitativo en el contenido de colágeno en el miocardio y de alteraciones avanzadas en la distribución espacial del mismo en la MEC (Villari y cols., 1993). Estas alteraciones de la función diastólica se asocian además con la expresión en el miocardio de TIMP-1 y 2, y éstas a su vez con el grado de fibrosis (Heymans y cols., 2005).

En el presente estudio la FVC se asoció de forma directa con el tiempo de relajación isovolumétrica del ventrículo izquierdo y el grado de entrecruzamiento del colágeno lo hizo con un patrón de llenado ventricular de carácter restrictivo y con una mayor constante de rigidez diastólica. Por tanto nuestros datos demuestran que la severidad cuantitativa de la fibrosis miocárdica se asocia principalmente con índices de la fase activa del periodo diastólico mientras que las alteraciones cualitativas del colágeno en el miocardio son responsables de alteraciones de las propiedades diastólicas pasivas del ventrículo izquierdo.

b. Función ventricular sistólica

Nuestros datos no mostraron una asociación consistente entre la FVC o el grado de entrecruzamiento del mismo en el miocardio de pacientes con EAo y los diferentes índices de función ventricular sistólica estudiados. Sólo se observó una relación inversa entre el índice de volumen sistólico y la FVC y el grado de entrecruzamiento.

El papel de la fibrosis miocárdica en las alteraciones de la función ventricular sistólica en pacientes con EAo es controvertido. Mientras algunos estudios han mostrado una relación inversa entre el depósito cuantitativo de

colágeno en el miocardio y los índices de función ventricular sistólica (*Polyakova y cols.*, 2004; *Hein y cols.*, 2005; *Oldershaw y cols.*, 1980; *Schaper y cols.*, 1981; *Di Bello y cols.*, 2004), otros no han encontrado ésta relación. *Lund y cols.* (1998) no encontraron asociación significativa entre el contenido relativo de fibrosis y la fracción de acortamiento en pacientes con EAo, aunque sí con el contenido de colágeno en términos absolutos. Sin embargo, en éste estudio los cambios degenerativos miocitarios pero no el remodelado de la MEC –en términos relativos o absolutos- fueron el principal determinante de la función ventricular sistólica. *Krayenbuehl y cols.* (1983) han mostrado que la rigidez sistólica ventricular izquierda y otros índices de la fase eyectiva están determinados por el diámetro de las fibrillas musculares pero no tanto por el grado de fibrosis intersticial. De hecho, éste grupo no encontró diferencias significativas en el depósito cuantitativo de colágeno en el miocardio de pacientes con EAo con función ventricular conservada y deprimida (*Krayenbuehl y cols.*, 1988). En éste sentido, *López y cols.* (2006) han demostrado que la progresión a insuficiencia cardíaca por disfunción ventricular sistólica en pacientes con cardiopatía hipertensiva está determinada por alteraciones cualitativas y del patrón de depósito de colágeno en el miocardio y no por su cuantía histológicamente determinada como FVC. Igualmente *Villari y cols.* (1993) han sugerido en pacientes con EAo que son las alteraciones en la distribución espacial del colágeno y no su depósito cuantitativo el principal determinante de la función ventricular sistólica.

2. Evaluación no invasiva de la fibrosis miocárdica en la estenosis aórtica.

2.1. PICP: marcador de síntesis y depósito de colágeno tipo I

Nuestro estudio demuestra que las concentraciones de PICP en sangre circulante de pacientes con EAo constituye un índice fiable de de síntesis extracelular y grado de depósito de colágeno tipo I en el miocardio. Además confirman el origen cardiaco del mismo.

En nuestro trabajo se observó un incremento lineal en las concentraciones de PICP circulante entre los pacientes agrupados en función de la cuantía de colágeno en el miocardio. Es más, ambos (FVC y PICP circulante) se asociaron de forma directa, estrecha y significativa. Igualmente, las concentraciones de PICP circulantes se asociaron de forma directa con el grado de activación de la PCP en el miocardio.

No existen datos previos establezcan el significado biológico de éste péptido circulante en pacientes con EAo severa ni tampoco su relación con la actividad de la PCP en el miocardio, ni en pacientes con EAo ni en otras cardiopatías. Nuestros datos asocian por primera vez la actividad del sistema enzimático de la PCP en el miocárdico con la extensión del depósito de colágeno en el miocardio y con las concentraciones circulantes de PICP.

Sin embargo, el colágeno tipo I no es órgano-específico (*Lopez y cols., 2001a*). A pesar de la extensa aplicación del mismo en estudios clínicos pocos han establecido el origen de éste en sangre periférica (*Lopez y cols., 2001b; Querejeta y cols., 2000; Diez y cols., 1996*). Distintas observaciones sugieren en nuestro trabajo que las concentraciones de PICP circulantes son de origen cardiaco. En primer lugar se encontró un gradiente de concentración entre sangre venosa de seno coronario y sangre venosa periférica. En segundo lugar ambas concentraciones mostraron una correlación directa y muy estrecha. Finalmente, la función hepatobiliar en nuestra población de estudio (por diseño) era normal, descartando alteraciones en la degradación-excreción del mismo como responsables del incremento de los niveles del PICP entre los distintos grupos.

2.2. Cociente MMP-1/TIMP-1: marcador de degradación del colágeno tipo I

La relación MMP/TIMP en sangre periférica disminuyó de forma lineal entre los pacientes con EAo clasificados en función de la severidad de la fibrosis miocárdica histológicamente determinada, al igual que lo hizo el contenido miocárdico de MMP-1 libre, responsable de la actividad gelatinolítica del sistema de degradación del colágeno en el miocardio (*Spinale, 2002*). Las

mayores concentraciones de MMP-1 y TIMP-1 en sangre de seno coronario que en sangre periférica y la estrecha correlación entre ambas concentraciones sugieren que la MMP-1 y TIMP-1 circulantes detectadas en pacientes con EAo son de origen cardiaco. La relación entre ambas puede ser un índice útil en la evaluación no invasiva del estado del sistema de degradación del colágeno tipo I en el miocardio (*Lopez y cols., 2006; Laviades y cols., 1998*). Así dado que estas determinaciones en suero son relativamente sencillas, reproducibles y de bajo coste, podrían constituir una herramienta clínica útil en pacientes con EAo seleccionados.

Nuestros datos demuestran por tanto que las concentraciones PICP y el cociente MMP/TIMP circulantes son buenos marcadores bioquímicos del remodelado de la MEC en pacientes con EAo severa al cumplir la mayoría de los criterios recientemente propuestos *González A y cols. (2008)*: 1) la existencia de una relación entre su expresión en el miocárdico y sus concentraciones en sangre periférica; 2) la presencia de un gradiente de concentración positivo entre sus concentraciones entre sangre de seno coronario y sus concentraciones en sangre periférica que sugieran su origen cardiaco; 3) la demostración de que las concentraciones en sangre del marcador se asocian con los parámetros estructurales o funcionales que definen las alteraciones de interés en el miocardio.

3. Limitaciones

El tamaño muestral fue relativamente pequeño, pero debido a la naturaleza de los objetivos del análisis y las intervenciones realizadas, el diseño del estudio es apropiado. La prevalencia de factores de riesgo cardiovascular entre los pacientes incluidos fue alta, estando alguno de estos factores asociados con fibrosis cardiaca. Sin embargo la distribución de los mismos entre los pacientes agrupados en función de la FVC fue homogénea y el análisis de correlaciones parciales descartó cualquier modificación significativa potencial de los resultados observados. En este sentido, el infarto de miocardio (un potencial factor de confusión relevante) constituyó un criterio de exclusión del estudio. La prevalencia de factores de riesgo

cardiovascular en la población estudiada requiere especial mención debido a que: 1) la EAo degenerativa calcificada y la enfermedad aterosclerótica comparten factores de riesgo y mecanismos fisiopatológicos (*Freeman y Otto, 2005*), 2) la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular es alta en la población general de pacientes con EAo severa, como muestran los resultados del *Euro Heart Survey on Valvular Heart Diseases (Jung y cols., 2003)*, al igual que en nuestro estudio. Estas consideraciones resaltan la validez externa de nuestra población y por tanto de nuestros resultados.

La medicación intercurrente en la que se encontraban los pacientes en el momento de la cirugía podría haber interferido con los resultados. El empleo de inhibidores del eje renina-angiotensina-aldosterona (IECAs, ARAlI o espironolactona) han demostrado interferir como el metabolismo del colágeno, al igual que los diuréticos de asa en pacientes con IC. Aunque en nuestro estudio éstos fármacos se distribuyeron de forma homogénea entre los grupos estudiados reduciendo la probabilidad de que hayan interferido de forma significativa en los resultados.

El estudio se llevó a cabo a partir de muestras obtenidas de septo interventricular. Cabe valorar si las alteraciones histológicas halladas a éste nivel son representativas a las del resto del miocardio ventricular. *Pearlman y cols. (1982)* han demostrado que las lesiones histológicas en el septo interventricular en corazones sometidos a sobrecarga de presión son representativas de las lesiones halladas en la pared libre del ventrículo izquierdo. Además, los resultados de estudios basados en biopsia de septo interventricular o pared libre de ventrículo izquierdo en pacientes con EAo severa han mostrado lesiones histológicas y resultados equivalentes.

En el presente estudio se analizó en papel de la MMP-1 y el TIMP-1, aunque en el miocardio de pacientes con EAo se expresan otros componentes de ésta familia. Además, no se llevó a cabo una evaluación directa de su actividad (actividad zimográfica) sino sólo de su expresión cuantitativa. Por tanto, otros estudios deberán establecer el papel de otros componentes del sistema de degradación del colágeno en el miocardio de

pacientes con EAo así como el significado biológico y origen de éstas proteínas en sangre circulante.

REFERENCIAS

Adar R, Kessler E, Godlberg B. Evidence for a protein that enhances the activity of type I procollagen C-proteinase. *Coll Relat Res*. 1986; 6: 267-277.

Alexander CM, Werb Z. Extracellular matrix degradation. In: Hay ED, ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York, NY: Plenum Press; 1991: 235-275.

Antos CL, McKinsey TA, Frey N, y cols. Activated glycogen synthase-3 suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 907-909.

Arani DT, Carleton RA. Assessment of aortic valvular stenosis from the aortic pressure pulse. *Circulation*. 1967; 36: 30-35.

Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, y cols. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:1977-1985.

Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, y cols. Chronic N-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation*. 2000; 101: 423-429.

Bermejo J, Yotti R. Low-gradient aortic valve stenosis: value and limitations of dobutamine stress testing. *Heart*. 2007;93:298-302.

Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res*. 1999; 42: 27-44.

Bode W, Gomis-Rüth FX, Huber R, Zwilling R, Stöcker W. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*. 1992; 358: 164-167.

Boluyt MO, Oneill L, Meredith AL, y cols. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure: marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res*. 1994;75:23-32.

Bonow RO, Carabello BA, Kanu C, y cols. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice

Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease). *American College of Cardiology Web Site*. Available at: <http://www.acc.org/clinical/guidelines/valvular/index.pdf>.

Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1995; 30: 537-543.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Briand M, Dumesnil JG, Kadem L, y cols. Reduced systemic arterial compliance impacts significantly on left ventricular afterload and function in aortic stenosis: implications for diagnosis and treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:291-298.

Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Lab Invest*. 1979; 40: 364-372.

Chambers J, Takeda S, Rimington H, Lambert-Hammill M, Shetty C, Wierzbicki A. Determinants of left ventricular mass in aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2004; 13: 873-880.

Chizner MA, Pearle DL, de Leon JAC. The natural history of valvular aortic stenosis in adults. *Am Heart J*. 1980; 99: 419-424.

Cronshaw AD, Fothergill-Gilmore LA, Hulmes DJS. The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem J*. 1995; 308: 279–284.

Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther*. 1993; 59: 329 -341.

Debl K, Djavidani B, Buchner S, y cols. Delayed hyperenhancement in magnetic resonance imaging of left ventricular hypertrophy caused by aortic stenosis and hypertrophic cardiomyopathy: visualisation of focal fibrosis. *Heart*. 2006; 92: 1447-1451.

de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, y cols. Assessment of left ventricular function by the midwall fractional shortening/end-systolic relation in human hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 23: 1444-1451.

de Simone G, Di Lorenzo L, Costantino G, Moccia D, Buonissimo S, de Divitiis O. Supernormal contractility in primary hypertension without left ventricular hypertrophy. *Hypertension.* 1988; 11: 457-463.

Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation.* 1977; 55: 613-618.

Di Bello V, Giorgi D, Talini E, y cols. Incremental value of ultrasonic tissue characterization (backscatter) in the evaluation of left ventricular myocardial structure and mechanics in essential arterial hypertension. *Circulation.* 2003; 107: 74-80.

Di Bello V, Giorgi D, Viacava P, y cols. Severe aortic stenosis and myocardial function: diagnostic and prognostic usefulness of ultrasonic integrated backscatter analysis. *Circulation.* 2004; 110: 849-855.

Di Bello V, Pedrinelli R, Bertini A, y cols. Cyclic variation of the myocardial Integrated backscatter signal in hypertensive cardiopathy: a preliminary study. *Coron Artery Dis.* 2001; 12: 267-275.

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: 209-216.

Díez J, Laviades C. Monitoring fibrillar collagen turnover in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res.* 1997; 35: 202-205.

Díez J, Panizo A, Gil MJ, Monreal I, Hernández M, Pardo Mindán J. Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation.* 1996; 93: 1026-1032.

Dolber PC, Spach MS. Picrosirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybdic acid treatment. *Stain Technol.* 1987; 62: 23-26.

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995; 77: 863-868.

Douglas PS, Berko B, Lesh M, Reichek N. Alterations in diastolic function in response to progressive left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 29: 181-186.

Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32: 1118-1125.

Esposito G, Rapacciuolo A, Prasad SVN, y cols. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation.* 2002; 105: 85-92.

Factor SM, Robinson TF. Comparative connective tissue structure-function relationships in biologic pumps. *Lab Invest.* 1988; 58: 150-156.

Factor SM, Zhao MJ, Eng C, Robinson TF. The effect of acutely increased ventricular cavity pressure on intrinsic myocardial connective tissue. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 12: 1582-1589.

Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, y cols. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37: 1443-1449.

Fleischmajer R, Perlish JS, Timpl R. Collagen fibrillogenesis in human skin. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 460: 246-57.

Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation.* 2005;111:3316-3326.

Gaasch WS, Zile MR, Hocino PK, Apstein CS, Blaustein AS. Stress-shortening relations and myocardial blood flow in compensated and failing canine hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 1989; 79: 872-873.

García MJ, Firstenberg MS, Greenberg NL, y cols. Estimation of left ventricular operating stiffness from Doppler early filling deceleration time in humans. *Am J Physiol.* 2001; 280: H554-561.

García-Bolao I, Macías A, López B, y cols. A biomarker of myocardial fibrosis predicts long-term response to cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 2335-2337.

Gould KL. Why angina pectoris in aortic stenosis. *Circulation.* 1997; 95: 892-898.

González A, López B, Ravassa S, y cols. Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res.* 2009; 81: 601-609.

Griffith MJ, Carey CM, Byrne JC, y cols. Echocardiographic left ventricular wall thickness: a poor predictor of the severity of aortic valve stenosis. *Clin Cardiol.* 1991;14:227–331.

Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975;56:56-64.

Hachicha Z, Dumesnil JG, Bogaty P, Pibarot P. Paradoxical low-flow, low-gradient severe aortic stenosis despite preserved ejection fraction is associated with higher afterload and reduced survival. *Circulation.* 2007; 115: 2856-2864.

Hein S, Arnon E, Kostin S, y cols. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation.* 2003; 107: 984-991.

Hein S, Schaper J. The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *J Nucl Cardiol.* 2001; 8: 188-196.

Hess OM, Ritter M, Schneider J, Grimm J, Turina M, Krayenbuehl HP. Diastolic stiffness and myocardial structure in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circulation.* 1984; 69: 855-865.

Hess OM, Schneider J, Kock R, Bamer C, Grimm J, Krayenbuehl HP. Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. *Circulation* 1981; 63: 360-371.

Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, y cols. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation*. 2005; 112: 1136-1144.

Hill JA, Karimi M, Kutsche W, y cols. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation*. 2000; 101: 2863-2869.

Hill JA, Rothermel BA, Yoo K-D, y cols. Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload hypertrophy: preservation of systolic function. *J Biol Chem*. 2002; 277: 10251-10255.

Horstkotte D, Loogen F. The natural history of aortic valve stenosis. *Eur Heart J*. 1988; 9: 57-64.

Hutchins GM, Kuhajda FP, Moore GW. Myocardial injury in patients with aortic stenosis. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1987; 1: 31-37.

Iles L, Pfluger H, Phrommintikul A, y cols. Evaluation of diffuse myocardial fibrosis in heart failure with cardiac magnetic resonance contrast-enhanced T1 mapping. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52: 1574-1580.

Iung B, Baron G, Butchart EG, y cols. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003; 24: 1231-1243.

Jensen LT, Risteli J, Nielsen MD, y cols. Purification of porcine aminoterminal propeptide of type III procollagen from lymph and use for lymphatic clearance studies in pigs. *Matrix*. 1992;12:73-79.

Julius BK, Spillmann M, Vasalli G, Villari B, Eberli FR, Hess OM. Angina pectoris in patients with aortic and normal coronary arteries. *Circulation*. 1997; 95: 892-898.

Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. Am J Resp Cell Mol Biol. 1991; 5: 206-210.

Karl J, Borgya A, Gallusser A, y cols. Development of a novel, N-terminal-pro-BNP (NT-pro-BNP) assay with a low detection limit. Scand J Clin Lab Invest. 1995; 59 230: 177-181.

Kaufmann P, Vassalli G, Lupi-Wagner S, Jenni R, Hess OM. Coronary artery dimensions in primary and secondary left ventricular hypertrophy. J Am Coll Cardiol. 1996; 28: 745-750.

Kessler E, Adar R. Type I procollagen C-proteinase from mouse fibroblasts: purification and demonstration of a 55 KDa enhancer glycoprotein. Eur J Biochem. 1989; 186: 115-121.

Kodama S, Iwata K, Iwata H, Yamashita K, Hayakawa T. Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases: an application for rheumatoid arthritis serum and plasma. J Immunol Methods. 1990; 127: 103-108.

Krayenbuehl HP, Hess OM, Monrad ES, Schneider J, Mall G, Turina M. Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement. Circulation. 1989; 79: 744-755.

Krayenbuehl HP, Hess OM, Ritter M, Monrad ES, Hoppeler H. Left ventricular systolic function in aortic stenosis. Eur Heart J. 1988; 9: E19-23.

Krayenbuehl HP, Hess OM, Schneider J, Turina M. Physiologic or pathologic hypertrophy. Eur Heart J. 1983; 4: A 29-34.

Kupari M, Turto H, Lommi J. Left ventricular hypertrophy in aortic valve stenosis: preventive or promotive of systolic dysfunction and heart failure?. Eur Heart J. 2005; 26: 1790-1796.

Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. Am J Physiol. 1987; 252: C1-9.

Laviades C, Varo N, Fernández J, y cols. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*. 1998; 98: 535-540.

Levy F, Laurent M, Monin JL, y cols. Aortic valve replacement for low-flow/low-gradient aortic stenosis operative risk stratification and long-term outcome: a European multicenter study. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 1466-1472.

Li YY, Feng Y, McTiernan CF, y cols. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation*. 2001; 104: 1147-1152.

Lindroos M, Kupari M, Heikkilä J, Tilvis R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:1220-1225.

Lopez-De Leon A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem*. 1985; 33: 737-743.

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.

López B, González A, Díez J. Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13: 197-204.

López B, González A, Querejeta R, Díez J. The use of collagen-derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heart disease. *J Hypertens*. 2005; 23: 1445-1451.

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.

López B, González A, Varo N, Laviades C, Querejeta R, Díez J. Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2001; 38: 1222-1226.

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.

López B, Querejeta R, Varo N, y cols. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation*. 2001; 104: 286-291.

Lund O, Kristensen LH, Baandrup U, y cols. Myocardial structure as a determinant of pre- and postoperative ventricular function and long-term prognosis after valve replacement for aortic stenosis. *Eur Heart J*. 1998; 19: 1099-1108.

Maceira AM, Barba J, Varo N, Beloqui O, Díez J. Ultrasonic backscatter and serum marker of cardiac fibrosis in hypertensives. *Hypertension*. 2002; 39: 923-928.

Marcus ML, Doty DB, Hiratza LF, Wright CB, Eastham CL. Decreased coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries. *N Eng J Med*. 1982; 2: 258-262.

Maron BJ, Ferrans VJ, Jones M. The spectrum of degenerative changes in hypertrophied human cardiac muscle cells: an ultrastructural study. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1975; 8: 447-666.

Maron BJ, Ferrans VJ, Roberts WC. Myocardial ultrastructure in patients with chronic aortic valve disease. *Am J Cardiol*. 1975; 35: 725-739.

Miyahara M, Hayashi K, Berger J, y cols. Formation of collagen fibrils by enzymic cleavage of precursors of type I collagen in vitro. *J Biol Chem*. 1984; 259: 9891-9898.

Moon JC. What is late gadolinium enhancement in hypertrophic cardiomyopathy? *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:1-4.

Moon JC, Reed E, Sheppard MN, y cols. The histologic basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 2260-2264.

Kivirikko KI, Myllylä R. Recent developments in posttranslational modification: intracellular processing. *Methods Enzymol.* 1987;144:96-114.

Nadell R, DePace NL, Ren JF, Hakki AH, Iskandrian Morganroth J. Myocardial oxygen supply/demand ratio in aortic stenosis: hemodynamic and echocardiographic evaluation of patients with and without angina pectoris. *Circulation.* 2002; 105: 470-476.

Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. A demonstration using the cell-maceration/scanning electron microscope method. *Acta Anat (Basel).* 1994; 151: 250-257.

Oldershaw PJ, Brooksby IA, Davies MJ, Coltart DJ, Jenkins BS, Webb-Peploe MM. Correlations of fibrosis in endomyocardial biopsies from patients with aortic valve disease. *Br Heart J.* 1980; 44: 609-611.

Olivetti G, Melissari M, Balbi T, y cols. Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovasc Res.* 1994; 28:1199-1208.

Opie LH. Overload hypertrophy and its molecular biology. In: Opie LH. Heart physiology: from cell to circulation. 4th edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 402-427.

Otto CM. Valvular aortic stenosis: disease severity and timing of intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 2141-2151.

Panizo A, Pardo J, Hernández M, Galindo MF, Cenarruzabeitia E, Díez J. Quinapril decreases myocardial accumulation of extracellular matrix

components in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1995; 8: 815-822.

Panchenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN, Kagan HM. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prollysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem.* 1996; 271: 7113-7119.

Pardo Mindán FJ, Panizo A. Alterations in the extracellular matrix of the myocardium in essential hypertension. *Eur Heart J.* 1993; 14: J12-14.

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: 158-164.

Pellikka PA, Sarano ME, Nishimura RA, y cols. Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up. *Circulation.* 2005; 111: 3290-3295.

Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44: 1609-1618.

Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, y cols. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med.* 2006; 10: 429-458.

Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med.* 1979; 301:13-23.

Querejeta R, López B, González A, y cols. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation.* 2004; 110: 1263-1268.

Querejeta R, Varo N, López B, y cols. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation.* 2000; 101: 1729-1735.

Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler Echocardiography: a report from the Doppler quantification task force of the nomenclature and standards committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002; 15: 167-184.

Rajamannan NM, Gersh B, Bonow RO. Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside--emerging clinical and cellular concepts. *Heart.* 2003;89:801-805.

Reichek N, Wilson J, St John Sutton M, Plappert TA, Goldberg S, Hirshfeld JW. Noninvasive determination of left ventricular end-systolic stress: validation of the method and initial application. *Circulation.* 1982; 65: 99-108.

Risteli L, Risteli J. Noninvasive methods for detection of organ fibrosis. In: Rojkind M, ed. *Connective Tissue in Health and Disease*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1990:61–98.

Ritter M, Hess OM, Murakami T, y cols. Left ventricular systolic series elastic properties in aortic stenosis before and after valve replacement. *Cardiovasc Res.* 1988; 22: 759-767.

Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation.* 2005;111:920-925.

Robins SP. Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35: 849-852.

Robinson TF, Cohen-Gould L, Factor SM. The skeletal framework of mammalian heart muscle: arrangement of inter- and pericellular connective tissue structures. *Lab Invest.* 1983; 9: 482-498.

Ross J Jr, Braunwald E. Aortic stenosis. *Circulation.* 1968; 38: 61-67.

Rudolph A, Abdel-Aty H, Bohl S, y cols. Noninvasive detection of fibrosis applying contrast-enhanced cardiac magnetic resonance in different forms of

left ventricular hypertrophy relation to remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53: 284-291.

Schaper J, Schwarz F, Hehrlein F. Ultrastructural changes in human myocardium with hypertrophy due to aortic valve disease and their relationship to left ventricular mass and ejection fraction. *Herz.* 1981; 6: 217-225.

Seiler C, Jenni R. Severe aortic stenosis without left ventricular hypertrophy: prevalence, predictors, and short-term follow-up after aortic valve replacement. *Heart.* 1996;76:250–255.

Shalitin N, Schlesinger H, Levy MJ, Kessler E, Kessler-Icekson G. Expression of procollagen C-proteinase enhancer in cultured rat heart fibroblasts: evidence for co-regulation with type I collagen. *J Cell Biochem.* 2003; 90: 397-407.

Schwartzkopff B, Frenzel H, Dieckerhoff J, y cols. Morphometric investigation of human myocardium in arterial hypertension and valvular aortic stenosis. *Eur Heart J.* 1992; 13:D 17-23.

Sivakumar P, Gupta S, Sarkar S, Sen S. Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2008; 307: 159-167.

Skjaerpe T, Hegrenaes L, Hatle L. Noninvasive estimation of valve area in patients with aortic stenosis by Doppler ultrasound and two-dimensional echocardiography. *Circulation.* 1985; 72: 810-818.

Shimuzu G, Zile MR, Blaustein AS, Gaasch WH. Left ventricular chamber filling and midwall fiber lengthening in patients with left ventricular hypertrophy: overestimation of fiber velocities by conventional midwall measurements. *Circulation.* 1985; 71: 266-272.

Smedsrød B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J.* 1990; 271: 345-350.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002; 90: 520-530.

Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, y cols. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:630-634.

Tamura T, Said S, Gerdes AM. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension.* 1999; 33: 676-680.

Trackman PC. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem.* 2005; 96: 927-937.

Turina J, Hess O, Sepulcri F, Krayenbuehl HP. Spontaneous course of aortic valve disease. *Eur Heart J.* 1987; 8: 471-483.

Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, y cols. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process prolyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 2001; 276: 22537-22543.

Van der Rest M, Aubert-Foucher E, Dublet B, Eichenberger D, Font B, Goldschmidt D. Structure and function of the fibril-associated collagens. *Biochem Soc Trans.* 1991; 19: 820-824.

Vassalli G, Kaufmann P, Villari B, y cols. Reduced epicardial coronary vasodilator capacity in patients with left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 1995; 91: 2916-2923.

Villari B, Campbell SE, Hess OM, y cols. Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22: 1477-1484.

Villari B, Campbell SE, Schneider J, Vassalli G, Chiariello M, Hess OM. Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J.* 1995;16:1410-1419.

Villari B, Hess OM, Kaufmann P, Krogmann ON, Grimm J, Krayenbuehl HP. Effect of aortic valve stenosis (pressure overload) and regurgitation (volume overload) on left ventricular systolic and diastolic function. *Am J Cardiol.* 1992;307: 1362-1366.

Villari B, Vassalli G, Schneider J, Chiariello M, Hess OM. Age dependency of left ventricular diastolic function in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:181-186.

Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29: 609–617.

Wasywich CA, Webster MW, Richards AM, Stewart RA. Coronary sinus and ascending aortic levels of aldosterone, angiotensin II, and B-type natriuretic peptide in patients with aortic stenosis and in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 2006; 97: 1068-1072.

Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 13: 1637-1652.

Weber KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regul Pept.* 1999; 82: 1–17.

Weber KT, Eghbali M. Collagen matrix synthesis and degradation in the development and regression of left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Rev Rep.* 1991; 12: 61-69.

Weidemann F, Niemann M, Herrmann S, y cols. A new echocardiographic approach for the detection of non-ischaemic fibrosis in hypertrophic myocardium. *Eur Heart J.* 2007; 28: 3020-3026.

Wu E, Judd RM, Vargas JD, Klocke FJ, Bonow RO, Kim RJ. Visualisation of presence, location, and transmural extent of healed Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction. *Lancet.* 2003; 357: 21-28.

Wu KC, Weiss RG, Thiemann DR, y cols. Late gadolinium enhancement by cardiovascular magnetic resonance heralds an adverse prognosis in nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 2414-2421.

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.