

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA I PATOLOGIA CEL·LULAR

EL N-TERMINAL PROPÉPTIDO NATRIURÉTICO
CEREBRAL (NF_{pro}BNP) EN EL DIAGNÓSTICO Y
PRONÓSTICO DE LA INSUFICIENCIA CARDÍACA.

RAQUEL CORTÉS VERGAZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de maig de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. José Ramón González Juanatey
- Dr. Guillermo Sáez Tormo
- Dr. Vicente Bertomeu Martínez
- Dr. Lilian Grigorian Shamagian
- Dr. Francisco Javier Chorro Gascó

Va ser dirigida per:

Dr. Miguel Rivera Otero

Dr. Manuel Portolés Sanz

©Copyright: Servei de Publicacions
Raquel Cortés Vergaz

Dipòsit legal: V-2060-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7920-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Departamento Bioquímica y Biología Molecular
HOSPITAL UNIVERSITARIO “LA FE”
Centro de Investigación,
Sección de Cardiocirculación
Sección de Biología y Patología Celular

“EL N-TERMINAL PROPÉPTIDO NATRIURÉTICO
CEREBRAL (NT-proBNP) EN EL DIAGNÓSTICO Y
PRONÓSTICO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA”

Memoria presentada por
Raquel Cortés Vergaz
para aspirar al grado de Doctor
Valencia, 2009

HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE
Centro de Investigación
Valencia

D. MIGUEL RIVERA OTERO, Director del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia y Facultativo Especialista de la Unidad de Cardiocirculación del mismo Centro, y

D. MANUEL PORTOLES SANZ, Facultativo Especialista de la Unidad de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

CERTIFICAN:

Que **Dña RAQUEL CORTES VERGAZ**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección en el Hospital Universitario LA FE de Valencia, en las Unidades de Cardiocirculación y de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación de este Hospital, el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral, que se presenta bajo el título de: “EL N-TERMINAL PROPÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL (NT-proBNP) EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA”.

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 17 de Enero de dos mil diez.

Fdo. Dr. Miguel Rivera Otero

Fdo. Dr. Manuel Portolés Sanz

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- “Citoquinas y neurohormonas en la insuficiencia cardiaca: relación con el estrés oxidativo, daño miocárdico, evolución de la disfunción y grado funcional” (FIS 01/0943), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias

- “Niveles tisulares de péptidos natriuréticos en corazones con insuficiencia cardiaca. Relación con parámetros hemodinámicos, ecocardiográficos y marcadores bioquímicos de este síndrome” (AP039/2007), Escuela Valenciana de Estudios para la Salud.

- “RENDISCOR. Red de Insuficiencia Cardiaca. Proteómica miocárdica y estudios clínicos” (RD06/0003/1001)”. RED de investigación, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias.

*A mis queridísimos padres, Juanjo y Herminia, por quererme
y apoyarme, por sus sabios consejos, por los ánimos en los momentos
críticos y por sus numerosos esfuerzos por ofrecerme una gran educación.
Por ser mi ejemplo en la vida*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento al Dr. Miguel Rivera, de la Sección de Cardiocirculación del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe, que ha dirigido mi tesis y ha contribuido a mi formación científica. Por confiar en mí desde el principio y por compartir conmigo el inicio de una línea de trabajo. También, agradecer al Dr. Manuel Portolés, de la Sección de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación del Hospital La Fe, por codirigir mi tesis. Por su colaboración estrecha, por su calidad como investigador y compañero, y por su increíble sentido del humor.

Al Dr. Jaime Renau, Jefe de la Sección de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación del Hospital La Fe, por permitirme desarrollar parte de mi trabajo en su laboratorio y por su interés mostrado.

Al personal de la Unidad de Coordinación de Transplantes del Hospital Universitario La Fe, por su colaboración en la obtención de las muestras cardíacas para el desarrollo de esta tesis doctoral. Y al personal de las Unidades de Cardiología del Hospital Universitario La Fe de Valencia, del Hospital General de Valencia, Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, del Hospital Universitario General de Alicante, Hospital Universitario San Juan de Alicante, y Hospital General de Elche por su ayuda en el reclutamiento de los pacientes.

A Begoña Castelló de Roche Diagnostics, por su ayuda técnica, y a Carmen Iñiguez y Marisa Estarlich de la Escuela Valenciana de Estudios para la Salud, por su colaboración para el correcto análisis estadístico de los resultados de esta tesis doctoral.

Al Dr. Rafael Sirera del Departamento de Biotecnología, de la Universidad Politécnica, por su colaboración y ayuda técnica en los análisis de cuantificación de la expresión génica mediante PCR-cuantitativa.

A mis compañeros del Centro de Investigación, Luís Ramón Andrés, Pilar Medina, Antonio Moscardó, Cecilia Ortiz, Elena Fernández y Lorena Gómez por los consejos compartidos y su apoyo en los momentos difíciles. Y por supuesto, a Silvia Navarro, amiga y compañera, por estar siempre ahí (incluso en la distancia), por ser mi paño de lágrimas y un apoyo incondicional.

A las doctoras Inmaculada Azorín, Pilar Marín y Mónica Tomás, de las Secciones de Neurología Experimental y Biología y Patología Celular del

Centro de Investigación del Hospital La Fe, por compartir conmigo sus “secretos” de laboratorio, y mis mejores y más divertidos momentos en el trabajo. Y al resto del grupo: María José Bartual, Maite Huerta, Pepi Llorens e Inmaculada Montserrat, por la ayuda concedida y experiencia compartida.

A mi querida compañera en el campo de batalla, Esther Roselló, por ser un apoyo diario en el trabajo, por compartir los buenos y malos momentos, por las horas y anécdotas vividas en congresos y en los pasillos de quirófanos, y por sus divertidas clases de valenciano.

Al resto de personal del Centro de Investigación que contribuyeron, de alguna manera, al desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis irremplazables amigos de Jérica, por ser mi vía de escape, por escucharme y por su interés en intentar comprender el mundo de la investigación.

A mis queridísimos hermanos, Sonia y Juanjo, por su “ayuda” incondicional, ánimo constante e interés continuo por mi trabajo.

Por último, y en primerísimo lugar, a Jose, por las horas robadas, por su esfuerzo constante por equilibrar mis excesos científicos, por su paciencia, por su apoyo y su gran amor.

Gracias a todos, por ser los responsables de mi formación como investigadora y como persona.

*“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia
la verdad”
Sócrates (470 aC – 399 aC)*

*“La ciencia es un cetro en ciertas manos, al paso que en otras tan
solo es un palitroque”
Michel Eyquem de Montaigne (1533-1592)*

*“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda”.
Voltaire (1694-1778)*

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino
como una oportunidad para penetrar en el bello y
maravilloso mundo del saber”
Albert Einstein (1879-1955)*

*“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni
podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo
que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber,
por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un
infinito mundo de misterio”
Gregorio Marañón (1887-1960)*

ABREVIATURAS

ABC = área bajo la curva
ANP = péptido natriurético auricular
ARA II = antagonistas de los receptores de angiotensina tipo II
ATD = área en telediástole del ventrículo izquierdo
ATS = área en telesístole del ventrículo izquierdo
BIG ET-1 = big endotelina-1
BNP = péptido natriurético tipo B
CNP = péptido natriurético tipo C
CNT = control
DNP = péptido natriurético tipo D
DPAV = desplazamiento del plano aurículoventricular
DDVI = disfunción diastólica del ventrículo izquierdo
DSVI = disfunción sistólica del ventrículo izquierdo
DTD = diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo
DTS = diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo
eFGR = estimación del filtrado glomerular renal
E/A = cociente de la velocidad de llenado temprano y tardío en diástole de VI
FCA = fracción de cambio del área del ventrículo izquierdo
FE = fracción de eyección
HT = hipertensión
HVI = hipertrofia ventricular izquierda
IATD = índice del área en telediastólico del ventrículo izquierdo
IATS = índice del área telesistólico del ventrículo izquierdo
IC = insuficiencia cardíaca
IECA = inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IMC = índice de masa corporal
IMVI = índice de masa del ventrículo izquierdo
IVTD = índice del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo
IVTS = índice del volumen telesistólico del ventrículo izquierdo
MCD = miocardiopatía dilatada
MCI = miocardiopatía isquémica
NT-proANP = fragmento amino terminal de ANP
NT-proBNP = fragmento amino terminal de BNP
NYHA = New York Heart Association
PN = péptidos natriuréticos
ProBNP = molécula precursora de BNP

ROC = receiver operating characteristic curve
RPN = receptor péptido natriurético
RVm = velocidad máxima de relajación
TD = tiempo de deceleración
VI = ventrículo izquierdo
Vp = velocidad de propagación del flujo mitral
VPN = valor predictivo negativo
VPP = valor predictivo positivo
VTD = volumen telediastólico del ventrículo izquierdo
VTS = volumen telesistólico del ventrículo izquierdo

PREÁMBULO

La insuficiencia cardíaca (IC) es una de las patologías cardíacas cuya incidencia y prevalencia han aumentado más en los últimos años, convirtiéndose en una auténtica “epidemia cardiovascular”. Es previsible que este incremento se mantenga debido al progresivo envejecimiento de la población y a los avances en el tratamiento de las patologías cardiovasculares que conducen a la IC como estadio final de su evolución, y que llevan a una mayor supervivencia de estos pacientes. Además, aunque se han producido importantes progresos en el diagnóstico y tratamiento farmacológico de este problema sanitario en los últimos años, la mortalidad y morbilidad de este síndrome siguen siendo muy elevadas, con altas tasas de ingresos hospitalarios y un elevado coste económico para los sistemas de salud. La precisión diagnóstica en la IC, utilizando sólo medios clínicos, es inadecuada, especialmente en mujeres, individuos ancianos y obesos. Para estudiar apropiadamente la epidemiología y el tratamiento de la IC, es preciso minimizar o evitar por completo los errores en el diagnóstico. Por todo ello, la investigación básica y clínica de la IC es muy importante para mejorar el pronóstico de estos pacientes.

ÍNDICE

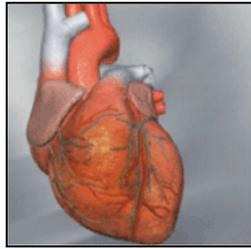
I. INTRODUCCIÓN	3
1. INSUFICIENCIA CARDIACA	3
1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	3
1.1.1.Prevalencia e incidencia	3
1.1.2.Pronóstico	3
1.1.3.Etiología	4
1.2. DEFINICIÓN	6
1.3. DIAGNÓSTICO	7
1.4. FISIOPATOLOGÍA	10
2. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	14
2.1. TIPOS	14
2.2. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	15
2.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS, ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN	19
2.3.1. Síntesis	19
2.3.2. Almacenamiento y secreción	23
2.4. RECEPTORES DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	25
2.4.1.Receptores guanilato ciclasa	25
2.4.2.Receptor de aclaramiento	27
2.5. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	29
2.5.1.Cardiovasculares	29
2.5.2. Renales	30
2.5.3. Sobre el sistema nervioso central	31
2.5.4. Sobre la proliferación celular	32
2.6. DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS ...	33
2.6.1.Variabilidad analítica	33
2.6.2.Variabilidad fisiológica	34
3. PAPEL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	37
3.1. DIAGNÓSTICO	37
3.1.1.Insuficiencia cardiaca crónica	37
3.1.2.Insuficiencia cardiaca aguda	38

3.1.3. Disfunción ventricular	39
3.2. PRONÓSTICO	41
3.3. MONITORIZACIÓN DEL TRATAMIENTO	43
3.4. BENEFICIO EN EL COSTE SANITARIO	46
3.5. SÍNDROME CARDIORRENAL	47
3.6. TRANSPLANTE CARDIACO	49
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. ESTUDIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA	59
1.1. GRUPOS CLÍNICOS	59
1.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	59
1.2.1. Sanguíneas	62
1.2.2. Urinarias	62
1.3. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO B (BNP)	63
1.4. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL FRAGMENTO N-TERMINAL DE BNP (NT-proBNP)	65
1.5. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>BIG</i> ENDOTELINA-1 (BIG ET-1)	66
1.6. MÉTODO DETERMINACIÓN DE ALDOSTERONA	68
2. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO	70
2.2. GRUPO CLÍNICO	73
2.3. OBTENCIÓN IMÁGENES ECO-DOPPLER	73
2.4. PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR	74
2.4.1. Función sistólica del ventrículo izquierdo	76
2.4.2. Función diastólica del ventrículo izquierdo	76
2.3.3. Masa del ventrículo izquierdo	77
3.3. VALORES DE REFERENCIA	82
3. ESTUDIO BIOLOGÍA MOLECULAR	83
3.1. GRUPOS CLÍNICOS	86
3.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS	86
3.2.1. Obtención	87
3.2.2. Almacenaje	87
3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MUESTRAS	87

CARDIACAS	87
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS	88
3.5. ELECTROFORESIS EN GELES BIS-TRIS 4-12% E INMUNOTRANSFERENCIA	89
3.5.1. Electroforesis	89
3.5.2. Tinción de geles Bis-Tris 4-12%	89
3.5.3. Secado de geles Bis-Tris 4-12%	90
3.5.4. Transferencia a membrana o <i>WESTERN BLOT</i>	90
3.5.5. Inmunodetección de proteínas (proBNP, BNP y NT-proBNP)	91
3.6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR-CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	93
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
IV. RESULTADOS	100
1. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE NT-proBNP CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA	105
1.1. FUNCIÓN DIASTÓLICA VENTRICULAR. VELOCIDAD MÁXIMA DE RELAJACIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-proBNP EN SUERO	105
1.2. FUNCIÓN VENTRICULAR. VALORES DE LAS ÁREAS TELEDIASTÓLICA Y TELESISTÓLICA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-PROBNP EN SUERO	105
2. RELACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT- proBNP CON <i>BIG</i> ENDOTELINA-1 Y ALDOSTERONA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	107
3. INFLUENCIA DE LA OBESIDAD SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA	110
4. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES	

URINARIOS DE NT-proBNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	112
5. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE BNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	116
6. DIAGNÓSTICO DE LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR MEDIANTE LOS NIVELES DE BNP EN ORINA Y SU RELACIÓN CON LA FUNCIÓN VENTRICULAR	123
7. IMPACTO DE LA FUNCIÓN RENAL SOBRE EL VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE INSUFICIENCIA CARDIACA DE BNP Y NT-proBNP EN ORINA	127
8. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE NT-proBNP EN SUERO Y ORINA EN PACIENTES ESTABLES CON INSUFICIENCIA CARDIACA, EN UN SEGUIMIENTO A DOS AÑOS	132
9. NIVELES TISULARES DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN CORAZONES HUMANOS CON INSUFICIENCIA CARDIACA	139
V. DISCUSIÓN	146
1. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE NT-proBNP CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA	155
1.1. FUNCIÓN DIASTÓLICA VENTRICULAR. VELOCIDAD MÁXIMA DE RELAJACIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-proBNP EN SUERO	155
1.2. FUNCIÓN VENTRICULAR. VALORES DE LAS ÁREAS TELEDIASTÓLICA Y TELESISTÓLICA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-PROBNP EN SUERO	158
2. RELACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-	

proBNP CON <i>BIG</i> ENDOTELINA-1 Y ALDOSTERONA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	161
3. INFLUENCIA DE LA OBESIDAD SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA	162
4. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE NT-proBNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	166
5. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE BNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	169
6. DIAGNÓSTICO DE LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR MEDIANTE LOS NIVELES DE BNP EN ORINA Y SU RELACIÓN CON LA FUNCIÓN VENTRICULAR	172
7. IMPACTO DE LA FUNCIÓN RENAL SOBRE EL VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE INSUFICIENCIA CARDIACA DE BNP Y NT-proBNP EN ORINA	175
8. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE NT-proBNP EN SUERO Y ORINA EN PACIENTES ESTABLES CON INSUFICIENCIA CARDIACA, EN UN SEGUIMIENTO A DOS AÑOS	178
9. NIVELES TISULARES DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN CORAZONES HUMANOS CON INSUFICIENCIA CARDIACA	181
	189
	193
VI. CONCLUSIONES	
VII. REFERENCIAS	



I. INTRODUCCIÓN

“El corazón tiene aproximadamente la forma de una pirámide y su color es rojo intenso. Está rodeado de una capa fina, hay en ella un poco de líquido, parecido a la orina. Esto es así con el fin de que pueda moverse... Tiene dos ventrículos separados dentro del mismo envoltorio, y en nada se parecen entre sí. Uno se encuentra en la parte derecha, en contacto con una abertura de entrada comunicándose con una de las dos venas... Este primer ventrículo es muy amplio y mucho más blando que el otro, mientras que el otro ventrículo está más bien en la parte inferior, a la altura aproximadamente de la tetilla izquierda, como revelan los latidos. Tiene una cubierta gruesa... Los dos ventrículos son rugosos por dentro, como si estuvieran carcomidos; más el lado izquierdo que el derecho, porque el calor inmanente del corazón no está en el lado derecho; de modo que es extraño que sea más áspero el lado izquierdo, que está lleno de ese calor concentrado. Ésta es la razón también por la que está construido con paredes más gruesas, para conservar la fuerza del calor”

*Descripción del corazón
“De corde” (Sobre el Corazón) (IV a.C – I a.C)
Hipócrates (hacia 469-399 a.C)*



1. INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.1.1. Prevalencia e incidencia

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico muy frecuente que representa un destino final común en la mayoría de cardiopatías. Su importancia sociosanitaria es cada vez mayor debido sobretodo a su alta prevalencia y elevada morbimortalidad (Cowie *et al.*, 1997, Massie & Shah 1996). En los países industrializados presenta una prevalencia de 10 casos por mil de habitantes y una incidencia de 2 casos por mil (Levy *et al.*, 2002, Rodríguez-Artalejo *et al.*, 2004). Ello se debe, por un lado, al envejecimiento de la población general y, por otro, a que los pacientes con diferentes tipos de patología cardiovascular, incluyendo IC, tienen una mayor supervivencia gracias a la disponibilidad de mejores tratamientos (Massi & Shah 1996, Cleland *et al.*, 1999). Además, en los países desarrollados se está produciendo una epidemia de obesidad y diabetes tipo II, factores de riesgo de IC, que aumentan su incidencia (Solang *et al.*, 1999, Chobanian *et al.*, 2003).

1.1.2. Pronóstico

La ausencia de buenos criterios diagnósticos y de tratamientos eficaces para la IC, hasta hace relativamente poco tiempo, otorgan a esta patología graves implicaciones pronósticas, con una mortalidad elevada a corto plazo, incluso superior a la mayoría de las neoplasias malignas. Así, datos del estudio Framingham revelan que la mortalidad a 5 y 10 años es del 65% y 85% en varones y del 47% y 71% en mujeres, cuando la mortalidad media de todos los cánceres es del 50% (Ho *et al.*, 1993a). La mortalidad del primer año depende de los síntomas: así en los pacientes con disfunción ventricular asintomática o IC leve (NYHA I – II) es del 10–30% (Cohn *et al.*, 1991), en la moderada (NYHA III) es del 30–40% (Bangdiwala *et al.*, 1991) y en la grave (NYHA IV) es del 50% (The CONSENSUS 1987). Los estudios estadísticos coinciden en afirmar que a 5 años de la iniciación del “cuadro clínico” sólo sobrevive el 50% de los pacientes (Ho *et al.*, 1993b). Además, y desde el punto de vista económico, las hospitalizaciones por complicaciones de la enfermedad son muy frecuentes, significando altos costes económicos y de atención sanitaria.



En España, la IC causa 80.000 ingresos hospitalarios por año, los cuales representan del 5 al 10% de los ingresos en personas mayores de 65 años, con un aumento significativo en la última década (Rodríguez-Artalejo *et al.*, 1997, Cortina *et al.*, 2001). Por otro lado, la IC es la tercera causa de mortalidad por enfermedad cardiovascular en España, causando el 25% de los fallecimientos (Boix- Martínez *et al.*, 2002). Además, dado su curso crónico, la IC representa hasta el 2% del coste sanitario total, del cual el 65% se refiere al periodo de hospitalización (Rodríguez-Artalejo *et al.*, 2004).

1.1.3. Etiología

En 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la *World Health Federation* (WHF) establecieron un consenso para la definición y nomenclatura de las miocardiopatías. El documento se basó en dos principios:

1- Las enfermedades del miocardio debían distinguirse según su causa fuese conocida o desconocida; el término *miocardiopatía* se definió como “enfermedad del músculo cardíaco de causa desconocida”, distinguiéndose de las *enfermedades específicas del músculo cardíaco* de causa conocida o asociadas a desórdenes de otros sistemas (Brandenburg *et al.*, 1980).

2- La disfunción cardíaca causada por hipertensión sistémica o pulmonar, valvulopatías, o anomalías cardíacas congénitas fueron excluidas tanto del grupo de *miocardiopatías* como de *enfermedades específicas del músculo cardíaco*.

Con un mayor conocimiento de la etiología y patogénesis, las *miocardiopatías* son definidas actualmente como “enfermedades del miocardio asociadas a la disfunción cardíaca” (Richardson *et al.*, 1996). La Tabla 1 muestra las causas y factores más frecuentes de IC (de la Serna 2004).

En occidente estaba establecido que las causas etiológicas principales de IC eran la enfermedad coronaria (EC) y la hipertensión (HT), mientras que en el Tercer Mundo eran la fiebre reumática, las infecciones y las enfermedades relacionadas con la nutrición (Tavazzi 2001). Actualmente se observa un aumento de la incidencia de la miocardiopatía isquémica, junto con la disminución en HT y valvulopatías. En el estudio Framingham la combinación de EC con HT representaba el 40% de las causas de IC y el 35% de los casos de IC tenían en su origen la HT (Kannel *et al.*, 1972). Al comparar el estudio



Framingham con estudios más recientes, como el SOLVD (Bangdiwala *et al.*, 1992), se observa que en éste casi el 70% de los casos fueron de etiología isquémica, y sólo un 7% atribuibles a la HT. En una revisión realizada por Teerlink JR y col. (1991) se observa que la HT es la causa primaria de IC en sólo el 4% de los pacientes, mientras que en sujetos hospitalizados es el 16%. El tratamiento efectivo de HT, con la disminución de hipertrofia ventricular izquierda, producía su disminución como factor causal (Schmieder *et al.*, 1996).

Tabla 1. Clasificación etiológica de la insuficiencia cardíaca.

<p>1. <u>Alteración hemodinámica ventricular</u></p> <p>a. Sobrecarga de presión</p> <p> i. Hipertensión arterial sistémica</p> <p> ii. Estenosis aórtica</p> <p> iii. Coartación de aorta</p> <p>b. Sobrecarga de volumen</p> <p> i. Insuficiencias valvulares</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones propias de válvulas • Dilatación ventricular o dilatación por aneurisma con distorsión aparato subvalvular (remodelado) • Dilatación de la raíz aórtica o pulmonar <p> ii. Fístulas arterio-venosas</p> <p>c. Alteración llenado ventricular (Disfunción diastólica)</p> <p> i. Estenosis válvula aurículo-ventricular</p> <p> ii. Síndromes pericárdicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Constricción • Taponamiento pericárdico <p> iii. Restricción del llenado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Miocardiopatías restrictivas y fibrosis endocárdica • Rigidez de cámara • Rigidez miocárdica <p>2. <u>Alteración de la funcionalidad miocárdica</u></p> <p>a. Lesiones miocárdicas e intersticiales</p> <p> i. Infarto de miocardio</p> <p> ii. Miocardiopatías</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipertrófica • Idiopática dilatada • Dilatada secundaria: <ul style="list-style-type: none"> a. Infecciosas b. Tóxicas 	<p> c. Restrictivas</p> <p> d. Enfermedades metabólicas</p> <p> e. Enfermedad endocrina</p> <p> f. Colagenopatías, inmunopatías</p> <p> g. Hemocromatosis</p> <p> h. Sarcoidosis</p> <p> i. Toxoplasmosis</p> <p> j. Micoplasma</p> <p> k. Hipocalcemia</p> <p> l. Hipofosfatemia</p> <p> m. Deficiencia carnitina</p> <p> n. Deficiencia selenio</p> <p> o. Peripartum</p> <p> iii. Miocarditis</p> <p> iv. Pérdidas de miocitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Necrosis • Apoptosis <p> v. Remodelado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fibrosis intersticial <p> vi. Daño miocárdico en enfermedad sistémica y uso de drogas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neurológicas • Tumorales • Tóxicas <p>b. Alteración contractilidad</p> <p> i. Corazón atontado</p> <p> ii. Corazón hibernado</p> <p>3. <u>Arritmias</u></p> <p>a. Bradiarritmias</p> <p>b. Taquiarritmias</p>
---	--

Modificada: de la Serna F. *Epidemiología de la insuficiencia cardíaca*. Federación Argentina de Cardiología 2004; pag: 1-9.



En conclusión, podemos decir que la incidencia de enfermedad isquémica y la edad promedio de supervivencia aumentan, haciendo suponer que la prevalencia de IC, de origen isquémico, crecerá en las próximas décadas. Así, la prevención primaria y secundaria de la enfermedad miocárdica por isquemia son objetivos de primer orden para el mantenimiento y control de la salud pública (Bardají *et al.*, 2008).

1.2. DEFINICIÓN

Desde un punto de vista conceptual la insuficiencia cardíaca (IC) fue definida por la OMS como “*la situación fisiopatológica en la cual el corazón es incapaz de bombear la sangre (y como consecuencia nutrientes, como el oxígeno) en una cantidad suficiente para abastecer las necesidades metabólicas de los tejidos en reposo o durante el ejercicio, a pesar de haber recibido un retorno venoso adecuado*” (Brandenburg *et al.*, 1980). Más recientemente, el *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI) ha establecido que: “*Existe IC cuando una anomalía de la función cardíaca provoca que el corazón falle en bombear sangre en la tasa requerida por los tejidos para su metabolismo o cuando el corazón sólo puede hacerlo en presencia de una elevada presión de llenado. La incapacidad del corazón de bombear una cantidad suficiente de sangre puede deberse a un defectuoso llenado cardíaco y/o a una contracción o vaciado dificultoso. Los mecanismos compensatorios aumentan el llenado, la frecuencia cardíaca, y la masa muscular cardíaca para mantener la tasa de bombeo y causar una redistribución del flujo. Sin embargo – pese a los mecanismos compensadores – la capacidad del corazón para contraerse y relajarse declina progresivamente, y la IC empeora*”. (Givertz *et al.*, 2001).

Desde un punto de vista clínico el Grupo de Trabajo de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) ha definido la IC por la presencia de una serie de manifestaciones clínicas que ayudan a establecer el diagnóstico: “*la insuficiencia cardíaca es un síndrome en el que los pacientes presentan síntomas clínicos, típicamente falta de aire o fatiga tanto en reposo como durante el ejercicio, signos de retención de fluidos, como congestión pulmonar o inflamación de tobillos y evidencia objetiva de una anomalía de la estructura y función del corazón en reposo*” (Swedberg *et al.*, 2005; Dickstein *et al.*, 2008).

Además de la definición “global” de IC, hay que destacar otros términos importantes que se utilizan para describir diferentes tipos de IC, como son la insuficiencia cardíaca aguda o crónica, y la insuficiencia cardíaca



sistólica frente a la diastólica. La insuficiencia cardíaca aguda, se caracteriza por una rápida aparición de síntomas y signos relacionados con una función cardíaca anormal, pudiendo ocurrir con o sin previa enfermedad cardíaca. La insuficiencia cardíaca crónica es la forma más común de insuficiencia cardíaca y cuya definición hemos comentado anteriormente. La insuficiencia cardíaca sistólica se define por la presencia de una alteración de la contractilidad ventricular, que se pone de manifiesto con una disminución del volumen de eyección (fracción de eyección (FE) $\leq 40\%$). Y, finalmente, en la insuficiencia cardíaca diastólica existe un problema en la relajación de los ventrículos que compromete el llenado. En la mayoría de los casos, ambas no deben considerarse como entidades fisiopatológicas separadas; en casos de IC sistólica casi siempre hay un grado menor o mayor de disfunción diastólica. Los pacientes que presentan IC diastólica son personas ancianas, mayoritariamente mujeres, con obesidad, hipertensión y diabetes (McMurray *et al.*, 2004, Swedberg *et al.*, 2005).

1.3. DIAGNÓSTICO

La insuficiencia cardíaca como hemos visto es la vía final común de muchos procesos y se manifiesta como un síndrome clínico también común, por tanto la evaluación del paciente con sospecha de IC (con o sin disfunción ventricular), requiere confirmar hasta cuatro diagnósticos diferentes:

1) Diagnóstico sindrómico, es el que establece con seguridad el diagnóstico de IC en el paciente; para ello se basa en una serie de métodos (signos y síntomas clínicos, exploración física...) que evalúan objetivamente la función ventricular.

2) Diagnóstico fisiopatológico, que permite distinguir si la IC se debe a un fallo sistólico o diastólico, para lo que se hacen imprescindibles técnicas diagnósticas adicionales, como por ejemplo la ecocardiografía, o cardiología nuclear.

3) Diagnóstico etiológico, que debe identificar las causas pero, además, así como tener en cuenta los factores agravantes y desencadenantes de la IC, sobre todo en los casos potencialmente corregibles; y



4) Diagnóstico funcional, valora la gravedad de la IC en función de la tolerancia al esfuerzo del paciente. Este último se basa en la clasificación funcional de IC (clase funcional de I a IV) de la "New York Heart Association" (NYHA) y en la nueva clasificación en cuatro estadios de evolución y progresión de la IC desarrollada por el Grupo de Trabajo de la "American Heart Association" y de la "American College of Cardiology" (Hunt *et al.*, 2005).

La ESC ha desarrollado un algoritmo diagnóstico que debería realizarse en aquellos pacientes con sospecha de IC (Swedberg *et al.*, 2005) (Fig. 1). Todo paciente con síntomas de IC debería someterse a un estudio que incluyese:

a) Historia clínica. Los signos y síntomas clínicos son importantes ya que alertan al clínico sobre la posibilidad de que exista IC. La disnea, ortopnea, antecedentes de edema y fatiga, son síntomas y signos característicos, pero difíciles de interpretar en pacientes ancianos, obesos y mujeres, debido a una sensibilidad, especificidad y valor predictivo bajos (Guindo 2004).

b) Exploración física. Dentro de los signos exploratorios encontramos los que aparecen en el aparato cardiovascular (ingurgitación yugular, "ritmo de galope", "tercer ruido"...), y los que aparecen en otros órganos (crepitantes y sibilancias pulmonares, hepatomegalia, ictericia, ascitis, edemas periféricos...).

c) Hematología y bioquímica. Son inespecíficos, pero un paciente con IC suele ir acompañado de alteración en enzimas hepáticas y factores de coagulación. También se debe hacer una hemograma, ya que la anemia es un factor desencadenante o contribuye a la existencia de IC (Horwich *et al.*, 2002), además de una determinación de urea y creatinina plasmática.

d) Electrocardiograma (ECG). Un ECG normal sugiere que el diagnóstico de IC no es posible, mientras que un ECG anormal tiene un valor predictivo pequeño para la presencia de IC.

e) Radiografía de tórax. Es útil en la detección de cardiomegalia y congestión pulmonar, sin embargo sólo tiene valor predictivo en el contexto de signos y síntomas típicos y con un ECG anormal.

f) Ecocardiografía-Doppler. Es el "patrón de oro" en el diagnóstico de IC. Es útil para evaluar la función ventricular, la etiología de la cardiopatía subyacente, y estudios consecutivos informan sobre la utilidad del tratamiento.

g) Péptidos natriuréticos. Las concentraciones plasmáticas de algunos péptidos natriuréticos y sus precursores, especialmente el péptido natriurético



tipo B (BNP) y su extremo N-terminal (NT-proBNP), son útiles en el diagnóstico de la IC. Una concentración plasmática normal o baja en pacientes no tratados hace poco probable que la IC sea la causa de los síntomas.

h) Estudios adicionales. La resonancia magnética nuclear, que permite analizar la anatomía cardiovascular, la función ventricular y la detección de necrosis, y la cardiología nuclear (ventriculografía isotópica), que estudia la contractilidad ventricular y la detección de isquemia; además de función pulmonar y prueba de esfuerzo. Y, finalmente las pruebas invasivas, como cateterismo cardíaco o angiografía coronaria, principales métodos para evaluar las alteraciones coronarias; así como, el intervencionismo coronario percutáneo (angioplastia, stent...) que permite tratar eficazmente a un porcentaje muy elevado de estos pacientes.

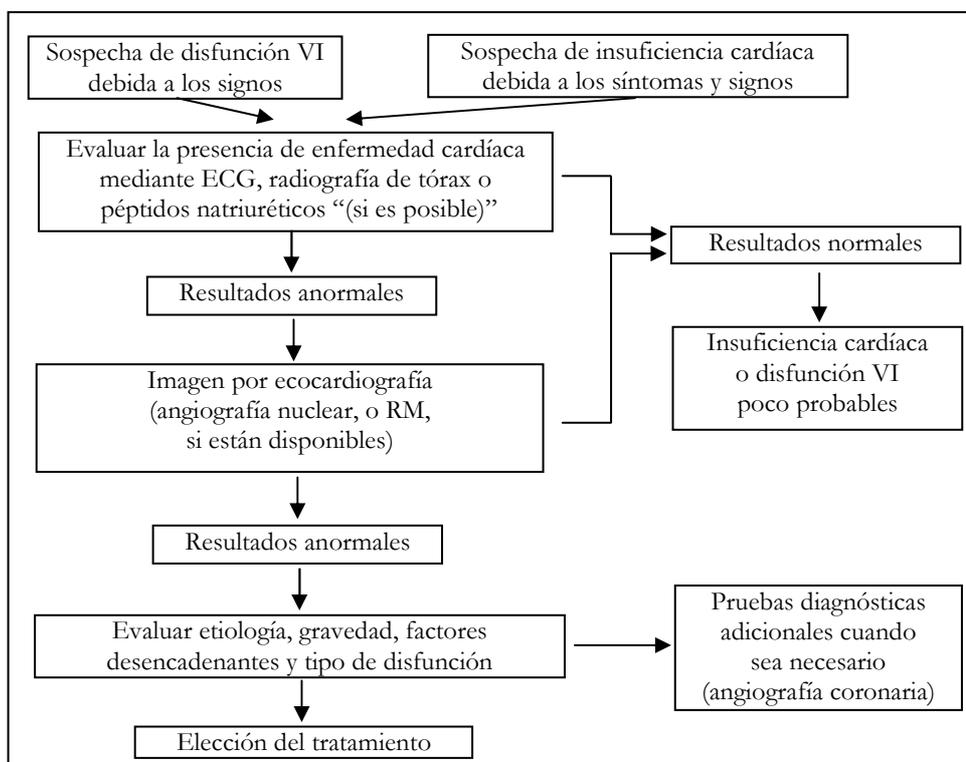


Figura 1. Algoritmo para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca o disfunción ventricular. ECG: electrocardiograma; RM: resonancia magnética; VI: ventrículo izquierdo. (Modificada de: Swedberg et al., *Eur Heart J* 2005; 26:1115-40).



Las últimas Guías de la ESC (Dickstein *et al.*, 2008) mantienen la estructura del algoritmo diagnóstico de IC del 2005, enfatizando el papel de los péptidos natriuréticos (BNP y NT-proBNP), estableciéndose unos rangos de valores: BNP <100 - >400 pg/mL, y NT-proBNP <400 - >2000 pg/mL, para un diagnóstico poco o muy probable de este síndrome.

En conclusión, para alcanzar el diagnóstico óptimo de insuficiencia cardíaca se deben cumplir los criterios aceptados en su definición, deben de existir los signos y síntomas propios de la enfermedad y la evidencia objetiva de disfunción ventricular; además, deben descartarse otros procesos que conduzcan a la misma sintomatología.

1.4. FISIOPATOLOGÍA

Entender la insuficiencia cardíaca (IC) como un conjunto de signos y síntomas causados por un inadecuado funcionamiento del corazón, enfoca solo un aspecto de la fisiopatología de este síndrome. Actualmente, una red compleja de alteraciones estructurales, funcionales y biológicas explican la naturaleza progresiva de la IC y la eficacia o fracaso de las distintas terapias empleadas.

El proceso dinámico por el cual la disfunción ventricular evoluciona hacia insuficiencia cardíaca se caracteriza por una fase inicial, en la que se produce un daño miocárdico, ya sea de forma directa (enfermedad cardíaca aterosclerótica, miocardiopatía y/o miocarditis, estados de déficit de vitaminas...), a través de sobrecarga ventricular volumétrica (regurgitación, defecto del septo interventricular...) o por sobrecarga de presión (estenosis aórtica, hipertensión sistémica, estenosis pulmonar...), incluso a través de una restricción de llenado ventricular (estenosis mitral, pericarditis constrictiva o miocardiopatía restrictiva) (Guindo 2004), que conducen a un descenso del gasto cardíaco y a un aumento de la presión venosa, dando lugar a alteraciones hemodinámicas que activan una serie de “*mecanismos de compensación*” (Packer 1992, Bolger *et al.*, 2002). El objetivo de estos mecanismos es aumentar el gasto cardíaco y mantener la presión arterial, asegurando la perfusión a los órganos vitales como el cerebro y corazón. Ello hace posible que con una afectación



importante de la capacidad contráctil del corazón pueda mantenerse un gasto cardíaco normal, al menos en reposo.

Uno de estos mecanismos de compensación es el modelo hemodinámico, el cual enuncia que: *“La IC progresa porque el estrés hemodinámico ejerce un efecto perjudicial sobre la circulación; de esa forma cualquier pérdida de miocardio viable se acompaña de aumento de la presión telediastólica y del volumen telediastólico como forma de mantener el volumen sistólico cuando la fracción de eyección está reducida. El aumento de las cargas cardíacas (pre- y post-) es un estrés importante para estos pacientes con IC”* (Katz 2000). Es decir, el mecanismo compensador implica sobrecargas de volumen y presión que van causando alteraciones en la geometría del ventrículo, que conducen a una fase silente de dilatación ventricular progresiva en la que, además de factores físicos, intervienen factores neurohormonales activados tanto a nivel sistémico como tisular. La hipótesis neurohormonal constituye otro mecanismo de compensación: *“La IC progresa porque sistemas neurohormonales activados por un daño inicial al corazón ejercen un efecto perjudicial sobre la circulación (vasoconstricción y retención de sodio y agua). El efecto se presenta porque la activación neurohormonal incrementa las anomalías hemodinámicas de la IC o porque tal activación ejerce un efecto tóxico directo sobre el miocardio”* (Packer 1992).

Este intento del corazón por adaptarse y compensar el daño miocárdico se conoce como *“remodelado ventricular”*. Proceso por el cual fuerzas físicas (modelo hemodinámico), factores hormonales (activación neurohormonal) y, posiblemente factores genéticos, alteran el tamaño, forma y función del ventrículo, produciendo dilatación, hipertrofia y reestructuración ventricular progresiva.

El remodelado ocurre bajo diversas condiciones clínicas y depende de la etiología del proceso; es distinto el grado de deformación miocárdica que puede observarse después de un infarto de miocardio, de la reestructuración que se presenta en la hipertensión arterial, miocardiopatía o incluso en determinadas valvulopatías (Jessup & Brozena 2003). Por ejemplo, después de un infarto agudo de miocardio, la pérdida de miocitos resulta en unas condiciones de carga anormales que envuelven no sólo al borde de la zona de infarto, sino también al miocardio más lejano. Estas condiciones de carga anormales producen dilatación y cambio en la forma del ventrículo, convirtiéndose en más esférico, así como también causa hipertrofia. El



remodelado continua meses después del daño inicial, y el cambio en la forma del ventrículo se hace deletéreo para la función global del corazón (Fig. 2A) (Pfeffer & Braunwald 1990, Sutton & Sharpe 2000). En la miocardiopatía, el proceso de dilatación e hipertrofia ocurre sin el aparente daño del miocardio inicial que se observa después de un infarto de miocardio (Fig. 2B). En general, el remodelado ventricular se caracteriza por hipertrofia, pérdida de miocitos, y un aumento de la fibrosis intersticial.

En conclusión, el modelo hemodinámico de la IC enfatiza el efecto de una carga alterada sobre el ventrículo dañado y el efecto de los vasodilatadores y agentes inotrópicos. Mientras que el modelo neurohormonal reconoce la importancia de la activación del sistema nervioso simpático (Bohm 1995, Cohn *et al.*, 1984), del eje renina-angiotensina-aldosterona (Crackower *et al.*, 2002, Webber *et al.*, 2001), de la presencia de arginina-vasopresina (Chatterjee 2005), y a nivel endotelial de la activación de mediadores vasoconstrictores como la endotelina (ET) (Wei *et al.*, 1994, Levin *et al.*, 1995). La respuesta contrarreguladora viene mediada por los péptidos natriuréticos liberados en el propio corazón (Levin *et al.*, 1998, Osca *et al.*, 2002), la adrenomedulina (Pousset 2000) y el óxido nítrico (Ferrari *et al.*, 1998, López-Farré & Casado 2001). Además, también se activa una respuesta inflamatoria con liberación de citocinas (Finkel *et al.*, 1992) y factores de crecimiento (Levine *et al.*, 1990) que contribuyen a la hipertrofia, a la pérdida de miocitos por apoptosis y, en definitiva, llevan a la disfunción ventricular progresiva. Por ello, estos mecanismos de compensación resultan perjudiciales a medio y largo plazo, ya que estimulan el remodelado ventricular. De esta manera se crea un círculo vicioso en el que el daño miocárdico inicial crea una sobrecarga hemodinámica que estimula la aparición de una respuesta biológica que a su vez es la responsable de una mayor disfunción cardíaca. Como resultado de todos estos mecanismos el paciente con IC tiene una gran cantidad de “mediadores”, que circulan en concentraciones elevadas, que podrían servir como “marcadores” de la situación clínica, de su evolución o incluso del pronóstico y respuesta al tratamiento.

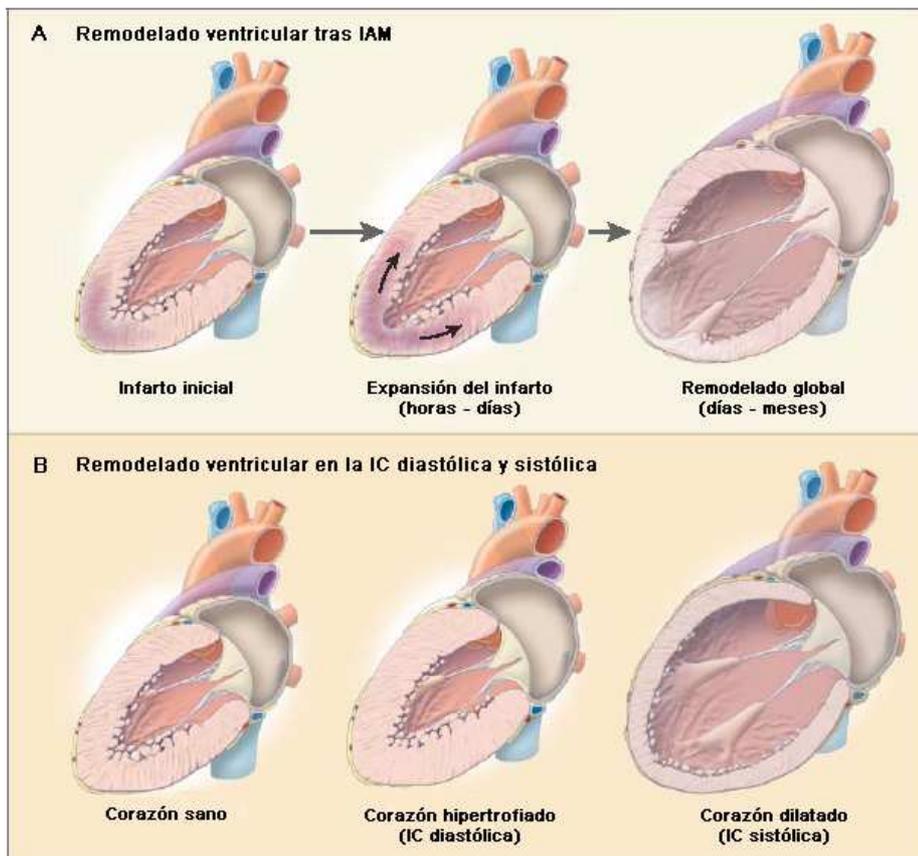


Figura 2. Remodelado ventricular después de un infarto agudo de miocardio (IAM) (A) y en la insuficiencia cardíaca (IC) sistólica y diastólica (B). En el caso de un IAM, en la figura infarto apical, no hay cambios clínicos significantes a nivel de la geometría ventricular (A). En un intervalo de horas a días, el área del miocardio afectada por el infarto empieza a expandirse y se vuelve más delgada. En un intervalo de días a meses, el remodelado global puede ocurrir, dando lugar a una dilatación global, con función sistólica disminuida y disfunción válvulo-mitral. El remodelado ventricular clásico que ocurre en la miocardiopatía hipertensiva (B), da lugar a un tamaño de la cavidad ventricular izquierda normal con engrosamiento de las paredes ventriculares (hipertrofia ventricular concéntrica) y función sistólica preservada. En contraste, el remodelado clásico ocurre con la miocardiopatía dilatada (B) dando lugar a una forma globular del corazón, un engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo, una función sistólica disminuida y una distorsión del aparato válvulo-mitral, conduciendo a una regurgitación mitral. (Modificada de: Jessup et al. *N Engl J Med* 2003; 348:2007-18)



2. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

2.1. TIPOS

En 1956, varios experimentos establecieron al corazón como un órgano endocrino. La microscopía electrónica revelaba gránulos secretores almacenados en los miocitos de las aurículas, cuyo componente granular tenía acción fisiológica a distancia (Kisch 1956, Henry & Pearce 1956). Sin embargo, fue en 1981 cuando Adolfo de Bold y col (1981), homogenizaron extractos de aurícula y ventrículo de ratas y los inyectaron vía intravenosa en animales anestesiados, produciendo un aumento en el volumen de orina y en la excreción de sodio. La inyección producía una alteración tanto de la diuresis como natriuresis (nivel de sodio en orina). Este hecho llevó al aislamiento y clonación del péptido natriurético auricular (ANP), el primer miembro de una familia de péptidos con una potente actividad natriurética, diurética y vasorelajante, que se llaman péptidos natriuréticos (PN).

Actualmente hay descritos cuatro PN: a) péptido tipo A o péptido natriurético auricular (ANP); b) péptido tipo B o péptido natriurético cerebral (BNP, llamado así porque fue aislado por primera vez en el cerebro porcino), (Sudoh *et al.*, 1988); c) péptido natriurético C (CNP), producido y secretado principalmente por las células endoteliales y también a nivel del sistema nervioso central (Sudoh *et al.*, 1990); y d) “péptido natriurético dendroaspis” (DNP), aislado del veneno de la “mamba verde” (*Dendroaspis angusticeps*), que ha sido identificado también en el plasma de mamíferos, aunque su origen y relevancia patofisiológica no están determinados. (Richards *et al.*, 2002).

Los miembros de la familia de PN que tienen relevancia en el contexto de las enfermedades cardiovasculares son: ANP, BNP y CNP. Y en concreto el BNP y sus moléculas relacionadas, que tienen un poder diagnóstico y pronóstico más sensible y exacto, y por lo tanto se les dará mayor relevancia clínica en esta tesis.



2.2. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Todos los PN muestran igual conformación estructural. Su estructura peptídica se caracteriza por un anillo de 17 residuos cerrado por un puente bisulfuro intramolecular, entre dos residuos de cisteína. La secuencia de aminoácidos de este anillo es muy similar entre los distintos PN y también está altamente preservada entre las diferentes especies animales, esta es la parte que se une al receptor específico (Martinez-Rumayor *et al.*, 2008). Sin embargo, las cadenas de aminoácidos amino y carboxi terminales tienen un alto grado de variabilidad entre los PN, no sólo en cuanto a su longitud, sino también por el tipo de residuos que componen las cadenas. El ANP es un polipéptido de 28 aminoácidos, el BNP de 32 aminoácidos, el CNP de 22 aminoácidos (Fig. 3) y 38 aminoácidos tiene el DNP.

Otra característica bioquímica de la familia de los PN es que son producidos como prohormonas, codificadas en genes separados para cada uno de los péptidos y su distribución en los tejidos, y su regulación, son también únicas para cada uno de ellos.

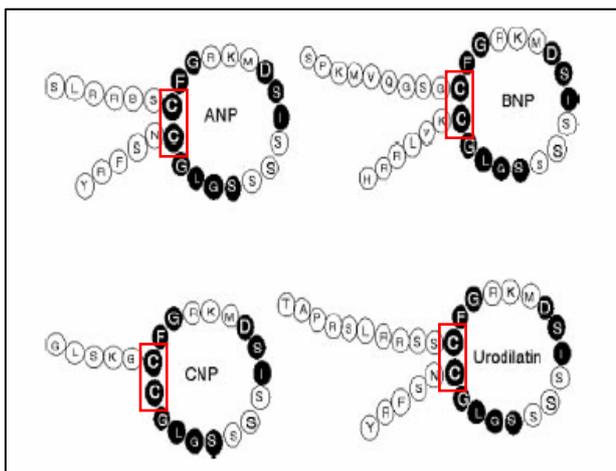


Figura 3. La estructura básica de los péptidos natriuréticos la componen 11 aminoácidos similares (círculos negros), en la misma posición, entre dos residuos de cisteína, que forman un anillo mediante un puente bisulfuro. C: cisteína; D: aspartato; F: fenilalanina; G: glicina; L: leucina; S: arginina; I: isoleucina. (Extraída de: Cheng & Burnett. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:406-16).

El transcrito del ARN para el péptido natriurético auricular (ANP) tiene un tamaño de aproximadamente 1 kb (compuesto por 3 exones y 2 intrones) y codifica a una proteína precursora (prepropéptido natriurético auricular) de 150 aminoácidos. Esta molécula contiene una secuencia señal de



24 aminoácidos que posiblemente facilita el transporte a través de retículo endoplásmico y su anclaje ribosomal (Seidman *et al.*, 1984). Este péptido señal es cortado durante el transporte para producir el proANP de 126 aminoácidos (Bloch *et al.*, 1985), el cual es almacenado en gránulos en el interior de los cardiomiocitos auriculares. En el momento de la liberación de ANP, este propéptido es proteolizado por una serina proteasa dando lugar a dos productos equimolares: un fragmento amino terminal de 98 aminoácidos (NT-proANP) y un fragmento carboxi terminal de 28 aminoácidos, que representa la molécula biológicamente activa, el ANP. Ambos fragmentos, así como otros fragmentos amino y carboxi terminales, circulan en el plasma (Fig. 4). Diversos estudios sugieren que estos fragmentos podrían tener incluso más importancia que el ANP como hormona natriurética.

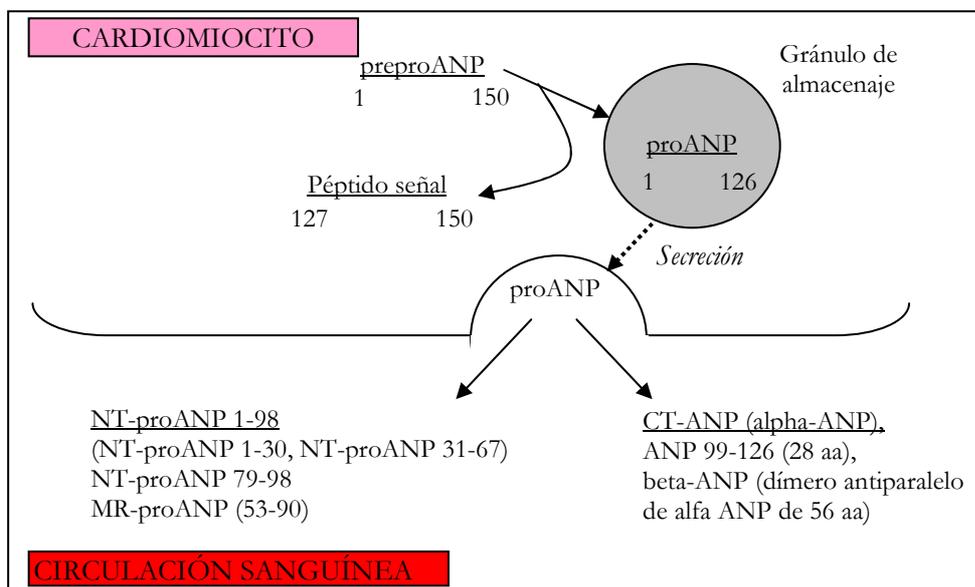


Figura 4. Síntesis, almacenaje y secreción del péptido natriurético auricular (ANP) en los cardiomiocitos auriculares. CT: carboxi terminal; NT: amino terminal. (Modificada de: Mair *et al.*, *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:132-42).

Uno de los fragmentos es la urodilatina, compuesta por 32 aminoácidos (Fig. 3), que ha sido identificada en orina en humanos y es producida por el riñón. Este péptido podría tener un papel importante en la regulación renal del sodio y agua (Schulz-Knappe *et al.*, 1992). Otro de los fragmentos es el dímero



antiparalelo de ANP, beta ANP, que ha sido detectado en el miocardio y plasma de pacientes con insuficiencia cardíaca y el cual tiene unos efectos fisiológicos más reducidos que el ANP (Fig. 4) (Wei *et al.*, 1993). Por último, el fragmento de la región media de proANP (MR-proANP) con papel diagnóstico de la IC crónica y aguda (Moertl *et al.*, 2009; Dieplinger *et al.*, 2009)

El péptido natriurético cerebral (BNP) humano es codificado por un gen de copia única constituido por 3 exones y 2 intrones. Su ARNm contiene cuatro secuencias repetidas de AUUUAA dentro de la región 3' que se cree confiere la estabilidad. Las secuencias del precursor en los mamíferos ha derivado de una secuencia cADN de BNP que codifica toda la molécula preproBNP (Maekawa *et al.*, 1988). Ésta además de contener al proBNP (108 aminoácidos) contiene un péptido señal N-terminal de 26 aminoácidos hidrofóbico, que se elimina cotraduccionamente en el retículo endoplásmico rugoso durante la síntesis proteica (Fig. 5), y antes de que termine la síntesis de la parte carboxi terminal de la prohormona, (Goetze 2004).

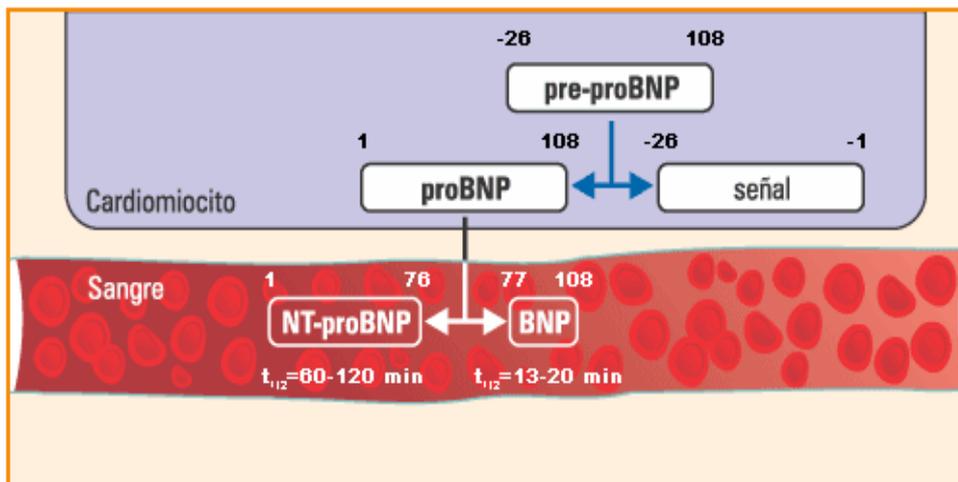


Figura 5. NT-proBNP y BNP: ambas moléculas derivan del mismo precursor intracelular de 108 aminoácidos (proBNP), el cual es escindido por acción de una proteasa en dos fragmentos amino y carboxi terminal. http://www.rochediagnostics.es/productos_servicios/02010202.html

El BNP es producido por los cardiomiocitos como una prohormona de 108 aminoácidos (proBNP), el cual es dividido proteolíticamente en las



posiciones 73-76 (Arginina-Alanina-Prolina-Arginina), dando dos regiones equimolares: la primera región es un fragmento amino terminal 1-76 (NT-proBNP), y la segunda región es el extremo carboxi terminal 77-108 (BNP), que se corresponde con la molécula biológicamente activa (de Lemos *et al.*, 2003) (Fig. 5). Actualmente es debatido cuando y dónde la prohormona es dividida, ya que pequeñas concentraciones de la molécula intacta de proBNP han sido encontradas en el suero, y tanto BNP como NT-proBNP han sido determinados en extractos celulares (Hunt *et al.*, 1997). Sin embargo, la mayoría de proBNP es procesado antes de alcanzar la circulación sanguínea. En cuanto a la proteasa que escinde a la molécula de proBNP para dar las dos regiones, al principio se estableció que era la endoproteasa furina, porque los genes para ambos se expresan en los cardiomiocitos del corazón enfermo (Sawada *et al.*, 1997). Recientemente, una nueva serina proteasa llamada corina ha sido identificada en el corazón humano, la cual posee dentro de la membrana celular, un dominio transmembrana y está localizada, y se ha comprobado que puede escindir tanto a la molécula de proANP como proBNP *in vitro* (Goetze 2004). Este hecho sugiere que el péptido es dividido principalmente dentro de o en la superficie de la membrana de los cardiomiocitos.

Tanto la molécula intacta proBNP, como BNP y NT-proBNP circulan en plasma y pueden ser analizados mediante inmunoensayos. En sujetos normales las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP y BNP son similares, ambas moléculas son liberadas continuamente por el corazón y detectadas en el torrente sanguíneo a concentraciones muy bajas (picomolar); la vida media en sangre para BNP es de 13-20 minutos y 120 minutos para NT-proBNP (Mair *et al.*, 1999). Sin embargo, en pacientes con disfunción ventricular los niveles séricos de NT-proBNP aumentan de 2 a 10 veces más que los de BNP. El mecanismo exacto responsable de este hecho no está esclarecido, pero se piensa que cambios a nivel de secreción y/o en los mecanismos de aclaramiento podrían jugar un papel decisivo (Smith *et al.*, 2000).

El péptido natriurético tipo C (CNP) es sintetizado principalmente en el sistema nervioso central, riñón y por las células endoteliales del tejido vascular (Sudoh *et al.*, 1990). El gen que codifica CNP está localizado en humanos en el cromosoma 2 y contiene dos exones separados por un intrón. El CNP es sintetizado como un precursor de 126 residuos (proCNP) que es



procesado para generar una molécula de 22 aminoácidos (CNP-22) y otra molécula de 53 aminoácidos (CNP-53). CNP-22 es la forma predominante y es más potente fisiológicamente que CNP-53, además se caracteriza por la pérdida del extremo carboxi terminal (Fig. 3) (Tawaragi *et al.*, 1991).

Las bajas concentraciones de CNP en plasma sugieren que este péptido actúa como un neurotransmisor de forma paracrina, mientras que ANP y BNP serían verdaderas hormonas reguladoras (Barr *et al.*, 1996). Los niveles de CNP no están relacionados con la IC, sin embargo juegan un papel importante en la fisiología cardiovascular como regulador del tono y flujo vascular a través de su acción vasorelajante, inhibiendo la proliferación del músculo liso vascular y la migración de las células endoteliales (Stingo *et al.*, 1992).

Por último, el péptido natriurético dendroaspis (DNP) que fue aislado del veneno de la serpiente “mamba verde” (*Dendroaspis angusticeps*), tiene una estructura similar a los tres péptidos natriuréticos cardíacos humanos. Comparte el anillo característico de 17 residuos con el puente disulfuro, pero es estructuralmente diferente en sus regiones amino y carboxi terminal (Schweitz *et al.*, 1992). Los datos sobre la forma humana son escasos, el gen no ha sido clonado y su presencia en humanos es controvertida. Algunos autores sugieren que el DNP es un péptido natriurético primitivo, ancestral, un precursor que ha evolucionado a ANP y BNP (Richards *et al.*, 2002).

2.3 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS, ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN

2.3.1 Síntesis

Tanto ANP como BNP son sintetizados y secretados por los cardiomiocitos auriculares y ventriculares. El ANP está presente en los ventrículos de los fetos y neonatos, en los ventrículos hipertrofiados así como en bajas concentraciones en los ventrículos de adultos sanos (Cameron & Ellmers 2003). Sin embargo, las aurículas son la principal fuente de producción de este péptido en el corazón adulto sano (Gu *et al.*, 1989, Saito *et al.*, 1989) (Fig. 6). La expresión de BNP, en el corazón sano, ocurre principalmente en la aurícula (de Bold *et al.*, 2001). Sin embargo, la síntesis de BNP ventricular está estimulada en aquellas patologías que afectan a los ventrículos, produciendo



una sobrecarga ventricular prolongada que conduce a un estrés de pared, como es el caso de la IC (Mukoyama *et al.*, 1990) (Fig. 6). Recientemente, también se ha visto que existen otras células dentro del corazón que producen y liberan BNP, los fibroblastos (Tsuruda *et al.*, 2002) y los vasos del seno coronario, al menos en la aterosclerosis coronaria (Casco *et al.*, 2002).

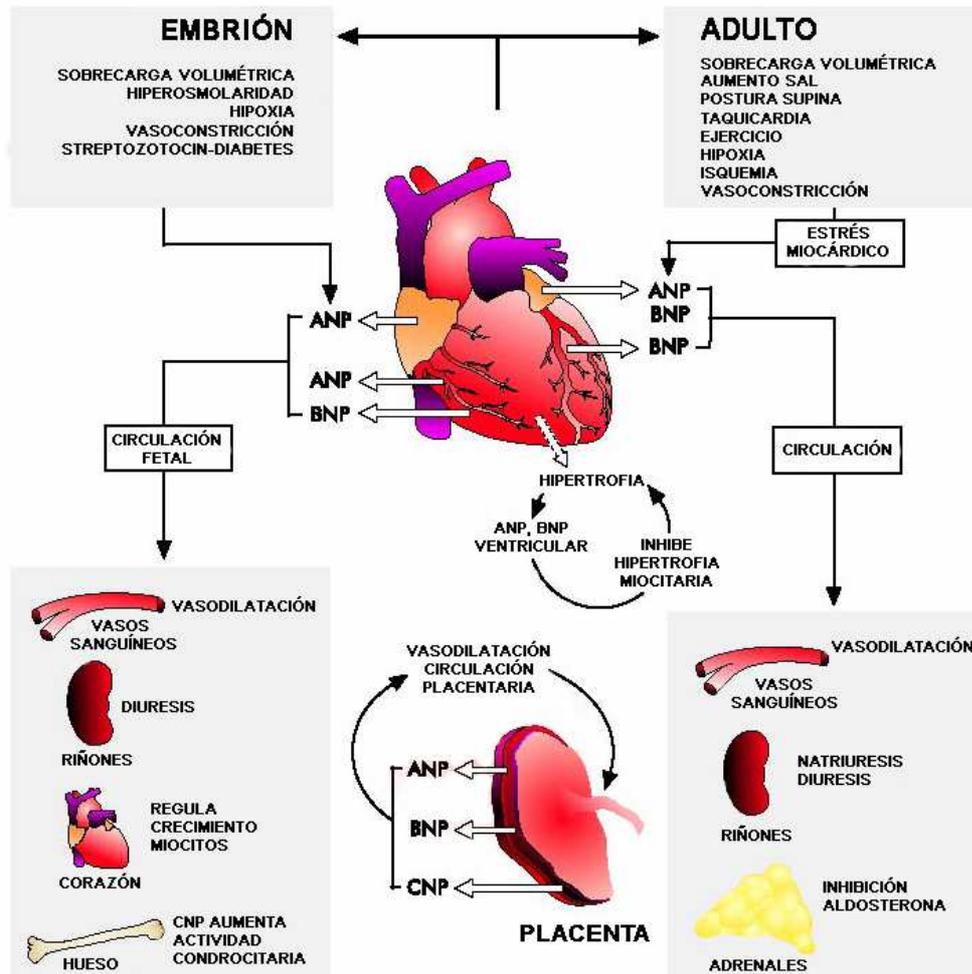


Figura 6. Diagrama comparando el sistema de péptidos natriuréticos en embriones (izquierda) y adultos (derecha). La parte superior de la imagen muestra los estímulos fisiológicos conocidos que regulan la secreción de los péptidos natriuréticos en el corazón adulto y embrionario, y la parte inferior muestra las principales acciones fisiológicas de estos péptidos. ANP: péptido natriurético auricular; BNP: péptido natriurético cerebral; CNP: péptido natriurético tipo C. (Extraída y traducida del artículo Cameron & Ellmers. *Endocrinology* 2003, 144:2191-94)



El principal estímulo para la liberación de ANP es el aumento del estrés de pared de las aurículas (Edwards *et al.*, 1988), reflejo de un aumento del volumen intravascular. Por ello, todas las condiciones que aumenten el retorno venoso (insuficiencia cardíaca crónica estable, ejercicio físico, posición supina, hipoxia...) producen un rápido aumento en los niveles de ANP (mayor que de BNP) (Chen *et al.*, 1997, Bentzen *et al.*, 2004). En el caso del BNP, el alargamiento de la pared es el estímulo predominante que controla de forma directa o a través de factores paracrinos su liberación desde la aurícula y ventrículos (Harada *et al.*, 1998). Mientras el ANP es principalmente liberado por un aumento en la presión transmural auricular, el BNP es regulado tanto por la presión como por la sobrecarga de volumen. Como consecuencia el ANP es liberado en la insuficiencia cardíaca compensada donde existe hipertrofia, pero no aumento de la presión ventricular al final de la diástole, y el BNP es liberado cuando existe incremento de la presión (insuficiencia cardíaca descompensada). Otros estímulos como taquicardia, hipertrofia y fibrosis, inducen también la producción de BNP (Riddervold *et al.*, 1991, Sakata *et al.*, 2001, Walther *et al.*, 2003); estos resultados podrían explicar el hallazgo de unos niveles de este péptido aumentados en pacientes con síndrome coronario agudo sin dilatación significativa de la cámaras ventriculares (de Lemos & Morrow 2002). Además, la posible presencia de disfunción diastólica y la relación significativa entre los niveles séricos de BNP y NT-proBNP y la mortalidad en pacientes con angina inestable y función sistólica preservada apoya la hipótesis de que la isquemia miocárdica puede estimular la síntesis de BNP en ausencia de necrosis (Hama *et al.*, 1995; Muramoto *et al.*, 1995).

Por otro lado, diversos estudios experimentales y ensayos clínicos han demostrado que la síntesis de PN no está solamente influenciada por cambios hemodinámicos que conducen a un alargamiento ventricular y/o un aumento del estrés de pared ventricular, sino también por complejas interacciones entre el sistema neuroendocrino (catecolaminas, endotelinas, y angiotensina II) e inmune (como factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina-1 e interleucina-6), que estimulan la síntesis y secreción de PN (Leskinen *et al.*, 1997, Ma *et al.*, 2004, Emdin 2004). También, la respuesta del sistema de PN a la activación neuroendocrina e inmune no es lineal, por lo que pequeños cambios



hemodinámicos, difícilmente detectables mediante métodos diagnóstico estándares, pueden producir cambios significativos en los niveles de BNP.

También se han encontrado niveles elevados de PN en algunas condiciones fisiológicas (embarazo, hipertiroidismo y ejercicio físico) y terapéuticas (hormonas sexuales esteroideas, glucocorticoides, hormonas tiroideas, factores de crecimiento, bloqueadores beta, digoxina...) (Tsutamoto *et al.*, 1997, Rodríguez *et al.*, 2003, Yoshizawa *et al.*, 2004), donde el rendimiento cardiaco se mantiene dentro de un rango normal o ligeramente aumentado. Además, enfermedades como cirrosis hepática, enfermedad pulmonar o renal, y la IC muestran niveles séricos alterados de BNP y NT-proBNP (Poulos *et al.*, 1995, McCullough *et al.*, 2003, Clerico & Emdin 2004, Emdin *et al.*, 2005). La Tabla 2 muestra las principales enfermedades que alteran los niveles de PN.

Tabla 2. Principales enfermedades caracterizadas por niveles séricos de péptidos natriuréticos aumentados.

Enfermedad	Niveles de péptidos natriuréticos
Enfermedades cardiovasculares	
Insuficiencia cardiaca	Muy aumentados
SCA e infarto agudo de miocardio	Aumentados
Hipertensión con HVI y fibrosis	Aumentados
Taquiarritmia supraventricular	Aumentados
Enfermedades respiratorias	
Disnea aguda	Normal o ligeramente aumentados
Embolia pulmonar	Aumentados
Desórdenes respiratorios crónicos	Normal o ligeramente aumentados
Hipertensión pulmonar primaria	Aumentados
Desórdenes metabólicos-endocrinos	
Hipertiroidismo	Ligeramente aumentados
Hipotiroidismo	Ligeramente disminuidos
Síndrome de Cushing	Aumentados
Hiperaldosteronismo	Aumentados
Diabetes	Normal o aumentados
Cirrosis hepática	Aumentados
Insuficiencia renal (aguda o crónica)	Aumentados
Shock séptico	Aumentados
Amiloidosis	Normal o aumentados
Hemorragia subaracnoidea	Normal o aumentados
Síndromes paraneoplásicos	Normal o aumentados
Terapia antineoplásica	Normal o aumentados

HVI: hipertrofia del ventrículo izquierdo; SCA: síndrome coronario agudo. (Modificada de: Emdin *et al. Ital Heart J* 2005; 6: 430-46).



2.3.2. Almacenamiento y secreción

Está establecido que los miocitos auriculares contienen gránulos de secreción como almacén de péptidos, lo que llevó a finales de los años 50 a ver el corazón como un órgano endocrino (Kisch 1956, Henry & Pearce 1956).

Varios estudios que han comparado la producción de PN en distintas cámaras cardiacas han mostrado grandes diferencias entre las aurículas y los ventrículos. En un corazón sano la capacidad endocrina reside en la aurícula, secretando tanto ANP como BNP, mientras que en una situación crónica de alargamiento miocárdico hay un aumento en la producción ventricular de estos péptidos (Mukoyama *et al.*, 1991, Christoffersen *et al.*, 2002).

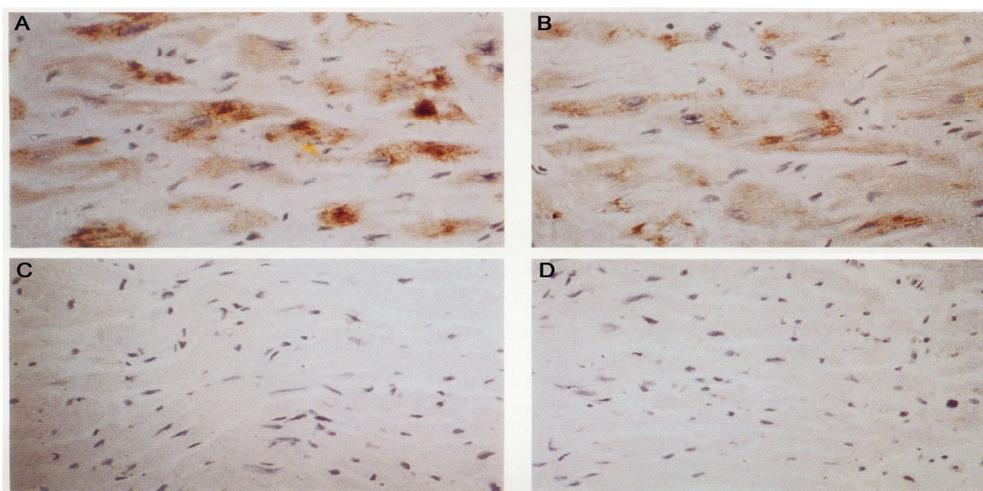


Figura 7. Inmunohistoquímica de los péptidos natriuréticos ANP (A) y BNP (B) en los miocitos ventriculares de pacientes con miocardiopatía dilatada. Los productos de la inmunoreacción de color marrón tanto para el ANP como para el BNP están dispersados en el citoplasma, sin embargo la inmunoreacción para el BNP en ocasiones muestra un patrón citosólico (B). Las biopsias endomiocárdicas ventriculares de sujetos control no muestran una inmunoreacción específica para el ANP (C) ni para el BNP (D). ANP: péptido natriurético auricular; BNP: péptido natriurético cerebral. (Modificada de: Hasegawa *et al.* *Am J Pathol* 1993; 142:107-16).

En términos relativos esta producción parece cuantitativamente más importante para el BNP y sus péptidos derivados que para el ANP. A nivel regional dentro de las cámaras cardiacas, los “apéndices” auriculares parecen ser la fuente de liberación de PN, ya que se representan anatómicamente como



“sensores de sobrecarga” (Goetze *et al.*, 2006), mientras que en el caso de los ventrículos el endocardio es el principal lugar de expresión de ANP y BNP en los corazones enfermos (Prestle *et al.*, 1999) (Fig. 7).

A diferencia de los miocitos auriculares que secretan gránulos que contienen proANP, proBNP y péptidos derivados de su escisión (ANP y BNP), los miocitos ventriculares no parecen producir estos gránulos de secreción en sujetos adultos sanos; sin embargo, si se han visto tanto los gránulos como los productos derivados en corazones con miocardiopatía (Nicolau *et al.*, 1997). En el caso de los miocitos auriculares se han observado gránulos que contienen sólo ANP, y gránulos que contienen ambos péptidos (ANP y BNP), mientras que en los miocitos ventriculares ambos péptidos son colocalizados en los mismos gránulos, lo que sugiere, al menos en parte, que son sintetizados y secretados simultáneamente por los ventrículos (Hasegawa *et al.*, 1993) (Fig. 8). Este hallazgo discrepa con que los niveles de BNP aumentan más que los de ANP en la disfunción ventricular (Mukoyama *et al.*, 1991).

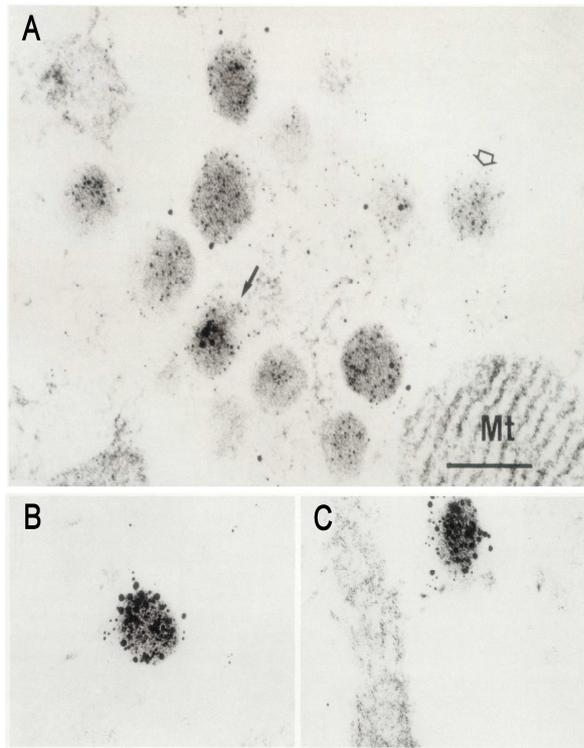


Figura 8. Inmunocitoquímica de ANP y BNP en miocitos de la aurícula derecha (A) y en ventriculares de pacientes con miocardiopatía dilatada (B y C). Las partículas de oro coloidal pequeñas (5 nm) indican ANP y las grandes (10 nm) BNP. En la imagen A, las flechas abiertas indican gránulos Tipo 1 que contienen sólo ANP y las flechas sólidas indican gránulos Tipo 2 que contienen ANP y BNP. En las imágenes B y C, los gránulos muestran inmunoreacción intensa para ambos péptidos (Tipo 2). La intensidad de marcaje para BNP fue alta en los gránulos del ventrículo, pero débil y variada en la aurícula. Para ANP fue intensa y uniforme en los gránulos auriculares y ventriculares. ANP: péptido natriurético auricular; BNP: péptido natriurético cerebral. (Modificada de: Hasegawa *et al.* *Am J Pathol* 1993; 142:107-16).



La explicación puede encontrarse en que la regulación de la concentración de los PN se desarrolla de distinta manera. En el caso de ANP parece ocurrir a nivel de la liberación de gránulos de secreción, mientras que la regulación de la síntesis de BNP tiene lugar durante la expresión génica, vía síntesis *de novo* (Mantymaa *et al.*, 1993). El ANP es almacenado en gránulos auriculares y el estrés auricular produce una rápida liberación de péptidos derivados de proANP. Con respecto a la síntesis *de novo*, hay una activación relativamente lenta del gen de ANP. En contraste, el BNP y sus péptidos relacionados (proBNP, NT-proBNP) son secretados por vía constitutiva como respuesta a la sobrecarga ventricular (Hama *et al.*, 1995), y la activación del gen de BNP ocurre de manera más rápida que para el ANP. Esto implica que sólo pequeñas cantidades son almacenadas en gránulos y que las células son dependientes de la activación del gen de BNP cuando se requiere una mayor secreción de los péptidos (Yasue *et al.*, 1994, Sumida *et al.*, 1995). Estudios previos sugieren que la regulación del ANP es menos dependiente de la gravedad de la disfunción ventricular, ya que existe inducción del ARNm de ANP en la insuficiencia cardiaca compensada, mientras que el ARNm de BNP necesita de un aumento de volumen (insuficiencia cardiaca descompensada) (Langenickel *et al.*, 2000). Sin embargo, la regulación de la expresión de los ARNm de ANP y BNP ventricular en las fases finales de la insuficiencia cardiaca se produce de manera similar (Takahashi *et al.*, 1992).

En resumen, el almacén a nivel celular y secreción de los péptidos natriuréticos y sus péptidos derivados son procesos complejos, y el concepto prevalente de una secreción auricular regulada y una secreción ventricular constitutiva, debe ser estudiado con más detalle.

2.4. RECEPTORES DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

2.4.1. Receptores guanilato ciclasa

Los péptidos natriuréticos son ligandos de tres tipos diferentes de receptores de superficie de membrana celular, llamados RPN-A, RPN-B y RPN-C, y que median sus efectos fisiológicos. Cada uno de estos tres receptores de péptidos natriuréticos (RPN) contienen una guanilato ciclasa de tipología característica: un dominio de unión extracelular, una región



transmembrana y un dominio intracelular que contiene la región catalítica en su terminal carboxilo (Hirose *et al.*, 2001).

Los receptores RPN-A y RPN-B son estructuralmente similares, con un 44% de homología en sus dominios extracelulares (Koller & Goeddel 1992). Aunque ambos receptores se encuentran en el riñón y glándula adrenal, el RPN-A es más abundante en el endotelio de los grandes vasos sanguíneos, mientras que el RPN-B predomina en el cerebro, en concreto en la glándula pituitaria (Levin *et al.*, 1998). Tanto el ANP como el BNP se unen principalmente al receptor RPN-A que dimeriza y usa un ión cloruro para dar lugar a su conformación “abierta”. El receptor está unido a una cascada de señalización dependiente de guanosin monofosfato cíclico (GMP-c) que media la mayoría de sus actividades biológicas a través de una protein kinasa G o fosfodiesterasa (Kone 2001) (Fig. 9). Los ratones “*knockout*” con ausencia del receptor RPN-A muestran hipertensión, hipertrofia y dilatación cardiaca, y mueren antes de los 6 meses (Pandey *et al.*, 1999). La relativa baja afinidad del BNP por el receptor RPN-A con una potencia 10 veces menor que para el ANP, hace especular sobre la posibilidad de que otro receptor guanilato ciclasa juegue un papel importante (Goy *et al.*, 2001). Los testículos y glándula adrenal de ratones *knockout* para RPN-A muestran un respuesta de alta afinidad para BNP que sólo podría ser reforzada por la presencia de un nuevo receptor en estos tejidos que prefiere el BNP sobre el ANP. Aunque el significado fisiológico y los componentes bioquímicos de este receptor son desconocidos, su existencia refuerza que ANP y BNP realizan algunas acciones independientes.

Por otro lado, CNP no actúa a través de RPN-A sino que se une selectivamente al receptor guanilato ciclasa RPN-B. Como hemos dicho antes, este receptor es similar a RPN-A; sin embargo, es débilmente sensible a ANP y BNP (Kone 2001).

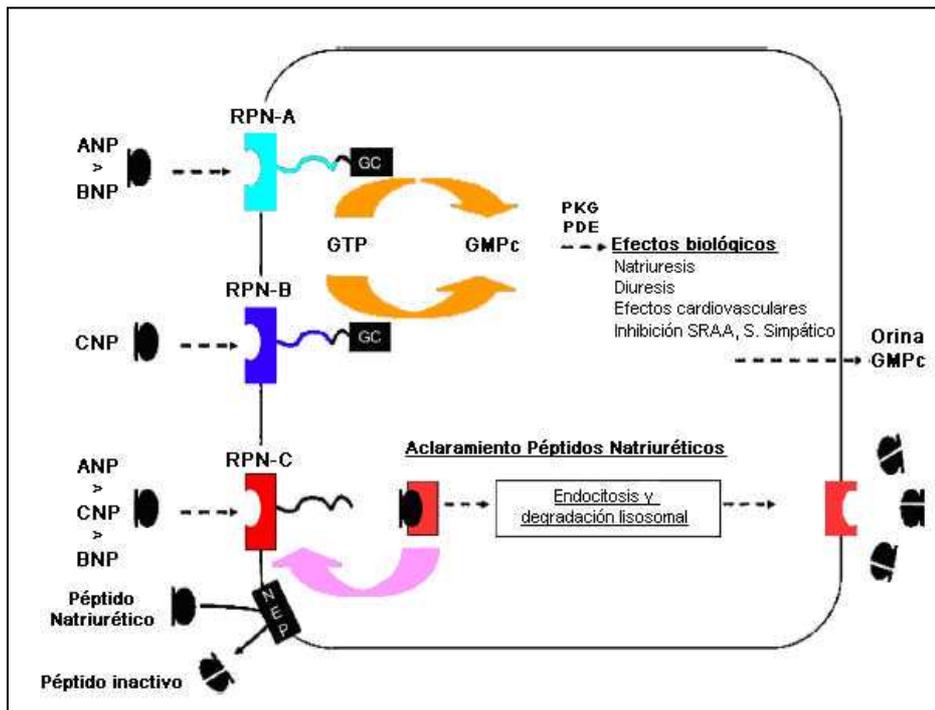


Figura 9. Acción de los péptidos natriuréticos en las células diana. ANP y BNP se unen principalmente al receptor RPN-A que está unido a una cascada de señalización dependiente de guanosin monofosfato cíclico (GMP-c) que media la mayoría de sus actividades biológicas a través de una protein kinasa G (PKG) o fosfodiesterasa (PDE). CNP se une al receptor RPN-B y los tres se unen al receptor de aclaramiento (RPN-C) o bien son degradados por la endopeptidasa (NEP). (Modificada de: Vanderhayden *et al.* *Eur J Heart Fail* 2004:261-68).

2.4.2. Receptores de aclaramiento

Aunque la síntesis y liberación de los péptidos natriuréticos es el mayor proceso en la regulación de su concentración plasmática, la eliminación de los péptidos de la circulación es también un proceso a considerar (Rademaker *et al.*, 1997). El aclaramiento de PN incluye dos procesos importantes: 1) degradación enzimática por endopeptidasas neutras (NEP); y 2) endocitosis vía el RPN-C (receptor de aclaramiento) seguida de degradación lisosomal (Nakao *et al.*, 1992). El aclaramiento renal juega un papel menor para las formas activas (C-terminal) de estos péptidos, mientras que para los fragmentos N-terminales (NT-proANP y NT-proBNP) diversos autores sugieren que es la principal vía



de aclaramiento (Vesely 2003). Se ha demostrado que el NT-proBNP muestra una buena correlación con el filtrado glomerular (GFR) y que sus niveles están influenciados por un empeoramiento de la función renal relacionada con la edad (Vesely 2003). Además estos fragmentos no se unen a los receptores RPN-C, ni son degradados por las NEP.

Las endopeptidasas neutras (NEP), son metaloenzimas ligadas a la membrana que contienen un átomo de zinc en su centro activo. Se encuentran ampliamente distribuidas en la superficie de las células endoteliales, células del músculo liso, cardiomiocitos, y fibroblastos, estando particularmente concentradas en las membranas de borde “en cepillo” del túbulo proximal del riñón (Charles *et al.*, 1996). Las NEP rompen los péptidos natriuréticos y abren su estructura en anillo, inactivándolos (Valli *et al.*, 1999).

En contraste al RPN-A y RPN-B, el RPN-C está desprovisto de actividad guanilato ciclasa y contiene un dominio citoplasmático de 37 aminoácidos que contiene un secuencia de activación proteína G. El RPN-C es más abundante y ampliamente expresado, y se localiza en diversos tejidos: endotelio vascular, músculo liso, corazón, glándula adrenal y riñón (Kone 2001). Trabajos previos han demostrado que en ratones *knockout* para RPN-C, este receptor sirve como un receptor de aclaramiento para ANP, BNP y CNP. Los tres PN se unen al receptor RPN-C con distinta afinidad, son internalizados y degradados enzimáticamente, y después el receptor es reciclado y vuelve a la superficie celular (Matsukawa *et al.*, 1999). La baja afinidad de RPN-C por BNP explicaría su vida media más larga (20 minutos) frente al ANP (3 minutos). Además, recientes estudios indican que el RPN-C altera la función de la célula diana a través de la inhibición de la actividad adenilato ciclasa de membrana por unión a la proteína G (Kone 2001).

La importancia de estos dos mecanismos en el aclaramiento es controvertida. Aunque diversos estudios en animales sanos demuestran que el bloqueo de RPN-C tiene un mayor efecto sobre el aclaramiento de ANP que la inhibición de las NEP; otros han demostrado que ambos mecanismos contribuyen por igual a la degradación de ANP y BNP en concentraciones fisiológicas (Charles *et al.*, 1996). Además, en estados crónicos de elevación endógena de los PN, como ocurre en la insuficiencia cardíaca crónica, estudios previos demuestran que el receptor de aclaramiento podría jugar un papel



menos importante que las NEP en el metabolismo de estos péptidos (Kishimoto *et al.*, 1993). Sin embargo, otros muestran que la resistencia a los efectos biológicos de los PN podría ser debido a una elevación de los receptores de aclaramiento (RPN-C) (Andreassi *et al.*, 2001).

2.5. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

2.5.1. Cardiovasculares

La intervención de los PN en el mantenimiento de la estabilidad circulatoria es muy importante ya que actúan como factores antihipertensivos y reductores del volumen plasmático (Charles *et al.*, 1993). La reducción de la presión sanguínea dependiente de PN ocurre, en parte, por una reducción en la precarga cardíaca causada por un cambio de fluido intravascular dentro del compartimiento extravascular, reflejando así una mayor permeabilidad del endotelio (Wijeyaratne & Moulton 1993, Vesely 2003). Sin embargo, la extravasación del fluido no es el único mecanismo que produce una reducción de la precarga. Los PN aumentan la capacitancia venosa, promoviendo la natriuresis que produce una reducción del volumen de fluido extracelular, resultados directos de los efectos de PN sobre el riñón y la supresión del eje renina-angiotensina-aldosterona (Hunt *et al.*, 1996).

Otra acción de los PN es la reducción del tono simpático en la vasculatura periférica (vasoconstricción), causado por una reducción de los barorreceptores (receptores de presión situados en el seno carotídeo y en el cayado aórtico que cuando aumenta la presión arterial envían un mayor número de impulsos nerviosos hasta el bulbo raquídeo), una supresión de la liberación de catecolaminas desde las terminaciones nerviosas, y especialmente, por la supresión del flujo simpático desde el sistema nervioso central (SNC). Finalmente, los péptidos natriuréticos disminuyen el umbral de activación vagal de manera que suprime el reflejo de taquicardia y vasoconstricción que acompañan la reducción en la precarga (Schultz *et al.*, 1988, Yang *et al.*, 1992).

El CNP actúa como regulador del tono vascular (vasorelajante) e inhibidor del crecimiento del músculo liso vascular, principalmente de forma paracrina, y también contribuye a la regulación del flujo coronario (Stingo *et al.*,



1992). La activación del CPN/RPN-C es importante para la regulación de la circulación coronaria y su activación también representa un mecanismo de protección contra el daño por reperfusión (Hobbs *et al.*, 2004).

2.5.2. Renales

Al nivel del riñón, los PN estimulan la natriuresis y diuresis. Tanto el ANP como el BNP ejercen sus efectos diuréticos sobre el riñón a nivel del glomérulo y sus efectos natriuréticos a nivel del tubo colector.

En el glomérulo, ANP y BNP causan dilatación de la arteriola aferente junto con vasoconstricción de la eferente, conduciendo a un aumento de presión intraglomerular que produce un mayor filtrado (Marin-Grez *et al.*, 1986). Estos péptidos también provocan un aumento en la acumulación de GMPc en las células mesangiales, causando su relajación y aumentando la superficie efectiva de filtración (Stockand & Sansom 1997). Sin embargo, los PN que no aumentan la filtración glomerular causan natriuresis, indicando que éstos tienen efectos directos sobre los túbulos, ya sea a través de la urodilatina, o respondiendo a la concentración de PN de la circulación general.

La natriuresis responde a diversos mecanismos regulados por los PN: 1) aumento de sodio en el túbulo colector de la médula renal a través de un descenso de la hipertonidad medular interna; 2) efecto inhibitorio de la captación de Na^+ ; y 3) estimulación de la secreción de Na^+ y Cl^- en el túbulo colector medular (Zeidel *et al.*, 1988, Light *et al.*, 1989, Zeidel 1995). El ANP y BNP también inhiben la inducción del transporte de sodio y agua en el túbulo flexuoso proximal por angiotensina II, el transporte de agua por el antagonismo de vasopresina en el túbulo colector, y las acciones de aldosterona en el túbulo distal (Dillingham & Anderson 1986, Harris *et al.*, 1987). Finalmente, inducen el aumento del aporte de sodio a la mácula densa inhibiendo la secreción de renina y angiotensina II. Por el contrario, el CNP tiene escasa o nula acción diurética, aunque inhibe la secreción de aldosterona, tiene un menor efecto sobre la presión arterial y secreción de sal y agua (Hunt *et al.*, 1994, Igaki *et al.*, 1996).



2.5.3. Sobre el sistema nervioso central

Los tres PN, particularmente el CNP, son producidos en el cerebro. Aunque el ANP y BNP séricos no cruzan la barrera hematoencefálica, alcanzan zonas en el sistema nervioso central (eminencia media, área postrema...). Las acciones que estos péptidos realizan refuerzan las acciones periféricas (Fig. 10).

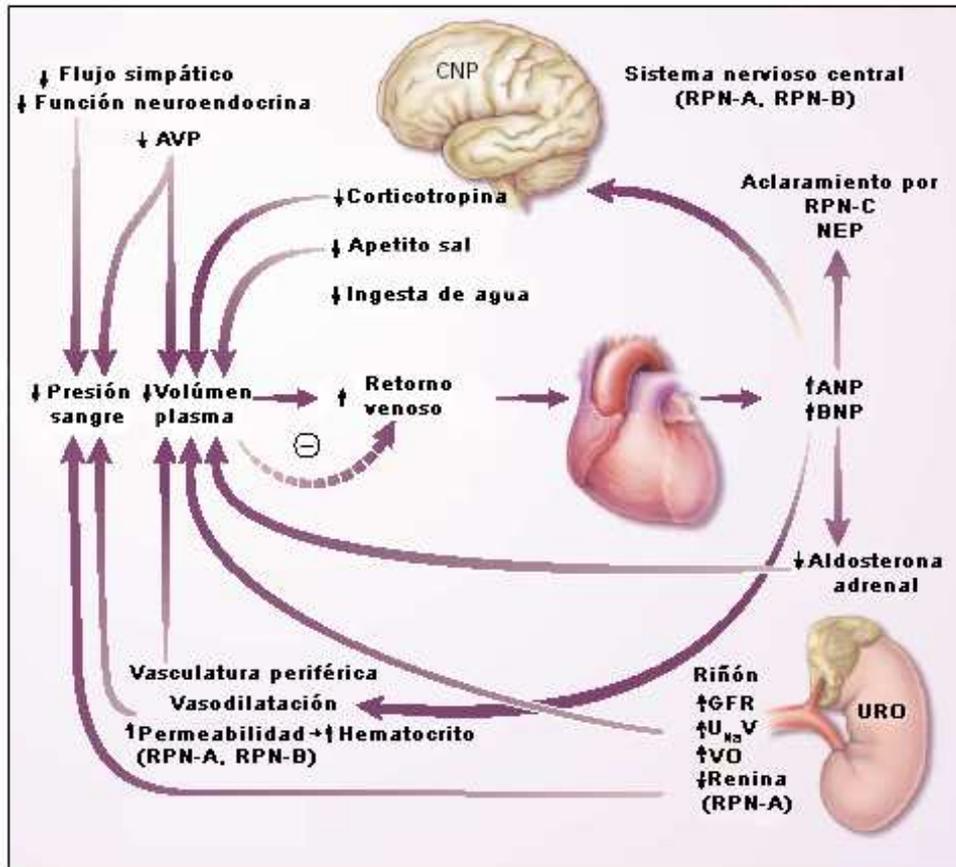


Figura 10. Efectos fisiológicos de los péptidos natriuréticos cardíacos cuando el retorno venoso está aumentado. El aumento de la secreción de los PN reduce la presión sanguínea y el volumen plasmático a través de acciones coordinadas entre la glándula adrenal, riñón y vasculatura. El menor signo que indique un descenso en el volumen plasmático conduce a un descenso en el retorno venoso, que a su vez disminuye la secreción de PN. Los receptores que median las distintas acciones están indicados entre paréntesis. ANP: péptido natriurético auricular; AVP: arginina-vasopresina; BNP: péptido natriurético cerebral; CNP: péptido natriurético tipo C; NEP: endopeptidasa neutra; URO: urodilatina; RPN-A, RPN-B y RPN-C: receptores péptidos natriuréticos tipo A, B y C; GFR: filtración glomerular; U_{Na}V: excreción urinaria de sodio; VO: volumen orina. (Modificada de: Levin et al., *N Engl J Med* 1998; 5:321-28).



Por ejemplo, los efectos natriuréticos periféricos son amplificados por la inhibición del apetito, por la sal o la ingesta de agua, que complementan los efectos diuréticos renales (Burrell *et al.*, 1991, Blackburn *et al.*, 1995). Además, los PN inhiben la secreción de vasopresina y corticotropina, que actúan directamente sobre el cerebro y la pituitaria (Samson 1992). Estas acciones implican efectos centrales y periféricos coordinados que conducen al control del fluido y homeostasis electrolítica. También de forma paradójica los PN actúan deteniendo el descenso del tono simpático (Schultz *et al.*, 1988, Yang *et al.*, 1992).

El mecanismo de acción de los PN en el cerebro se explicaría por la distribución de los subtipos de receptores. RPN-C está localizado en el SNC, pudiendo reflejar su efecto anti-crecimiento de la glia; RPN-A predomina en áreas adyacentes al tercer ventrículo, mediando los efectos de ANP sobre el apetito de la sal y la ingesta de agua; y, RPN-B predomina en el hipotálamo y en otras regiones rostrales, donde los péptidos inhiben la secreción de arginina-vasopresina y estimulan el tono simpático (Levin & Frank 1991, Langub *et al.*, 1995).

2.5.4. Sobre la proliferación celular

Cada PN tiene actividad antimitogénica tanto en el sistema cardiovascular como en otros sistemas. ANP y CNP inhiben la mitogénesis en cultivos de células vasculares y en arterias coronarias, principalmente a través de mecanismos que dependen de GMPc y del receptor RPN-A (Itoh *et al.*, 1990, Knowles *et al.*, 2001). Esto implica que los PN podrían modular el crecimiento de la pared vascular en patologías como aterosclerosis, hipertensión, o restenosis post-angioplastia.

El ANP y BNP inhiben el crecimiento de fibroblastos cardíacos *in vitro*, retardando la deposición de colágeno y el remodelado proliferativo del corazón (Tamura *et al.*, 2000); el ANP puede también inducir apoptosis de los cardiomiocitos. Así, a través de estas acciones directas e indirectas los PN limitan potencialmente la proliferación miocárdica o la hipertrofia al daño por isquemia, regulando localmente el remodelado ventricular (Kone 2001).



2.6. DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

2.6.1. Variabilidad analítica

Con excepción del precursor preproBNP, todos los PN son susceptibles de estar presentes en el plasma (Shimizu *et al.*, 2003). Dentro de los péptidos derivados de proBNP, existe una amplia heterogeneidad, tanto en sujetos sanos como en pacientes con IC, incluso ciertos autores sugieren que el proBNP y sus péptidos derivados, como el NT-proBNP, sufren un proceso de oligomerización que les lleva a desarrollar múltiples formas moleculares (Goetze 2004). Como consecuencia, algunos epitopos son susceptibles de estar más expuestos, dificultando el reconocimiento de otras partes de la molécula por anticuerpos usados en diferentes métodos. De acuerdo con la combinación empleada en el “sándwich”, los métodos podrían medir una o más moléculas plasmáticas dependiendo de la especificidad del ensayo.

Por lo general, existen dos tipos diferentes de ensayos. El primero son los inmunoensayos enzimáticos competitivos, que usan la técnica “sándwich” con un anticuerpo contra la estructura en anillo de la molécula y un segundo anticuerpo contra el extremo amino terminal del péptido, específico para la determinación de BNP; y existe un segundo grupo de ensayos, descritos posteriormente, que engloban métodos de determinación para proBNP y sus productos metabólicos, (BNP y NT-proBNP). Recientemente, surgen los inmunoensayos enzimáticos no competitivos, que usan anticuerpos policlonales y monoclonales, con una señal de detección isotópica, enzimática o fluorogénica, y antígenos para la calibración del sistema analítico, sintéticos o recombinantes (Panteghini & Clerico 2004, Collinson *et al.*, 2004). Estos métodos, totalmente automatizados, obtienen resultados en un corto periodo de tiempo y con mayor precisión analítica, mejorando la sensibilidad y la especificidad.

Los distintos métodos para la determinación de PN no muestran interferencias importantes (hemólisis, hiperbilirubinemia e hipertrigliceridemia), pero sí relacionadas con el tipo de muestra empleada y la estabilidad *in vitro*. Para la determinación de BNP, el plasma no debe ser recogido en tubos de cristal cuando se utiliza un método que emplea una combinación de anticuerpos contra los aminoácidos 90-97 y 103-107, ya que



esta combinación es susceptible al efecto de la calicreína, proteasa plasmática activada por contacto con la pared del tubo de cristal, que degrada la porción carboxi terminal del BNP (y proBNP) (Shimizu *et al.*, 2001). La estabilidad de la muestra se consigue usando tubos de plástico o muestras de EDTA plasmático con adición de inhibidores de proteasas plasmáticas que previenen la degradación de la molécula *in vitro*. Por el contrario, cuando medimos NT-proBNP mediante el método ECLIA, se recomienda recoger suero o muestras heparinizadas (Collinson *et al.*, 2004). La estabilidad *in vitro* no es un problema para NT-proBNP, mucho más estable que BNP, que presenta pequeñas variaciones en sus niveles 48 horas después de su extracción a temperatura ambiente y tras varios días a temperaturas bajas; sin depender del tipo de tubo de extracción, ni de los ciclos de congelación-descongelación previos a la determinación (Collinson *et al.*, 2004).

Las discrepancias entre los niveles obtenidos con diferentes métodos influyen en los valores de referencia y punto de corte, los cuales cambian de acuerdo al método empleado (Wu *et al.*, 2004, Clerico *et al.*, 2005, Emdin *et al.*, 2005). Por ello, es necesaria la estandarización, a través de la selección de materiales apropiados y de un procedimiento de medida de referencia, para obtener iguales resultados, incluso cuando las determinaciones se realizan con diferentes métodos.

2.6.2. Variabilidad fisiológica

Se ha demostrado recientemente que la mayor parte de la variabilidad de los resultados de NT-proBNP y BNP es debida a la variación fisiológica, mientras que la variación analítica es menor (Bruins *et al.*, 2004). El coeficiente de variación que refleja la media de la variación fisiológica (coeficiente de variación intraindividual, CV_i) en sujetos sanos y en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable tiene un rango según autores del 30% al 50% para BNP y del 10% al 35% para NT-proBNP (Melzi d'Eril *et al.*, 2003, Bruins *et al.*, 2004, Clerico *et al.*, 2006). Como consecuencia, esta variabilidad tan alta de los péptidos natriuréticos hace muy difícil el uso de valores de referencia.

Sin embargo, está ampliamente aceptado que la imprecisión analítica (CV_a) del ensayo no influye significativamente en su uso clínico mientras no sea superado el 50% del valor del CV_i (CV_a < 0,5x CV_i) (Fraser 2004). Debido a



la alta variabilidad fisiológica, el límite para la imprecisión analítica de los métodos podría ser menos rigurosa, una imprecisión (como coeficiente de variación) <15% podría ser aceptado. Por el contrario, se sugiere que las variaciones en las medidas de los PN tres veces el CVa del ensayo (3 X desviación estándar de la variabilidad del ensayo), deberían ser consideradas clínicamente relevantes, por lo que la imprecisión de los inmunoensayos de PN debería ser lo más pequeña posible (Clerico *et al.*, 2006).

Para alcanzar reducciones importantes en el CVi, sería necesario conocer mejor los determinantes que producen este aumento; así, es conocido que el ejercicio, la toma e infusión de líquidos afectan a las concentraciones de BNP y NT-proBNP (Lang *et al.*, 1993, Kjaer *et al.*, 2004, Heringlake *et al.*, 2004). Pero los efectos sobre los niveles de PN en un consumo típico diario son desconocidos. Varios estudios muestran que también los niveles de BNP, y en menor efecto los de NT-proBNP, aumentan a lo largo del día, alcanzando valores estables por la tarde (Bruins *et al.*, 2004). Estos cambios durante el día responderían al ritmo circadiano de los índices hemodinámicos, probablemente como consecuencia del aumento de presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca. Por todo ello, podría estar indicado en estas determinaciones una estandarización de la actividad física, la toma de fluidos y el tiempo de obtención de la muestra; aunque quizás estas medidas no reducirían lo suficiente la variación biológica.

Además, diversas características clínicas como edad y género influyen sobre los niveles plasmáticos de BNP y NT-proBNP tanto en personas sanas como en pacientes con insuficiencia cardíaca. Se produce un aumento en los niveles de PN al aumentar la edad, siendo más notable en las personas sanas, y en las mujeres (Wang *et al.*, 2002, Redfield *et al.*, 2002). Por otro lado, factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión y la obesidad parecen estar asociados con un aumento y una disminución, respectivamente, en los niveles plasmáticos de PN en pacientes con insuficiencia cardíaca y en personas sanas (Rivera *et al.*, 2004, Mehra *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004).

Por último, se ha demostrado que los péptidos BNP y NT-proBNP se encuentran en el torrente circulatorio como una mezcla de varios fragmentos (Ala-Kopsala *et al.*, 2004), y que la forma intacta de proBNP se encuentra en el plasma de pacientes con insuficiencia cardíaca (Hammerer-Lercher *et al.*,



2008). Por lo tanto, los ensayos comerciales detectarían tanto la mezcla de los analitos (BNP y NT-proBNP) fragmentados o no, así como el proBNP. Además, estudios recientes han demostrado que los péptidos natriuréticos son glicosilados en el torrente sanguíneo (Seferian et al., 2008, Hammerer-Lercher et al., 2008), produciendo interferencias en el reconocimiento de los epitopos de unión por los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos, así como alteraciones en el procesado de la molécula de proBNP (Semenov et al., 2009). Este hecho tendría una relevancia importante en el diagnóstico clínico, y resalta la importancia del uso de anticuerpos bien caracterizados para alcanzar el poder diagnóstico óptimo.

En resumen, a pesar de la variabilidad que presentan las concentraciones de los péptidos natriuréticos, los cambios en su concentración deberían ser considerados potencialmente relevantes en la clínica, incluso cuando estuviesen cerca de la variación biológica intraindividual; ya que reflejan cambios en la activación del sistema neuroendocrino como resultado de mecanismos patológicos específicos y/o intervenciones farmacológicas. En este sentido, el establecimiento en el tiempo de las concentraciones de PN podrían ser una herramienta diagnóstica útil y novedosa para el seguimiento de pacientes con enfermedades cardiacas.



3. PAPEL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

3.1 DIAGNÓSTICO

3.1.1 Insuficiencia cardiaca crónica

El concepto de que los péptidos natriuréticos (PN) pueden ser una herramienta útil para la evaluación de la enfermedad cardiaca en la clínica rutinaria ha sido estudiada en los últimos 20 años. Las herramientas para comprobar este concepto necesitan ser testadas en la práctica clínica para garantizar que los PN podrán igualar indudablemente a otras tecnologías cuyo uso está establecido.

La FDA (*Food and Drugs Administration*) ha aceptado como test de laboratorio para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca (IC) el uso de BNP (Noviembre 2000, <http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/1072.pdf>) y NT-proBNP (Noviembre 2002, <http://www.fda.gov/bbs/topics/answers/2002/ANSO1173.html>) en los Estados Unidos. También, las Guías para el Diagnóstico de IC de la *Sociedad Europea de Cardiología* han reconocido el valor potencial de los PN para el diagnóstico y manejo de la IC (Swedberg *et al.*, 2005; Dickstein *et al.*, 2008). Sin embargo, las Guías de la “*American Heart Association*” y del “*American College of Cardiology*” de los Estados Unidos consideran que el uso de los PN para el diagnóstico de IC aún debe ser investigado (Hunt *et al.*, 2005).

No existe todavía un acuerdo general en la definición del valor de “punto de corte” de los PN que podría identificar sujetos con IC, debido en parte a que dependen del método analítico utilizado (Wu *et al.*, 2004, Clerico *et al.*, 2005, Emdin *et al.*, 2005). Sin embargo, la Sociedad Europea de Cardiología en sus últimas Guías para el diagnóstico de IC, sugiere que valores de BNP < 100 pg/mL y de NT-proBNP < 400 pg/mL están asociados a una muy poca probable presencia de este síndrome, valores de BNP entre 100 – 400 pg/mL y de NT-proBNP entre 400 – 2000 pg/mL, tendrían un diagnóstico incierto de IC, y valores de BNP y NT-proBNP por encima de 400 y 2000 pg/mL, respectivamente, estarían asociados a una alta probabilidad de diagnóstico de este síndrome (Dickstein *et al.*, 2008).



Por otro lado, existen diferentes factores que influyen sobre los niveles de los BNP/NT-proBNP (edad, sexo, obesidad, enfermedad renal, hepática o pulmonar, así como diferentes tratamientos médicos) (Wang *et al.*, 2002, Redfield *et al.*, 2002, Mehra *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004) que contribuyen a una mayor variabilidad en pacientes con IC. También existe cierto solapamiento de valores de PN entre sujetos sanos y pacientes con insuficiencia cardíaca sintomática. Sin embargo, la correlación que muestran los niveles plasmáticos de BNP y NT-proBNP con valores elevados de la presión ventricular al final de la diástole (Tschöpe *et al.*, 2005), estrechamente relacionada con la disnea en la insuficiencia cardíaca, y su correlación con el estadio funcional del paciente (Maisel *et al.*, 2002), sugieren que estos péptidos son útiles como índices neurohormonales de la disfunción del ventrículo izquierdo y de la IC.

3.1.2 Insuficiencia cardíaca aguda

El papel diagnóstico de los ensayos de BNP o NT-proBNP en pacientes con signos y síntomas sospechosos de IC aguda, ha sido evaluado en numerosos estudios, casi todos ellos realizados en los servicios hospitalarios de urgencias.

En el estudio multicéntrico “*Breathing Not Properly*”, el ensayo de BNP fue el factor predictor más fuerte de disnea aguda de origen cardíaco, con una sensibilidad del 90%, especificidad del 76%, y una precisión del 83%, para un “valor de corte” de 100 pg/ml. El porcentaje de pacientes con un diagnóstico dudoso se redujo del 43% al 11% cuando se dispuso de valores de BNP (Maisel *et al.*, 2002).

Estudios posteriores demostraron que la concentración de NT-proBNP estaba elevada significativamente en pacientes con IC descompensada, e identificaban a pacientes con disfunción ventricular y enfermedad pulmonar concomitante; los “puntos de corte” para NT-proBNP fueron de 507 y 973 pg/ml, respectivamente (Lainchbury *et al.*, 2003, Bayés-Genís *et al.*, 2004). Resultados que estaban en concordancia con los obtenidos en el estudio “*ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department*” (PRIDE), donde los niveles de NT-proBNP fueron, en el diagnóstico final de IC, de mayor valor que la exploración clínica. Estos datos estaban



correlacionados con la gravedad de los síntomas, presentando un “punto de corte” para NT-proBNP de 300 pg/ml. Sin embargo, la combinación de NT-proBNP más el análisis clínico fue la herramienta más útil para el diagnóstico del paciente (Januzzi *et al.*, 2005).

Por último, un estudio prospectivo y randomizado reciente, amplía el papel del BNP en términos de coste-efectividad, al mejorar la eficacia en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con disnea aguda, y reducir significativamente el periodo de hospitalización y coste total del tratamiento (Mueller *et al.*, 2006a). Este hecho es similar al obtenido en el estudio “*Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial*” (REDHOT), que demuestra que la utilización del test BNP descendía en un 10% las hospitalizaciones “innecesarias” (Maisel *et al.*, 2004).

En conclusión, tanto BNP como NT-proBNP deben ser determinados para la exclusión de nuevos casos de IC aguda en pacientes evaluados en atención primaria, así como en el establecimiento de un diagnóstico diferencial de IC aguda en urgencias.

3.1.3 Disfunción ventricular

Varios estudios intentan correlacionar los niveles plasmáticos de BNP con la función del ventrículo izquierdo (VI). En general, el poder diagnóstico del test está relacionado con el descenso de la función ventricular y su prevalencia en estudios poblacionales.

Uno de los primeros trabajos que analizó el poder del test BNP plasmático para la identificación de disfunción sistólica del VI (DSVI), definida como fracción de eyección (FE) <30%, fue el del grupo de McDonagh en Glasgow (Reino Unido). Este estudio concluyó que en una población con una prevalencia de 3,2% de DSVI, el BNP era un marcador útil en la exclusión de disfunción con un valor predictivo negativo de 98%, para un punto de corte para BNP >18 pg/ml (McDonagh *et al.*, 1998). Un trabajo posterior, en el que la prevalencia de DSVI fue del 11%, definida como FE <45%, la medida de BNP permitió la identificación de pacientes sin disfunción, con un valor predictivo positivo de 96% (Yamamoto *et al.*, 2000). Posteriormente, el grupo de Maisel en la Universidad de California (Estados Unidos), con una definición de DSVI diferente (FE <50% o disfunción diastólica), aumentó la prevalencia



(47%) y obtuvo una elevada especificidad (98%) y sensibilidad (86%) para un “punto de corte” de BNP de 75 pg/ml (Maisel *et al.*, 2001).

Estudios más recientes han evidenciado que más de la mitad de los sujetos con DSVI o diastólica (DDVI) son asintomáticos. Un test sencillo y económico como es el ensayo de BNP, podría ser útil en la identificación de los sujetos que requieren exámenes más sofisticados (ecocardiografía). En el estudio Framingham, con más de 3.000 voluntarios, la medida de BNP no resultó útil en el “*screening*” de la población (área debajo la curva (AUC) de 0,56 – 0,85) debido a la baja prevalencia de la disfunción ventricular (FE <50%) (Vasan *et al.*, 2002). Estos datos fueron confirmados por otro estudio poblacional que obtuvo especificidades y sensibilidades “limitadas” (Redfield *et al.*, 2004). Mejores resultados obtuvieron el grupo de Bay y colaboradores (2003) que publicaron uno de los primeros trabajos con un amplio número de pacientes (3.236 sujetos hospitalizados y asintomáticos de IC), estableciendo la utilidad de NT-proBNP en la predicción de DSVI (FEVI <40%) con una sensibilidad del 73%, especificidad del 82% y un valor predictivo negativo del 98%, todo ello para un “punto de corte” NT-proBNP de 1.050 pg/ml. También el grupo de Nielsen de la Universidad de Glasgow (Reino Unido) obtuvieron, en un estudio prospectivo realizado con pacientes de alto riesgo (n=466), seleccionados en base a criterios clínicos (alta presión sanguínea y/o electrocardiograma normal), una reducción en el número de exámenes ecocardiográficos necesarios, de 17 a 12, para la identificación de disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (DSVI), gracias a los datos obtenidos con los niveles de BNP (Nielsen *et al.*, 2003).

Otros estudios han mostrado que no sólo el NT-proBNP y BNP estaban elevados en la ICC con DSVI, sino también en la ICC con disfunción diastólica, aunque los niveles de PN entre los pacientes con ICC no sistólica son típicamente más bajos que en aquellos con disfunción sistólica e ICC. Lubien y colaboradores de la Universidad de California (2002) , estudiaron el poder diagnóstico del BNP para la DDVI en una cohorte de pacientes con una prevalencia del 40%, y obtuvieron un AUC de 0,92, con buena especificidad (83%) y valor predictivo positivo (96%), para un “punto de corte” de 62 pg/ml de BNP. Un estudio más reciente mostró que los niveles de NT-proBNP aumentaban en pacientes sintomáticos con disfunción diastólica aislada y



correlacionaban con la gravedad de la disfunción; los autores obtuvieron un AUC de 0,83, similar a la definida para el Doppler tisular, con un “punto de corte” de 120 pg/ml. Este dato fue un factor predictivo independiente de la disfunción diastólica con una *odds-ratio* de 1,2 por cada unidad de aumento de NT-proBNP (Tschöpe *et al.*, 2005).

En conclusión, diferentes estudios muestran que la concentración de ambos péptidos, BNP y NT-proBNP, está asociada con una función ventricular anormal. Además, estudios cuya prevalencia del punto de corte para la disfunción ventricular en la cohorte es baja (5% al 10%) muestran un buen valor predictivo negativo (“exclusión de DVI”) para ambos péptidos. Sin embargo, cuando la prevalencia es mayor (40% al 60%), el valor predictivo positivo (“inclusión DVI”) mejora a expensas de empeorar el valor negativo. Estos hallazgos prospectivos deberían ser confirmados en estudios posteriores, antes de recomendar la utilización de los péptidos natriuréticos en el “*screening*” poblacional.

3.2 PRONÓSTICO

Con un porcentaje de mortalidad del 50% en cinco años y un 90% en 10 años para pacientes con insuficiencia cardíaca, encontrar un marcador que correlacione bien con el pronóstico sería de gran ayuda para la estratificación del riesgo. Muchos estudios están mostrando que los niveles plasmáticos de BNP y NT-proBNP son altamente predictivos para los eventos de origen cardíaco.

Cheng y col. encontraron, en un grupo de 72 pacientes ingresados por IC descompensada, que los pacientes que tuvieron un evento (muerte o readmisión) aumentaban sus niveles de BNP durante el periodo de hospitalización (1 mes), mientras que los pacientes sin eventos tuvieron una disminución en la concentración plasmática de este péptido (Cheng *et al.*, 2001). En un estudio de 325 pacientes que presentaban disnea en urgencias, los que tenían niveles de BNP mayores de 480 pg/ml tuvieron una probabilidad acumulada del 51% de muerte (cardíaca o no cardíaca), de ingreso hospitalario (cardíaco), o de repetidas visitas a urgencias en los 6 meses siguientes. En



contraste, sólo el 2,5% de los pacientes con menos de 230 pg/ml sufrieron uno de esos eventos (Harrison *et al.*, 2002).

En el contexto de un estudio clínico internacional como el “*Valsartan Heart Failure Trial*” (Val-HeFT), en una población relativamente seleccionada de 4.300 pacientes con IC (FE \leq 40%), una concentración de BNP $>$ 97 pg/ml tuvo un valor pronóstico significativo (*hazard ratio* de 2,2) en términos de mortalidad y morbilidad cuando fue añadido al modelo que incluía variables clínicas, demográficas y ecocardiográficas (Anand *et al.*, 2003). Recientemente, investigadores del estudio “*Framingham*”, después de ajustar por los factores de riesgo tradicionales en personas asintomáticas de mediana edad (aproximadamente 59 años) en un seguimiento de 5 años, encontraron que el nivel de BNP fue un factor predictivo independiente del riesgo de muerte, insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular, e ictus cerebral (Wang *et al.*, 2004b). Este hallazgo sugiere que, en una cohorte basada en población asintomática, hay datos pronósticos importantes incluso si el rango de BNP está por debajo de 100 pg/ml, el nivel usado en la exclusión de insuficiencia cardíaca en el 90% de pacientes con disnea aguda. Sin embargo, no hay todavía suficientes datos para constatar que medidas repetidas de BNP en un paciente de forma individual tenga un valor pronóstico mayor que una medida única de este péptido (Bettencourt *et al.*, 2004). Un estudio reciente realizado en 48.629 pacientes obtenidos del registro ADHERE (“*Acute Decompensated Heart Failure National Registry*”), muestra que niveles elevados de BNP en el momento del ingreso son un factor predictivo de la mortalidad hospitalaria en la insuficiencia cardíaca aguda (Fonarow *et al.*, 2007).

En cuanto al papel pronóstico de los niveles plasmáticos de NT-proBNP el grupo de Fisher y colaboradores (2003) midieron la concentración de este péptido en 87 pacientes ingresados en urgencias con insuficiencia cardíaca causada por disfunción ventricular sistólica y encontraron que NT-proBNP era un fuerte predictor de muerte y hospitalización por IC (*odds ratio* de 4,15). En un estudio con un seguimiento más amplio con 672 pacientes ambulatorios asintomáticos, el NT-proBNP fue el mayor predictor independiente de mortalidad (*hazard ratio* de 5,7, $p < 0,0001$), ingresos hospitalarios por IC (*hazard ratio* de 13,83, $p < 0,0001$), y otros ingresos de origen cardíaco (Groening *et al.*, 2004). El grupo de Gardner (Unidad de



Trasplante Cardiopulmonar, *Glasgow Royal Infirmary*) en 2003, estudió a 142 pacientes con IC avanzada bajo consideración de trasplante, encontrando que una única medida de NT-proBNP plasmático (mayor de 1.490 pg/ml) fue un factor predictivo de muerte o trasplante urgente, con una *odds-ratio* de 6,8. Por último, resultados obtenidos en el estudio “*Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival*” (COPERNICUS) en 1.011 pacientes con insuficiencia cardíaca severa, demostraron que los valores de NT-proBNP en plasma fueron un factor predictivo para toda causa de mortalidad (*hazard ratio* de 2,7) y de muerte más hospitalización por IC (*hazard ratio* de 2,4) para una concentración de NT-proBNP por encima de 1.767 pg/ml (Hartmann *et al.*, 2004). Resultados similares han sido recientemente descritos en el estudio “*The Prospective Randomized Amlodipino Survival Evaluation 2*” (PRAISE-2), donde Staton y colaboradores (2005), encontraron que NT-proANP, BNP y NT-proBNP fueron factores predictivos de mortalidad a corto plazo (1 año) en 173 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. El grupo de Januzzi y col (2006) observaron que niveles de NT-proBNP por encima de 5.180 pg/mL son útiles para evaluar el pronóstico a corto plazo (76 días) en pacientes disneicos con insuficiencia cardíaca aguda

Por último, en los últimos años numerosos artículos han evaluado la capacidad pronóstica del porcentaje de cambio de los péptidos natriuréticos (BNP y NT-proBNP), mostrando que ambas moléculas predicen la mortalidad y eventos cardiovasculares en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada o descompensada (Morrow *et al.*, 2005, Gardner *et al.*, 2007, Pascual-Figal *et al.*, 2008).

Todos estos interesantes trabajos han llevado al concepto de que la medida de NT-proBNP podría ser el nuevo “estándar de oro” para predecir el desenlace a largo tiempo de pacientes con IC.

3.3. MONITORIZACIÓN DEL TRATAMIENTO

Varios autores han sugerido que la monitorización de BNP podría ayudar y guiar a los cardiólogos en la evaluación de la eficacia y optimización de la terapia en la insuficiencia cardíaca (IC). Sin embargo, sólo existen estudios preliminares (con un número limitado de pacientes) que evalúen esta hipótesis.



En un primer estudio, 20 pacientes escogidos al azar diagnosticados con IC leve o moderada, fueron divididos en 2 grupos: A) bajo tratamiento con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), cuya dosis se controló mediante sucesivas medidas de la concentración plasmática de BNP; y B) bajo tratamiento empírico óptimo con un IECA (grupo clínico), durante 8 semanas (Murdoch *et al.*, 1999). Sólo en el grupo de pacientes donde la terapia fue guiada con BNP se consiguió una caída de la frecuencia cardiaca, un aumento en los niveles de renina y una reducción significativa de la concentración circulante de este péptido. En un segundo trabajo, Troughton y colaboradores (2000), estudiaron 69 pacientes con disfunción sistólica e insuficiencia cardiaca sintomática que fueron tratados siguiendo un protocolo secuencial que consistía en un IECA más otra droga, y fueron asignados a un seguimiento clínico con o sin conocimiento de la concentración de NT-proBNP. En el grupo de pacientes monitorizados con NT-proBNP, los eventos cardiovasculares descendieron un 65% durante un seguimiento de 9,5 meses. Un estudio más reciente (Al-Mesimani *et al.*, 2007) con 149 pacientes ingresados con insuficiencia cardiaca durante un periodo de 19 meses, y después de 3 meses bajo tratamiento, demostró que los niveles de NT-proBNP descendieron acompañados de una mejora en los parámetros ecocardiográficos y también en los síntomas. Por último, una revisión hecha por varios autores sobre el papel de NT-proBNP en la monitorización y guía terapéutica de pacientes con IC no ingresados, concluye que los niveles del péptido disminuyen en respuesta a la adición de fármacos con beneficio probado en la IC, y por ello un terapia que conduzca a un descenso de NT-proBNP facilitaría el uso óptimo de estos fármacos con una reducción de los eventos clínicos adversos (Troughton & Richards 2008).

Sin embargo, a pesar de la evidencia publicada hasta ahora, algunos aspectos del papel de los test BNP o NT-proBNP en la monitorización del tratamiento en pacientes con IC tienen que ser aclarados, como el efecto de diferentes tratamientos cardiacos sobre sus niveles. Los betabloqueantes (una terapia de uso establecido en pacientes con IC) ejercen efectos ambiguos sobre los PN (descenso, neutralidad o incluso aumento) debidos posiblemente a la duración del tratamiento (incremento rápido en el momento de la introducción del medicamento seguido de un progresivo descenso), pero también debido a



la selectividad farmacológica de los diferentes componentes (Baran *et al.*, 2000, RESOLVD 2000, Richards *et al.*, 2002, Yoshizawa *et al.*, 2004). También hay que tener en cuenta el descenso de los niveles de péptidos natriuréticos que producen los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS). El estudio ValHeFT mostró que pacientes que tomaban valsartán tuvieron un descenso significativo en la concentración sérica de BNP (Latini *et al.*, 2002).

Por otra parte, los valores de BNP o NT-proBNP podrían reflejar una respuesta terapéutica en una población de pacientes parcialmente homogénea, y ser usados como referencia en estudios clínicos, teniendo en cuenta un tiempo de seguimiento determinado. En un estudio reciente, Wu & Smith (2004) aplicaron los conceptos de variabilidad biológica a sucesivas medidas de BNP y NT-proBNP en pacientes con IC y encontraron que una monitorización diaria de estos péptidos para vigilar el tratamiento no estaba indicado, ya que la visualización de los cambios en los niveles de PN requería muchos días. En otras palabras, cuando monitorizamos el tratamiento a un paciente con insuficiencia cardíaca, las diferencias en los niveles de PN a lo largo del tiempo podrían ser consideradas relevantes si estos excediesen la gran variabilidad (analítica y biológica) que caracteriza a estos marcadores.

Por último, además de la guía terapéutica con agentes tales como IECA, betabloqueantes o ARA II, el uso de NT-proBNP podría ser de interés el seguimiento del tratamiento de ICC con “*nesiritide*”, un análogo sintético de BNP con efectos vasodilatadores, diuréticos y natriuréticos. La eficacia del “*nesiritide*” en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda ha sido aprobado (Colucci *et al.*, 2000, Elkayam *et al.*, 2004). Sin embargo, “*nesiritide*” es un 100% análogo al BNP endógeno, por lo que en su uso altera la medida de los niveles de BNP haciendo que el seguimiento de la terapia con este marcador sea inútil. Por otro lado, la medida de NT-proBNP no está afectada por esta molécula con lo que, en situaciones de tratamiento con “*nesiritide*”, NT-proBNP es más útil en la monitorización de la insuficiencia cardíaca.

En resumen, la medida de BNP y NT-proBNP es claramente útil en el diagnóstico y pronóstico de la IC, y podría ser también útil en la monitorización del tratamiento para así disminuir el riesgo potencial en los pacientes. Sin embargo, estos hallazgos necesitan ser confirmados por estudios clínicos randomizados con un mayor número de pacientes.



3.4. BENEFICIO EN EL COSTE HOSPITALARIO

Los péptidos natriuréticos están recomendados para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca, como hemos mostrado en el apartado 3.1 de esta tesis doctoral. Sin embargo, queda todavía pendiente si el uso de estos péptidos mejora la relación entre coste-efectividad en este síndrome.

Existen diversos estudios que analizan esta cuestión concluyendo que el uso de la determinación de BNP y NT-proBNP está asociada con una disminución en el coste hospitalario sin un peor pronóstico a corto plazo. Nielsen y colaboradores (2004) analizaron retrospectivamente la relación coste – efectividad del uso de los niveles plasmáticos de BNP en el diagnóstico de disfunción ventricular izquierda en una población general. Obteniendo una reducción del 26% del coste (1.243\$ frente a 1.681\$) cuando se hacía una selección previa a la realización de un ecocardiograma en el grupo con alto riesgo de disfunción ventricular en base a los niveles plasmáticos de BNP, que realizando un ecocardiograma a todos los pacientes. Los investigadores del estudio *B-Type Natriuretic peptide for Acute Shortness of Breath Evaluation* (BASEL) mostraron que la introducción del análisis de BNP en pacientes con disnea aguda que se presentaron en la Unidad de Urgencias estuvo asociado con una reducción estimada en el coste medio por paciente de 1.854\$ (Mueller *et al.*, 2004, Mueller *et al.*, 2006b). Posteriormente, en el estudio *Improved Management of Patients with Congestive Heart Failure* (IMPROVE-CHF) se demostró una reducción media de los costes, a 60 días, de 949\$, incluyendo visitas al Servicio de Urgencias, hospitalizaciones, visitas a consultas externas; sin embargo, no se obtuvo una reducción significativa en los costes medios entre la primera visita al Servicio de Urgencias y la primera hospitalización entre el grupo que tomó como referencia la medida de NT-proBNP en plasma y el grupo sometido a los procedimientos habituales (Moe *et al.*, 2007). También, el grupo de Ng y colaboradores (2005) analizaron el beneficio del uso del análisis de NT-proBNP en orina para la detección de la disfunción ventricular, concluyendo que la mejor estrategia para coste-efectividad era la realización de la medida secuencial de NT-proBNP en orina y suero; midiendo primero la concentración en orina de este péptido para excluir la disfunción ventricular y después, someter a los pacientes que dieron positivo a una medida en suero de NT-proBNP. Esta secuencia minimizaría el número de ensayos necesarios



alcanzando especificidad, valores predictivos positivos y negativos similares, y también reduciría el número de ecocardiogramas para detectar un caso de disfunción ventricular izquierda. Por último, un estudio realizado por Rutten y colaboradores (2008) en el Servicio de Urgencias, ha mostrado una tendencia a la reducción de costes, relacionados con los ingresos y las pruebas diagnósticas previas, de 1.364\$, con un pronóstico para la mortalidad a 30 días similar entre el grupo seguido mediante medidas de NT-proBNP y el grupo control.

Estos estudios muestran como la determinación de péptidos natriuréticos pueden ser un método previo a la ecocardiografía que produce una reducción de costes en el “*screening*” de estos pacientes, incluso utilizando valores bajos de corte para el diagnóstico que conllevan un alto número de falsos positivos. También habría que tener en cuenta que este tipo de estudios dependen mucho del precio del ensayo de BNP o NT-proBNP y de la realización del ecocardiograma, pudiendo variar considerablemente entre países, unidades y sistemas de sanidad.

3.5. SÍNDROME CARDIORRENAL

Debido al mejor tratamiento de los pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) se ha logrado mejorar su pronóstico; sobreviven pacientes más graves, de más edad y que padecen frecuentemente enfermedades concomitantes. Por ello, no es sorprendente que en un mismo paciente coexista el fallo cardiaco y la disfunción renal, puesto que ambas patologías comparten factores de riesgo comunes. Aproximadamente un tercio de la mitad de los pacientes con IC desarrolla disfunción renal definida por la *National Kidney Foundation*, como una tasa de filtrado glomerular renal (FGR) menor de $60 \text{ mL min}^{-1} \cdot (1,73 \text{ m}^2)^{-1}$ (Vanholder *et al.*, 2005).

La disfunción cardiaca asociada al empeoramiento hemodinámico ocasiona activación de mecanismos compensadores en órganos sistémicos desempeñando el riñón un papel central, ya que regula la homeostasis de electrolitos y el volumen intravascular. La retención de sodio y agua por el riñón puede deteriorar aún más la función cardiaca debido a un incremento de la precarga y poscarga, dando lugar a un “círculo vicioso” que lleva a que la disfunción renal y cardíaca combinadas amplifiquen la progresión del fallo de



cada órgano individual (Bongartz *et al.*, 2005). Esto toma importancia durante el tratamiento de la IC, circunstancia en la que se debe minimizar o evitar el deterioro de la función renal. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente podríamos definir el “*Síndrome Cardiorrenal*” como *la presencia de fallo cardíaco y renal concomitante, con sobrecarga de volumen y resistencia a las diferentes terapias estándares para esta patología, con mayor exacerbación de los síntomas* (Sultán & Osso 2006).

La disfunción renal es altamente prevalente y es un predictor de eventos adversos en pacientes con IC (Vanholder *et al.*, 2005, Bardaji & Martínez-Vea 2008). Los desórdenes del ventrículo izquierdo, tales como la hipertrofia, dilatación y disfunción sistólica, están bien establecidos en la insuficiencia renal y están asociados con un aumento de la morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Hillege y col en el año 2000 demostraron que la disfunción renal es un buen predictor a corto plazo de todo tipo de mortalidad en pacientes con IC con clase funcional moderada (NYHA II). Otro estudio realizado por el grupo de Van Biesen muestra que la insuficiencia renal moderada es un factor de riesgo para la mortalidad cardiovascular en un seguimiento a 10 años en una población de sujetos sanos (Van Biesen *et al.*, 2007). Sin embargo, un trabajo reciente de Gardner y colaboradores revela que el FGR estimado mediante el método MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) (Levey *et al.*, 1999) no predice la mortalidad en pacientes con IC avanzada referidos a trasplante (Gardner *et al.*, 2007).

La función renal estaba definida de acuerdo al aclaramiento de la creatinina, sin embargo, el establecimiento de la función renal ha mejorado recientemente con el uso de la estimación del filtrado glomerular renal (eFGR) como establece la *National Kidney Foundation*, ya sea calculado mediante la fórmula de Cockcroft y Gault en 1976 o por la fórmula de MDRD.

Los niveles séricos de BNP y NT-proBNP dependen de la función renal, a través de su metabolismo y excreción (Martínez-Rumayor *et al.*, 2008; Goetze *et al.*, 2006). Como consecuencia, su concentración podría estar aumentada por una sobrecarga de volumen a causa de un aumento del volumen intravascular y/o una reducción de la aclaramiento renal en ausencia de cualquier disfunción cardíaca. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la concentración de los péptidos natriuréticos en pacientes con insuficiencia renal irían paralelos a la presencia y gravedad de las anormalidades cardíacas y



podrían ofrecer también una información pronóstica importante (Carr *et al.*, 2005, Defilippi *et al.*, 2005).

Varios estudios han investigado el impacto de la disfunción renal sobre los niveles de BNP y NT-proBNP en suero. Las concentraciones medias de estos péptidos natriuréticos aumentan progresivamente con la disfunción renal, estimada como FGR, y existe una relación inversa entre la función renal y estos péptidos natriuréticos; este hecho ha sido observado en pacientes que presentan disnea en el servicio de urgencias (McCullough *et al.*, 2003, Anwaruddin *et al.*, 2006, Defilippi *et al.*, 2007), y en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda o congestiva (Lamb *et al.*, 2006, Tsutamoto *et al.*, 2006, Van Kimmenade *et al.*, 2006). Además, se ha visto que las concentraciones de estos péptidos cardíacos en suero son predictores de insuficiencia cardíaca descompensada y proveen información pronóstica adicional tanto en pacientes con función renal normal o deprimida (McCullough *et al.*, 2003, Defilippi *et al.*, 2007, Pimenta *et al.*, 2007).

En resumen, la disfunción renal juega un papel importante en la evolución clínica y pronóstico de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca. Por otra parte, la concentración sérica de péptidos natriuréticos está influenciada por la función renal, pudiendo alterar el poder diagnóstico y pronóstico de estas moléculas en pacientes con *síndrome cardiorenal*.

3.6. TRASPLANTE CARDIACO

El trasplante cardíaco es una opción importante para aquellos pacientes con insuficiencia cardíaca grave cuya enfermedad no responde al tratamiento. Sin embargo, este trasplante no está exento de riesgo, con una mortalidad en el primer año del 19%, y con gran dificultad para la identificación de pacientes con alto riesgo de mortalidad.

Estudios recientes muestran como un aumento de los niveles de BNP o NT-proBNP están asociados con baja supervivencia en todos los estadios de insuficiencia cardíaca. El grupo de Cardiología del Hospital Universitario de La Fe (2006) vieron que los niveles de BNP eran ligeramente mayores en pacientes transplantados con un grado de rechazo mayor (Hervás *et al.*, 2004).



Resultados similares para NT-proBNP obtuvieron posteriormente Cuppoletti y colaboradores (2005) donde niveles más elevados del péptido estuvieron correlacionados con un mayor número de complicaciones post-trasplante, siendo el rechazo agudo la causa más frecuente; sin embargo, la medida de NT-proBNP no fue un marcador para la detección de rechazo agudo.

Por otro lado, el grupo de Mehra en Nueva Orleans (2004), ha demostrado que el BNP es un factor predictor independiente de supervivencia después de un trasplante cardíaco, en un periodo de tiempo largo (media 5 años). La supervivencia alcanzó el 95% asociada a valores bajos de BNP (<250 pg/ml). Otros estudios, muestran que una única medida de NT-proBNP una semana después del trasplante cardíaco puede ayudar a identificar a los pacientes con alto riesgo de morir ya que estos pacientes se caracterizan por concentraciones elevadas de NT-proBNP de manera persistente (Gardner *et al.*, 2006), así como los valores de BNP determinados en una única o en dos medidas dentro del primer año después del trasplante cardíaco podrían ayudar a distinguir un grupo de pacientes con alto riesgo de sufrir complicaciones a largo plazo (Martínez-Dolz *et al.*, 2007, Martínez-Dolz *et al.*, 2008).

En conclusión, la razón por la que la concentración de NT-proBNP debe ser predictor de mortalidad en esta población es incierta, sobretodo dado la heterogeneidad en las causas que la producen. Sin embargo, existen evidencias previas que asocian un valor alto de BNP/NT-proBNP con una peor supervivencia, y aunque la posibilidad de usar un test sencillo en sangre que pudiese determinar el pronóstico de estos pacientes es muy atractiva, se necesitan nuevos estudios, con un mayor número de pacientes, que definan exactamente el papel de estos péptidos en el trasplante cardíaco.





II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

“Es bastante evidente que el corazón es una parte de los vasos y su origen; y por esto está bien situado por su estructura. Su parte central se constituye de una sustancia densa y hueca, y además está lleno de sangre, como si los vasos tomaran desde allí su origen.... La sangre converge dentro de los vasos desde el corazón, pero no pasa dentro del corazón desde fuera. Por ello él mismo constituye el origen y la fuente... Pero considerando que como los principales vasos sanguíneos son dos, llamados vaso mayor y la aorta, cada uno de los cuales es origen de otros vasos; y además, puesto que como esos dos vasos presentan diferencias, cuando comparamos el uno con el otro es de esperar que tendrán por sí mismos distintos orígenes. Esta suposición se mantiene ya que cada lado tiene su propia sangre, y la sangre de un lado se mantiene separada de la del otro lado. Por esta razón el corazón, siempre que sea posible, tiene dos receptáculos”

Descripción del corazón

De partibus animalium (De las partes de los animales) 350 a.C

Aristóteles (384-347; a.C



La insuficiencia cardíaca (IC) es el resultado no sólo de una sobrecarga hemodinámica o daño miocárdico, sino también de una compleja interacción entre cambios genéticos, neurohormonales, inflamatorios, y bioquímicos que actúan sobre los cardiomiocitos y sobre su entorno, intersticio cardíaco. Como consecuencia a todos estos mecanismos, el paciente con IC tiene niveles elevados de enzimas, hormonas, citocinas y otros marcadores de estrés y disfunción cardíaca (colectivamente llamados *biomarcadores*), que podrían encontrarse en condiciones elevadas, tanto en sangre como en orina, y tener una importancia clínica relevante. Una familia de *biomarcadores* son los péptidos natriuréticos cuya síntesis está influenciada por los cambios hemodinámicos debidos a sobrecargas de volumen en el corazón, que conducen a un alargamiento del ventrículo y a un aumento del estrés de pared ventricular, procesos que ocurren en la insuficiencia cardíaca. Además, sus niveles podrían estar alterados en la disfunción renal, enfermedad muy prevalente en pacientes con insuficiencia cardíaca (“síndrome cardiorrenal”), como consecuencia lógica al aumento del volumen intravascular.

Por todo ello, nuestra hipótesis de trabajo es que los péptidos natriuréticos, en concreto la concentración de péptido natriurético tipo B (BNP) y su fragmento N-terminal (NT-proBNP), podrían guardar relación con parámetros ecocardiográficos que cuantifican el grado de disfunción ventricular, así como con otras neurohormonas implicadas en el proceso de remodelado cardíaco. Además, estas moléculas podrían estar influenciadas por factores de riesgo cardiovascular como, la obesidad. También nos planteamos verificar si sus niveles séricos y urinarios, podrían servir como “marcadores” de la situación clínica, mejorando el diagnóstico y el pronóstico, así como ser de utilidad para la monitorización de la evolución de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca. Por último, nos planteamos investigar si la expresión tisular de péptidos natriuréticos (proBNP, BNP y NT-proBNP), en corazones con este síndrome, guarda relación con la etiología de la insuficiencia cardíaca.



Analizando prospectivamente una cohorte de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca y un grupo de sujetos sometidos a trasplante cardíaco, se pretende confirmar la hipótesis de esta tesis doctoral mediante los siguientes objetivos:

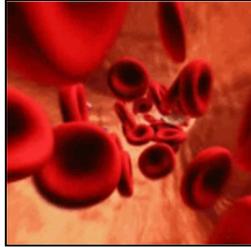
1. Determinar la relación entre la velocidad máxima de relajación (RVm) y las áreas telediastólica (ATD) y telesistólica (ATS) del ventrículo izquierdo y sus índices derivados, con la concentración sérica de NT-proBNP.
2. Estudiar la relación entre la concentración sérica de NT-proBNP y los niveles plasmáticos de *big* ET-1 y aldosterona, neurohormonas implicadas en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca.
3. Comparar los niveles séricos de NT-proBNP entre pacientes obesos y no obesos con insuficiencia cardíaca de origen isquémico o dilatado, y establecer la influencia del factor obesidad sobre los niveles del péptido.
4. Analizar la presencia de NT-proBNP en orina, relacionar sus niveles urinarios con los encontrados en suero, e investigar su potencial en el diagnóstico y pronóstico de este síndrome.
5. Comparar los niveles de BNP en orina de sujetos sanos con los de pacientes con insuficiencia cardíaca, y establecer su valor diagnóstico y pronóstico para eventos y mortalidad de origen cardiovascular.
6. Correlacionar distintos parámetros de función ventricular con la concentración de BNP en orina, comparar sus niveles según la disfunción ventricular sistólica, y analizar su valor diagnóstico para una fracción de eyección (FE) disminuida.
7. Estudiar la relación entre los niveles urinarios de NT-proBNP y BNP con el filtrado glomerular renal (eFGR), e investigar el valor diagnóstico y pronóstico de ambos péptidos en relación con la función renal.
8. Analizar simultáneamente, la variabilidad de los niveles de NT-proBNP en suero y orina durante un seguimiento a 24 meses, en pacientes



diagnosticados de insuficiencia cardiaca, clínica y funcionalmente estables.

9. Determinar los niveles de proBNP, BNP y NT-proBNP en corazones con insuficiencia cardiaca comparándolos con corazones humanos control, analizar si existe correlación entre las tres formas moleculares, y la influencia de la etiología de este síndrome sobre su expresión.





III. MATERIAL Y MÉTODOS

“Si tu matases un animal cortando a lo largo de un número de sus arterias principales, encontrarías que las venas pasarían a estar vacías junto con las arterias: ahora, esto nunca podría ocurrir si no hubiese anastomosis entre ellas. De igual manera, también, en el mismo corazón, la porción más fina de la sangre es vertida desde el ventrículo derecho hasta el izquierdo, a causa de unas perforaciones en el septo interventricular... Y en segundo lugar, el hecho de que la inserción de la vena cava en el corazón es más grande que la vena que es insertada dentro de los pulmones, sugiere que no toda la sangre que la vena cava aporta al corazón es conducida en sentido contrario desde el corazón a los pulmones.... Además, de los dos vasos conectados con el ventrículo izquierdo, el que aporta “pneuma” dentro de él desde los pulmones es mucho más pequeño que la gran arteria desde la cual se originan las arterias de todas partes del cuerpo; esto sugiere que no toma pneuma meramente de los pulmones, sino que también toma sangre desde el ventrículo derecho a través de las anastomosis mencionadas”.

*Descripción de la circulación
“De Usu Partium” (El Uso de las Partes)
Galeno hacia 129-199 d.C*



1. ESTUDIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

1.1. GRUPOS CLÍNICOS

Se estudiaron 114 pacientes no ingresados (81 varones y 33 mujeres, con edad media 64 ± 13 años), recogidos de forma consecutiva en las consultas externas de cardiología de 6 hospitales de la Comunidad Valenciana: Hospital General Universitario de Elche, Hospital General de Alicante, Hospital Universitario San Juan de Alicante, Hospital General de Valencia, Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia y Hospital Universitario La Fe de Valencia. Todos los pacientes estaban diagnosticados de insuficiencia cardiaca según los criterios de la “*European Society of Cardiology*” y “*American Heart Association*” del 2005, ya que los pacientes fueron reclutados durante este periodo de tiempo: historia clínica, análisis bioquímico (electrolitos, creatinina, glucosa, enzimas hepáticas y miocárdicas) y hematológico (hemoglobina, leucocitos y plaquetas), electrocardiograma, prueba de esfuerzo (protocolo de Naughton modificado), radiografía de tórax y estudio eco-Doppler (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005). La Tabla 3 muestra las características clínicas más relevantes de nuestra población, en el apartado de resultados se irán mostrando las tablas derivadas de cada subestudio con el número de pacientes analizados según el objetivo.

Una vez los pacientes llegaron a las consultas de cardiología de cada hospital, proporcionaron una muestra de orina, se les tomó muestras de sangre, y se les realizó un estudio eco-Doppler. Además, un cuestionario específico con antecedentes familiares y personales fue rellenado por los especialistas. Esta toma de datos también se realizó en un seguimiento a 12 y 24 meses.

El diagnóstico de IC fue multifactorial, se estableció la etiología en base a un consenso establecido por la OMS junto con la *World Health Federation* (WHF) para la definición de las miocardiopatías (Richardson *et al.*, 1996). Además, al 37,5% de los pacientes con miocardiopatía isquémica y al 4,6% con miocardiopatía dilatada se les realizó una angiografía coronaria. En los casos en que la angiografía no se realizó, se consideró que la disfunción ventricular era isquémica por los criterios siguientes: 1) existencia de episodios previos documentados de infarto agudo de miocardio; 2) ecocardiograma mostrando segmentos de contractibilidad normales coexistiendo con otros disquinéticos o aquinéticos; y 3) un ECG con signos de isquemia o necrosis miocárdica.

**Tabla 3.** Características clínicas del grupo de estudio (n=114)

Variables	
Edad (años)	64 ± 13
Género (varón/mujer)	81/33
Presión arterial sistólica (mm Hg)	127 ± 21
Presión arterial diastólica (mm Hg)	74 ± 12
Frecuencia cardiaca (lpm)	77 ± 14
Na (mEq/L)	140 ± 3
K (mEq/L)	4,5 ± 0,5
Colesterol total (mg/dL)	193 ± 44
LDL (mg/dL)	133 ± 70
Creatinina plasmática (mg/dL)	1,1 ± 0,3
Hematocrito (%)	42 ± 5
eFGR (mL/min/1,73 m ²)	79 ± 25
Índice de masa corporal (kg/m ²)	28 ± 5
Hipertensión	49%
Diabetes	36%
Obesidad	31%
Clase funcional:	
NYHA I	8%
NYHA II	74%
NYHA III	18%
Protocolo de Naughton modificado (s)	622 ± 308
Tratamiento:	
Diuréticos	79%
IECA	75%
Bloqueadores beta	50%
Antialdosterónicos	44%
Digoxina	31%
ARA II	17%
Calcioantagonistas	15%
Parámetros ecocardiográficos:	
Fracción de eyección (%)	37 ± 11
E/A	1,3 ± 0,5
Velocidad de propagación del flujo mitral (cm/s)	36 ± 11
Índice del volumen telesistólico (mL/m ²)	80 ± 50
Índice del volumen telediastólico (mL/m ²)	112 ± 62
Tiempo de deceleración (ms)	205 ± 73
Desplazamiento del plano aurículoventricular (mm)	8 ± 1,6
Masa del VI (g)	301 ± 107
Índice de masa del VI (g/m ²)	168 ± 61

ARA II: antagonistas de los receptores tipo II de la angiotensina; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardío en diástole del ventrículo izquierdo; eFGR: estimación del filtrado glomerular renal; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; K: potasio; LDL: lipoproteínas de baja densidad; Na: sodio; NYHA: *New York Heart Association*; VI: ventrículo izquierdo.



En cambio, se consideró que la etiología no era isquémica cuando el paciente no mostró antecedentes de angina de pecho típica o infarto de miocardio, y cuando el ECG no mostró signos de necrosis miocárdica (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005).

Los pacientes se clasificaron funcionalmente según el grado de actividad física que podían realizar, en base a los criterios establecidos en 1964 por “*The Criteria Committee of the New York Heart Association*”: a) clase funcional I (NYHA I), sin limitaciones (la actividad física ordinaria no causa fatiga, disnea, palpitaciones o angina de pecho); b) clase funcional II (NYHA II), ligeras limitaciones (la actividad física ordinaria causa fatiga, disnea, palpitaciones o angina de pecho); c) clase funcional III (NYHA III), marcadas limitaciones (actividad física leve provoca disnea y/o palpitaciones, comfortable en reposo); y d) clase funcional IV (NYHA IV), paciente con enfermedad cardíaca que provoca incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad sin molestias (síntomas de insuficiencia cardíaca o síndrome anginoso pueden estar presentes aún en reposo y cualquier actividad física provoca molestias); en nuestro estudio no se incluyó ningún paciente en esta clase funcional.

Los pacientes se encontraban bajo tratamiento médico estable, siguiendo las guías de la ESC y de la AHA (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005), al menos 2 meses antes de su inclusión en el estudio, tomando una combinación de terapias con diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), bloqueadores beta (BB), antagonistas de los canales de calcio, digoxina y antagonistas de los receptores tipo II de la angiotensina (ARA II).

Los individuos no fueron incluidos en el estudio si tenían fibrilación auricular, síndromes coronarios agudos, enfermedad hepática crónica o aguda, enfermedad pulmonar o renal o infección crónica.

Los enfermos fueron seguidos durante un periodo de 24 meses, con 3 fases de obtención de muestras y recopilación de datos: basal, a los 12 meses y a los 24 meses. En cada una de las fases los pacientes eran citados en la consultas externas de cardiología de su hospital, donde se chequeaban sus síntomas, medicación, eventos cardíacos (ingresos de origen cardíaco), se tomaban muestras de sangre y de orina, y se realizaba un estudio eco-Doppler.



El grupo control estuvo formado por 45 sujetos de la misma región geográfica pareados con los enfermos por edad y género, reclutados entre el personal de los hospitales participantes en el estudio, que presentaban un análisis bioquímico y hematológico normal, sin hipertensión, sin diabetes y sin antecedentes de enfermedad cardiovascular. Se les tomó muestras de sangre y facilitaron las muestras de orina.

El procedimiento fue aprobado por los comités éticos de revisión de cada centro hospitalario participante, y el estudio se realizó de conformidad con las líneas directivas de la buena práctica clínica y las normas éticas para la experimentación humana establecidas por la Declaración de Helsinki (Rickham 1964). Cada paciente dió su consentimiento informado por escrito para su inclusión en este estudio.

1.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

1.2.1. Sanguíneas

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción periférica entre las 8:00 y 10:00 AM, con el paciente en posición sentada al menos 30 minutos antes de la extracción, para la que se utilizaron tres tipos diferentes de tubos de extracción al vacío:

1. Tubo de cristal de 9,5 mL siliconado para facilitar la retracción del coágulo (BD Vacutainer SSTTM; REF 368510); tras la extracción se mantuvo una hora a temperatura ambiente antes de su centrifugación.
2. Tubo de cristal de 10 mL con adición de EDTA (anticoagulante), al 15% (0,12 ml) (BD Vacutainer K3E; REF 368480).
3. Tubo de cristal de 10 mL con adición de heparina (anticoagulante), 170 unidades internacionales (U.I) (BD Vacutainer NH; REF 368480).

Posteriormente los tubos con EDTA y heparina fueron centrifugados a 1.300 rpm durante 10 minutos a 4°C en centrífuga clínica, y el tubo de suero fue centrifugado a 3.000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Después se aisló el sobrenadante, se alicuotó en criotubos de plástico serigrafados de 5 ml que se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.



1.2.2. Urinarias

Las muestras de orina (primera orina de la mañana 8:00 a 10:00 AM) fueron proporcionadas por los pacientes en botes de plástico estériles, extrayendo de ellos un volumen de 11 ml mediante tubos al vacío de plástico sin aditivos (BD Vacutainer Z; REF: 364915). Después los tubos fueron centrifugados a 1.300 rpm durante 10 min. a 4°C en una centrífuga clínica. Se aisló el sobrenadante, se alicuotó en criotubos de plástico de 5 ml serigrafiados, almacenándolo a -80°C.

Al realizar la cuantificación de péptidos natriuréticos en orina se nos planteó la posible influencia de 1) ciclo circadiano, y de 2) estabilidad.

1. Para evaluar la variación de la concentración de NT-proBNP en orina durante el día se obtuvieron muestras en un grupo de 5 sujetos sanos con una franja horaria desde 8:00 - 18:00 h. Se calculó la media de las 5 determinaciones de NT-proBNP en orina en intervalos de 2 horas y se analizaron los cambios dentro del mismo día de los niveles del péptido (Fig. 11). Los niveles de NT-proBNP aumentaron significativamente ($p < 0,05$) durante el día a partir de las 12:00 PM al compararlos con el valor basal (8:00 AM). Manteniéndose sin diferencias significativas en la franja horaria 8:00 - 10:00 AM, de ahí que se eligiera este momento para la recogida de las muestras urinarias. También, observamos que no hubo cambios significativos en la concentración de NT-proBNP urinario entre las distintas franjas horarias después de las 12:00 PM. Resultados similares han sido descritos anteriormente para los niveles séricos de péptidos natriuréticos (Bruins *et al.*, 2004).
2. Para evaluar las condiciones de estabilidad para NT-proBNP en orina se analizaron 5 muestras de sujetos sanos que se almacenaron a -20°C y a -80°C durante un año. Las muestras en orina almacenadas a -20°C mostraron una pérdida del 32% ($p < 0,0001$) de la cantidad basal de NT-proBNP, mientras que las muestras almacenadas a -80°C tuvieron un descenso medio del 30% ($p < 0,0001$). No se observó diferencia al almacenar las muestras en una u otra temperatura de congelación, como muestra la Figura 12. Además, se analizó la estabilidad de NT-proBNP

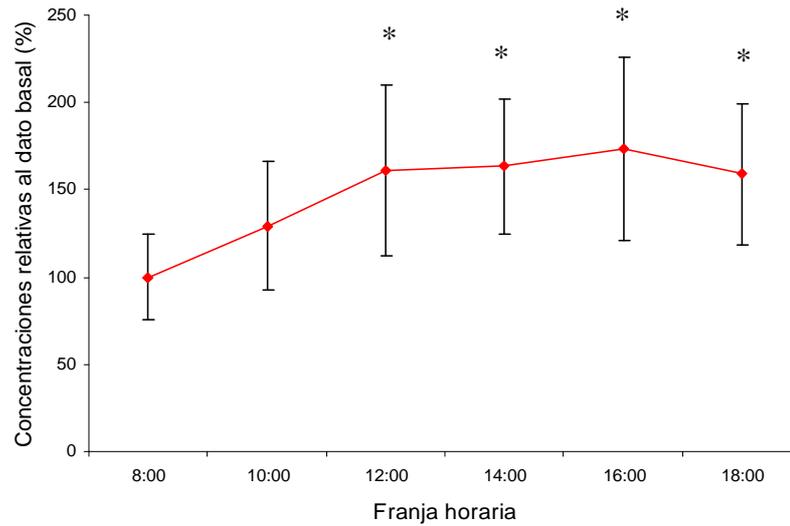


Figura 11. Cambios en la concentración urinaria de NT-proBNP durante el día.
* Diferencias significativas frente al dato basal (8:00 AM) ($p < 0,05$). Las barras de error indican \pm DS ($n=5$).

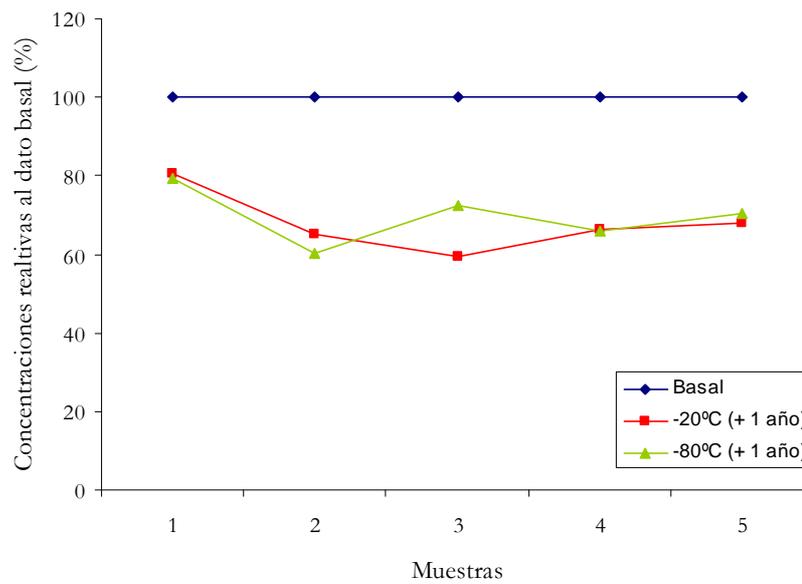


Figura 12. Estabilidad de NT-proBNP urinario alicotado y almacenado a -20°C (línea roja) y a -80°C (línea verde) por un periodo de 1 año frente al dato basal.



en orina a temperatura ambiente, observándose que tras 4 horas y media hubo un porcentaje de pérdida del 26%, $p < 0,0001$ (datos no mostrados).

1.3. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO B (BNP)

Las muestras séricas y urinarias fueron descongeladas a una temperatura de 4°C, y se alicuotó un volumen de 250 µL en tubos estériles tipo “eppendorfs” de plástico. Los plasmas fueron centrifugados previamente al ensayo en una microcentrífuga (modelo 5415 R, Eppendorf) a 1.300 rpm, 10 minutos a 4°C. Las orinas se centrifugaron dos veces a 13.300 rpm durante 30 min a 4°C, para retirar en el *pellet* las sales que pudiesen producir interferencias en el ensayo. Se aisló el sobrenadante y se mantuvo a temperatura ambiente hasta la realización del análisis.

Los niveles de BNP fueron determinados mediante el analizador *ADVIA® Centaur® Immunochemistry* (Bayer Healthcare LLC, Diagnostics Division). El método utilizado “*Bayer Diagnostics ADVIA® Centaur® BNP*”, un inmunoensayo automatizado quimioluminiscente que utiliza cantidades constantes de dos anticuerpos monoclonales; ambos anticuerpos son administrados por *Shionogi & Co. Ltd.*, ampliamente usados en el ensayo *ShionoRLA BNP*. El principio del test se basa en la técnica de doble anticuerpo:

- 1) Incubación de 100 µL de muestra (suero u orina), durante 5 minutos a 37°C, con un anticuerpo de “captura” monoclonal acridinium ester-labeled $F(ab')_2$ diseñado contra la estructura en anillo del BNP (aminoácidos 14-21).
- 2) Incubación durante 150 segundos, a 37°C, con un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado diseñado contra la parte C-terminal del péptido (aminoácidos 27-32), unido a partículas paramagnéticas de estreptavidina. De tal forma que se origina un “inmuno-complejo” entre BNP, presente en la muestra, y los anticuerpos del ensayo (anticuerpo de captura- antígeno -anticuerpo de detección).



- 3) Lavado del segundo anticuerpo conjugado no unido al “inmuno-complejo”.
- 4) La señal analítica, en unidades de luz relativas (URL), es cuantificada mediante la liberación de luz quimioluminiscente que es detectada por un luminómetro; el procedimiento asegura una relación directa entre la cantidad de BNP presente en la muestra y la cantidad de URL generadas.

El intervalo de medida del ensayo es de 2 pg/mL a 5.000 pg/mL (dato aportado por Bayer Healthcare). Las concentraciones por encima de 5.000 pg/ml pueden determinarse con diluciones apropiadas, siendo el porcentaje de recuperación para diluciones de 1:2, 1:5 y 1:10 del 97%. El tiempo de espera del primer resultado es de 18 minutos, con el siguiente resultado disponible en 15 segundos. El coeficiente de variación del ensayo fue de 3,5% para las muestras séricas y de 12% para las muestras urinarias. El test no presenta interferencias con hemoglobina (≤ 1000 mg/dL), triglicéridos (≤ 800 mg/dL), colesterol (≤ 1000 mg/dL), urea (≤ 200 mg/dL), creatinina ($\leq 2,5$ mg/dL), bilirrubina (≤ 25 mg/dL) y con 55 fármacos de uso más frecuente.

1.4. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL FRAGMENTO N-TERMINAL DE BNP (NT-proBNP)

Las muestras séricas y urinarias fueron descongeladas (una sola vez) a una temperatura de 4°C, y se alicuotó un volumen de 350 μ L en tubos “eppendorfs” de plástico estériles. Los plasmas fueron centrifugados previamente al ensayo en una microcentrífuga (modelo 5415 R Eppendorf) a 1.300 rpm durante 10 minutos y a 4°C. Las orinas se centrifugaron dos veces a 13.300 rpm durante 30 min a 4°C para retirar en el pellet las sales que pudiesen producir interferencias en el ensayo. Se aisló el sobrenadante.

Los niveles de NT-proBNP fueron determinados mediante el analizador *Elecys 2010* (Roche Diagnostics, Alemania). Se empleó el test “*Elecys proBNP*”, un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA). Todos los reactivos del test se almacenaron a 4°C. El principio del test se basa en la técnica sándwich (Fig. 13):



- 1) Incubación de 20 μ l de muestra (suero u orina), con un anticuerpo biotinilado policlonal específico anti-NT-proBNP (aminoácidos 1-76) y con un anticuerpo específico policlonal anti-NT-proBNP marcado con quelato de rutenio [Quelato tris (2,2'-bipiridi) rutenio (II)] (“fase sólida”).
- 2) Unión de la “fase sólida” a micropartículas recubiertas de estreptavidina, formando un complejo fijado a fase sólida por interacción entre biotina y estreptavidina.
- 3) La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente mediante un lavado con el reactivo “*ProCell*”.
- 4) Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide mediante un fotomultiplicador.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración referenciada a tres puntos en el ensayo y además, mediante una curva master incluida en el código de barras del reactivo. El tiempo de incubación empleado para obtener un resultado es 18 minutos, con un intervalo de medición entre <5 y 35.000 pg/mL. Las concentraciones superiores al límite de medición pueden diluirse con una dilución recomendada de 1:2. El coeficiente de variación para las muestras séricas fue de 2,6% y de 3,2% para las muestras urinarias. El test no presentó interferencias con ictericia (bilirrubina \leq 35 mg/dL), hemólisis (hemoglobina \leq 1,4 g/dL), lipemia (triglicéridos \leq 4.000 mg/dL), biotina (\leq 30 ng/mL), factores reumatoides (\leq 1.500 UI/mL) y con 51 fármacos de uso más frecuente.

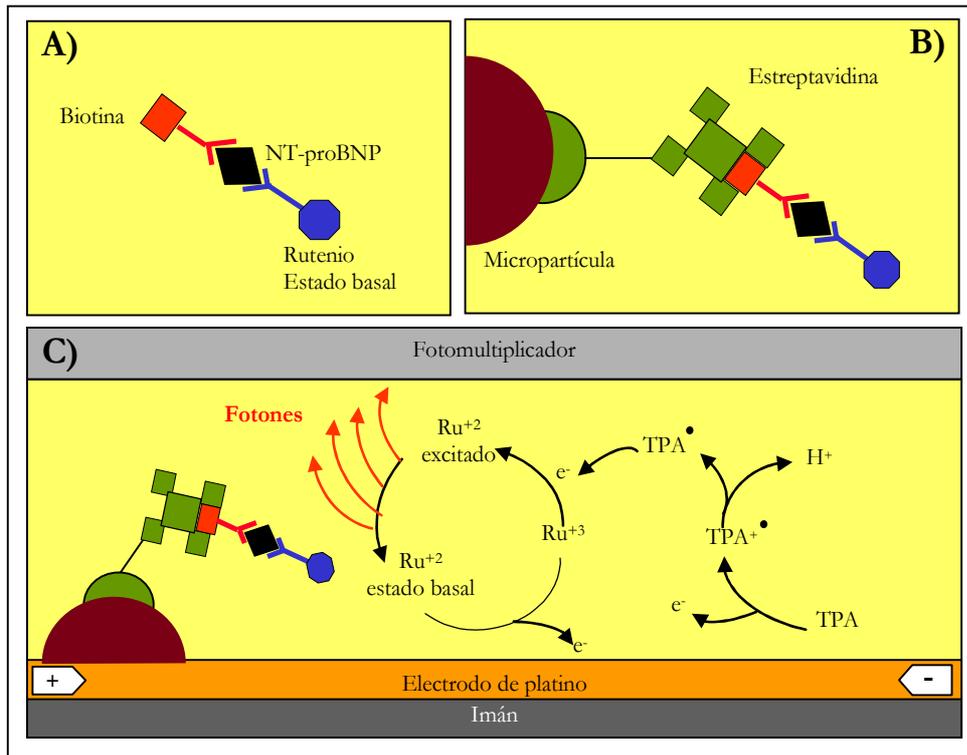


Figura 13. Principio del test “Elecsys proBNP”. En el dibujo A, se muestra la unión del anticuerpo biotinilado (color rojo) y del anticuerpo marcado con quelato de rutenio (color azul) al NT-proBNP (color negro). Después se produce la dilución de las moléculas de estreptavidina (color verde) ancladas a las micropartículas magnéticas (color marrón) que se unen a la fase sólida (figura B). Por último, la mezcla de reacción es introducida en la célula de lectura: se fijan las partículas a la base gracias a un imán, y se produce la excitación del rutenio, por acción de una corriente eléctrica y del compuesto tri Propil amina (TPA), con la consiguiente liberación de fotones que son cuantificados mediante un fotomultiplicador (C).

1.5. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *BIG* ENDOTELINA-1 (BIG ET-1)

Las muestras plasmáticas con EDTA fueron descongeladas a 4°C, y alicuotadas en volúmenes de 150 µL en “ependorfs” de plástico estériles. Los plasmas fueron centrifugados de nuevo, previamente al ensayo, a 1.300 rpm durante 10 minutos a 4°C, aislándose el sobrenadante. Antes del ensayo tanto las muestras como los reactivos estuvieron a temperatura ambiente.



Los niveles de *Big* endotelina-1 (Big ET-1) fueron determinados mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA) (*Big endothelin The Next Generation, Biomedica Gruppe, Austria*) que se basa en la técnica “sándwich” o doble anticuerpo (Fig. 14):

- 1) Incubación en agitación durante 3 horas a 37°C, de 100 µL de cada muestra de plasma con un anticuerpo policlonal anti-Big ET-1 que se encuentra anclado a las paredes de los pocillos de la microplaca, y con el anticuerpo de detección monoclonal anti-Big ET-1 (50 µL) que se encuentra libre en el pocillo.
- 2) Lavar cinco veces la microplaca con 300 µl de tampón de lavado cada vez.
- 3) Incubación de 1 hora a 37°C en agitación, con 100 µL de anticuerpo secundario antiratón IgG marcado con “*horseradish*” peroxidasa (HRPO) que se une al antígeno formando un “inmuno-complejo”.
- 4) Lavar la microplaca cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez para eliminar el exceso de anticuerpo de detección que no se une al “complejo”.
- 5) Incubación con 100 µL de sustrato colorimétrico (solución TMB; 3,3',5,5' tetra metilbendicidin), 30 minutos a 37°C en la oscuridad, que se une a la peroxidasa HRPO dando un producto coloreado.
- 6) Adición de 50 µL de “solución de parada” para detener la reacción colorimétrica entre la HRPO y el TMB, produciendo un cambio de color.
- 7) Cuantificación de la absorbancia en densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de referencia de 620 nm, en un lector de microplacas de longitud de onda dual (*Sunrise, TECAN, Austria*) usando el *software* Magellan (versión 2.5, TECAN, Austria).

Los resultados se obtienen mediante la interpolación de la densidad óptica obtenida para cada muestra en una curva lineal obtenida a partir de las distintas concentraciones estándar de Big ET-1 sintética; representando la concentración en el eje de las abscisas y la densidad óptica en el de las



ordenadas. El rango de medida del ensayo es de 0,05 a 15,6 fmol/ml, con un límite de detección de 0,025 fmol/ml. El coeficiente de variación intraensayo medio fue de 4,4% y el interensayo de 6,5%.

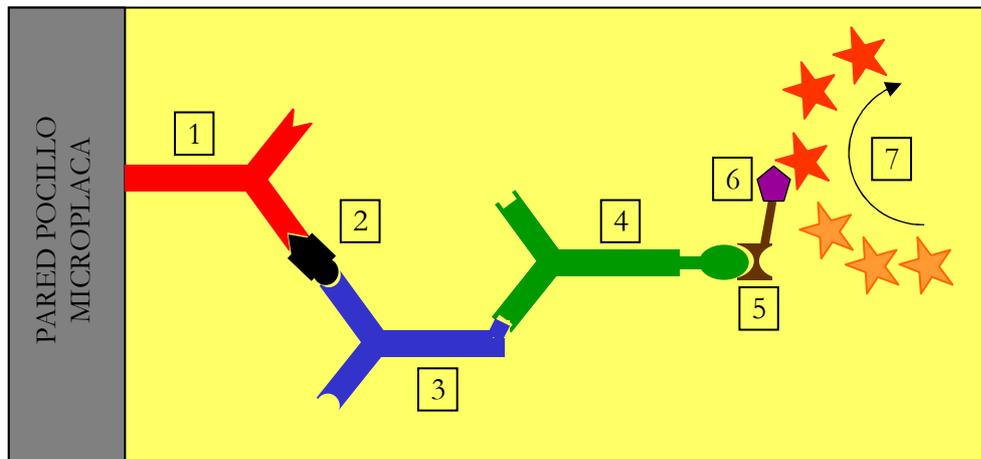


Figura 14. Principio del test “Big endothelin The Next Generation”. El anticuerpo policlonal primario se encuentra anclado a la pared del pocillo de la microplaca (1). En una primera incubación éste se une a la molécula de Big ET-1 (2) que a su vez está unida con un anticuerpo primario monoclonal (3). En una posterior incubación se añade el anticuerpo secundario marcado con una peroxidasa (4) que se unirá al anticuerpo primario monoclonal (5). Después se añade el TMR (3,3',5,5'-tetra

1.6. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALDOSTERONA

Las muestras plasmáticas heparinizadas fueron descongeladas a 4°C, y se alicotó un volumen de 250 µL en “ependorfs” de plástico estériles. Los plasmas fueron centrifugados de nuevo, previamente al ensayo, a 1.300 rpm durante 10 minutos a 4°C mediante una centrífuga clínica, aislándose el sobrenadante. Antes del ensayo tanto las muestras como los reactivos estuvieron 10 minutos a temperatura ambiente.

Los niveles de aldosterona fueron determinados cuantitativamente mediante un radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida con ^{125}I (*Coat-A-Count*[®]



Aldosterone, DPC, Estados Unidos) basado en un anticuerpo específico para aldosterona inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno:

1. La curva estándar incluye siete tubos de polipropileno con suero humano reconstituido como calibradores: tubo A (MB: unión máxima) 0 pg/mL de aldosterona, tubo B con 25 pg/mL, tubo C con 50 pg/mL, tubo D con 100 pg/ml, tubo E con 200 pg/mL, tubo F con 600 pg/mL y tubo G con 1.200 pg/mL. Además se añade un tubo de polipropileno sin anticuerpo para conocer la actividad total del ensayo (cuentas totales de I^{125}), y otro tubo vacío para determinar las uniones no específicas (NSB) al tubo.
2. Pipetear 200 μ L del calibrador cero en los tubos NSB y A. Pipetear 200 μ l de cada calibrador restante, control y muestra plasmática de cada paciente en los tubos correspondientes de polipropileno con el anticuerpo específico contra aldosterona anclado en la pared.
3. Agregar 1 mL de aldosterona marcada con I^{125} en todos los tubos, agitar breve y suavemente en vórtex, e incubar durante 18 horas a TA. La aldosterona marcada radioactivamente competirá por los sitios de unión al anticuerpo con la aldosterona presente en la muestra del paciente durante la incubación.
4. Decantar los tubos para separar la aldosterona unida al anticuerpo de la parte libre, y eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión del ensayo. Utilizando una gradilla especial, provista de una rejilla para sujetar los tubos de ensayo, el contenido de éstos (excepto los tubos T) se deja escurrir durante 2 o 3 minutos. Golpear suavemente los tubos contra varias capas de papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
5. Contar la radiación emitida por los tubos durante 1 minuto (siempre y cuando la cantidad total sea mayor de 1.500 cpm, en caso contrario contar 2 minutos) en un contador de radiación “gamma” (*Cobra Autogamma*, Packard, Downers Gorge IL).

La obtención de los resultados en términos de concentración (pg/mL) es a partir de una representación *log-logit* de la curva de calibración. Primero hay



que calcular para cada tubo las cuentas por minuto (CPM) corregidas por el NSB:

$$\text{Cuentas netas} = (\text{CPM de cada tubo}) - (\text{CPM del tubo NSB})$$

Después, determinar la unión de cada tubo como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

$$\text{Porcentaje de unión} = [(\text{Cuentas netas})/(\text{Cuentas MB netas})] \times 100$$

Por último, representar en el eje de las ordenadas el porcentaje de unión frente a la concentración de aldosterona en el eje de las abscisas para cada calibrador “no cero” y dibujar la línea de tendencia. Los resultados se obtienen por interpolación de los porcentajes de unión en la curva. El rango de medida es de 25 a 1.200 pg/mL con un límite de sensibilidad de 11 pg/mL. El coeficiente de variación intra e interensayo fue del 3% y 3,8%, respectivamente. El test no presentó interferencias con ictericia (bilirrubina ≤ 35 mg/L), hemólisis (eritrocitos ≤ 30 $\mu\text{g/mL}$) o lipemia.



2. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO

La ecocardiografía-Doppler es una técnica no invasiva que permite el estudio morfológico y funcional del corazón. Los equipos de ecocardiografía utilizan para la construcción de la imagen, reflexiones del sonido producidas por los cambios de conductividad acústica de los tejidos biológicos. Las estructuras que típicamente reflejan el sonido son relativamente macroscópicas (cavidades cardiacas, válvulas y vasos). El efecto Doppler se aplica a la medición de flujos sanguíneos mediante la emisión de ultrasonidos hacia una cavidad de contenido hemático y la recogida del “eco” reflejado por las células sanguíneas (Azpilicueta & García-Fernández 1995).

2.1. GRUPO CLÍNICO

Se estudiaron 114 pacientes caucásicos consecutivos no ingresados (81 varones y 33 mujeres, con edad media 64 ± 13 años), obtenidos de las consultas externas de cardiología de seis hospitales de la Comunidad Valenciana (nombrados anteriormente). Todos los pacientes estaban diagnosticados de insuficiencia cardiaca según los criterios de la ESC (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005). Una vez los pacientes en las consultas de cardiología de cada hospital, proporcionaron una muestra de orina, se tomaron muestras de sangre, y se les realizó un estudio eco-Doppler. Además, se rellenó un cuestionario específico con antecedentes familiares y personales de cada paciente. La Tabla 3 (ver página 54) muestra las características clínicas del grupo de estudio.

El diagnóstico de insuficiencia cardiaca fue multifactorial, estableciéndose la etiología en base a un consenso establecido por la OMS junto con la *World Health Federation* (WHF) para la definición y nomenclatura de las miocardiopatías (Richardson *et al.*, 1996). Los pacientes fueron clasificados funcionalmente según el grado de actividad física que podían realizar, en base a los criterios establecidos por “*The Criteria Committee of the New York Heart Association*” en clase funcional I (NYHA I), clase funcional II (NYHA II), clase funcional III (NYHA III), y clase funcional IV (NYHA IV). Todos se encontraban bajo tratamiento médico estable, al menos 2 meses antes de su inclusión en el estudio siguiendo las guías de la ESC y de la AHA (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005). Los pacientes no fueron incluidos en



el estudio si tenían fibrilación auricular, síndromes coronarios agudos, enfermedad hepática crónica o aguda, enfermedad pulmonar o renal.

Los pacientes fueron seguidos durante un periodo de 24 meses, con tres fases de obtención de muestras y recopilación de datos: basal, 12 meses después y a los 24 meses. En cada una de las fases los pacientes eran citados en las consultas externas de cardiología de su hospital, donde se chequeaban sus síntomas, medicación, eventos cardíacos (ingresos o visitas a urgencias, ambos de origen cardíaco), se tomaban muestras de sangre, se recogían las muestras de orina y se les realizaba un estudio eco-Doppler.

El procedimiento fue aprobado por los comités éticos de cada hospital participante, y el estudio se realizó de conformidad con las líneas directivas de la buena práctica clínica y las normas éticas para la experimentación humana establecidas por la Declaración de Helsinki (Rickham 1964). Cada paciente dio su consentimiento informado por escrito para su inclusión en este estudio.

2.2. OBTENCIÓN IMÁGENES ECO-DOPPLER

Los registros ecocardiográficos se obtuvieron mediante varios sistemas estándar, utilizados en la práctica asistencial por los seis hospitales que colaboraron en nuestro proyecto, todos equipados con transductores de 2,5 – 4 MHz. Las imágenes bidimensionales, “espectro Doppler” y “Doppler color” se obtuvieron siguiendo un protocolo común y se grabaron en vídeo para su posterior análisis, de manera centralizada, en el Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe. Todos los registros fueron analizados por un único facultativo especialista para reducir la variabilidad interobservador, mediante un sistema informatizado (*Eco-Dat; Software Medicina S.A., Madrid*) de manera ciega a los resultados de las otras determinaciones.

El examen ecocardiográfico estándar se realizó con el técnico a la izquierda o a la derecha del paciente, elevando la cabecera del paciente unos 20-30°. Se comenzó el estudio con el paciente en decúbito lateral izquierdo para poder obtener los planos paraesternales y apicales. Posteriormente se colocó al paciente en decúbito supino para obtener los planos subcostales y supraesternales. Todas las medidas se realizaron durante apnea respiratoria, midiendo 4 ciclos consecutivos por paciente y calculándose el promedio.



Existen tres planos ortogonales que se usan para describir las imágenes obtenidas del corazón mediante ecocardiografía en dos dimensiones: 1) el plano de imagen que cruza el corazón de forma perpendicular a las superficies dorsal y ventral del cuerpo, paralelamente al eje largo del corazón, y que recibe el nombre de “imagen de eje largo”; 2) el plano que cruza el corazón perpendicularmente a las superficies dorsal y ventral del cuerpo, pero perpendicular al eje largo del corazón y que recibe el nombre de “imagen de eje corto”; y 3) el plano que cruza el corazón aproximadamente paralelo a las superficie dorsal y ventral del cuerpo y que se conoce como “imagen de cuatro cámaras” (Fig. 15). Se debe hacer hincapié en que cada una de estas imágenes no se deben considerar como un plano único, sino como una familia de planos. La imagen en eje largo del corazón puede obtenerse de una localización del transductor apical, paraesternal o supraesternal. La imagen de eje corto del corazón puede obtenerse de una localización del transductor paraesternal o subcostal, y por último, la imagen de cuatro cámaras puede obtenerse con el transductor localizado en una posición apical o subcostal.

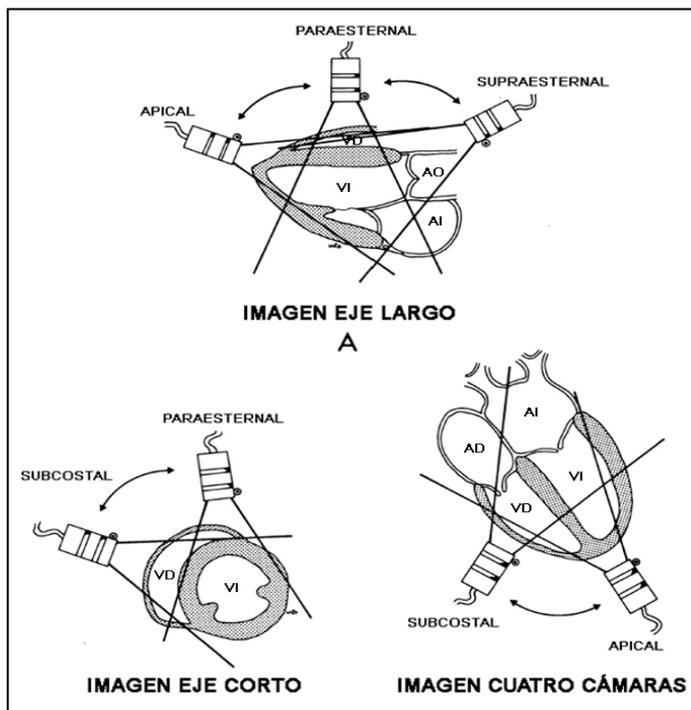


Figura 15. Esquema de la orientación que se emplea con el transductor para la obtención de una imagen eje largo (A), eje corto (B) y cuatro cámaras (C) del corazón. El transductor está siempre dirigido hacia la cabeza o el lado izquierdo del paciente. (Modificada de Henry et al. *Circulation* 1980; 62:212-7).



2.3. PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR

2.3.1. Función sistólica del ventrículo izquierdo

La ecocardiografía bidimensional representa la imagen de referencia del estudio ecocardiográfico a partir de la cual, obtenemos los demás tipos de registro. Este estudio se realizó colocando el transductor en diferentes puntos del paciente, lo que nos permitió obtener diferentes planos (plano paraesternal longitudinal o de eje largo, plano paraesternal transversal o de eje corto, plano apical o de cuatro cámaras, plano subcostal y plano supraesternal). Mediante esta técnica ecocardiográfica pudimos estudiar la anatomía cardíaca en movimiento, y de la función ventricular. En concreto:

- a) Las áreas del ventrículo izquierdo (VI) se obtuvieron mediante planimetría en ecocardiografía bidimensional directamente de las imágenes apicales de 4 cámaras al final de la diástole (telediástole) (ATD) y al final de la sístole (telesístole) (ATS) (Cheitlin *et al.*, 1997), y calculándose la fracción de cambio del área del VI (FCA) según:

$$\text{FCA} = [\text{ATD} - \text{ATS})/\text{ATD}] * 100$$

- b) Los volúmenes del ventrículo izquierdo se obtuvieron mediante ecocardiografía bidimensional y se calcularon mediante el método “área-longitud” biplano donde se asume que el VI tiene una forma de bala (Schiller *et al.*, 1989). El área y la longitud del VI son estimados por planimetría desde el punto medio del anillo hasta el ápex en una imagen apical de 2 y 4 cámaras (Fig. 16). Estas medidas son repetidas al final de la diástole y al final de la sístole, y el volumen es calculado como (Lang *et al.*, 2005) :

$$\text{volumen} = 0.85 \times (\text{área})^2 / (\text{longitud})$$

El volumen telesistólico (VTS) y telediastólico (VTD) son calculados por el método descrito previamente y la fracción de eyección (FE) como:

$$\text{FE} = [(\text{VTD} - \text{VTS})/\text{VTD}] \times 100$$

Todas las medidas descritas son parámetros establecidos que reflejan la función sistólica del ventrículo izquierdo. Los índices de



volúmenes telesistólico, telediastólico y la fracción de eyección son calculados por métodos no invasivos que utilizan asunciones geométricas (Schiller *et al.*, 1989). En cambio, las áreas del ventrículo izquierdo medidas con eco-bidimensional no necesitan asunciones geométricas para su cálculo, ya que se miden directamente mediante planimetría de imágenes del ventrículo izquierdo. Sin embargo, medidas que reflejan cambios en el volumen son más precisas a la hora de establecer un alteración en la función ventricular.

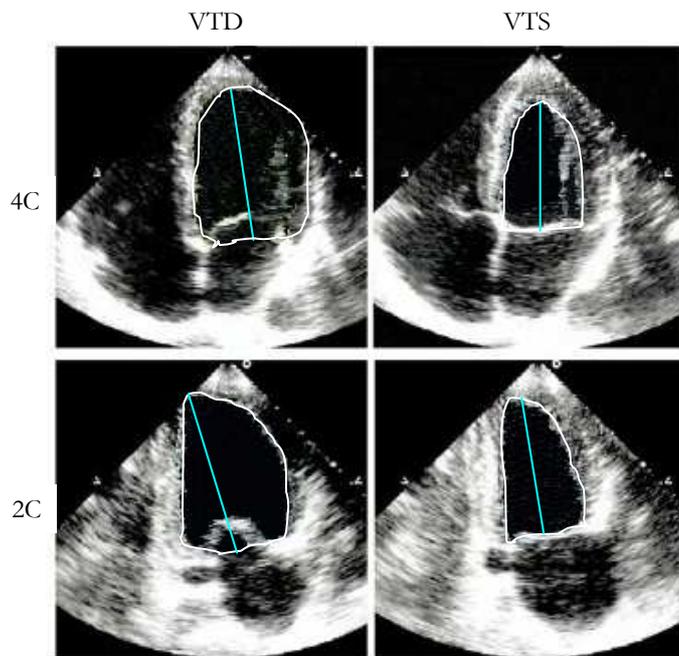


Figura 16. Medidas en dos dimensiones para el cálculo del volumen del ventrículo izquierdo mediante el método área-longitud en proyección apical de 4 cámaras (4C) y 2 cámaras (2C) al final de la diástole (VTD) y al final de la sístole (VTS). Se excluyen los músculos papilares en el registro. La línea blanca delimita el área del ventrículo izquierdo y la recta azul la longitud. (Modificada de: Lang *et al.* *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440-63).

2.3.2. Función diastólica del ventrículo izquierdo

La determinación de la función diastólica es importante en ensayos clínicos sobre insuficiencia cardiaca (con función sistólica preservada) e hipertensión, así como también en estudios epidemiológicos. Actualmente, una multitud de parámetros Doppler han sido empleados para evaluar la función diastólica. Las recomendaciones de cómo grabar y medir estos parámetros fueron publicadas en 2002 por la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Quiñones *et al.*, 2002).



a) Velocidades máximas absolutas como la velocidad de llenado temprano, la velocidad de llenado tardío, e intervalo de tiempo de deceleración de la onda E.

El “Doppler pulsado” se aplica a la medición de flujos sanguíneos mediante la emisión de ultrasonidos hacia una cavidad cardiaca y la recepción del sonido reflejado por las células sanguíneas. Con este método el mismo transductor emite y recibe alternativamente las señales, teniendo un tiempo para la emisión y otro para la recepción, que se conoce como “modo pulsado”. Este método se usó en combinación con la imagen bidimensional para la obtención de trazados dentro de zonas concretas del corazón. Una de las medidas que se derivan de estos trazados son las velocidades de flujo transmitral, parámetros de función diastólica que reflejan cambios en el flujo sanguíneo cardíaco. El lugar de medida fue el anillo mitral, a nivel de la punta de las valvas. El flujo transmitral que pasa a través de esta zona se calculó como el producto de la integral velocidad-tiempo y el área transversal de la zona. Las velocidades fueron la media de 3-5 ciclos cardiacos en pacientes en ritmo sinusal.

La figura 17 muestra el patrón típico para pacientes con función ventricular normal en ritmo cardíaco sinusal (foto izquierda). Una primera onda que se propaga desde la aurícula izquierda hasta el ápex del VI se corresponde con la velocidad de llenado temprano (onda E) y una segunda onda sigue a la contracción auricular, que se corresponde con la velocidad de llenado tardía (onda A). La magnitud de esas velocidades es máxima en la punta de las valvas mitrales y decrecen a medida que el flujo se aproxima al ápex. El tiempo de deceleración (TD) de la onda E desde las valvas hasta el ápex es otro índice de llenado consolidado, así como el cociente entre ambas ondas (E/A) que se usa como índice consolidado del patrón de llenado del ventrículo izquierdo. En los ventrículos normales, la posición espacial de la velocidad máxima es cercana al ápex ventricular para la onda E más que para la onda A, sugiriendo que los gradientes de presión intraventricular durante la fase de llenado temprano producen una fuerza de succión que acelera el flujo hacia el orificio mitral (Courtois & Ludbrook 1994); es también evidente que el flujo al nivel de la válvula mitral ocurre antes que en las regiones apicales.



Uno de los factores técnicos más importante para asegurar la exactitud de la medida es elegir el sitio donde el área se mantenga constante durante el periodo de paso de flujo, y donde el flujo sea lo más plano posible. Por otro lado, la exactitud en las medidas de las velocidades del flujo en el VI mediante “Doppler pulsado” depende de la orientación paralela entre el transductor y el flujo de la sangre. Pequeñas desviaciones en el ángulo ($<20^\circ$) producen errores moderados en la medida de las velocidades ($<10\%$) (Quiñones *et al.*, 2002).

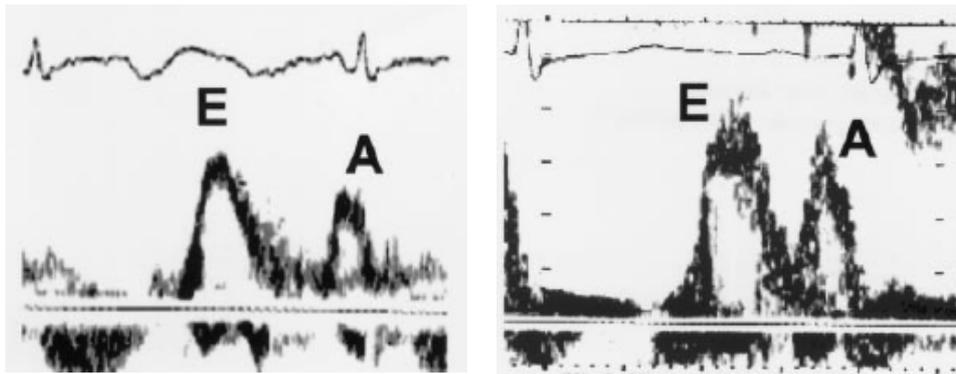


Figura 17. Flujo transmitral mediante “Doppler pulsado” grabado al nivel de la pared lateral basal en voluntarios sanos (foto de la izquierda) y en pacientes (foto de la derecha) con una estenosis aórtica severa, hipertrofia ventricular izquierda, y presiones de llenado elevadas. A: onda de contracción auricular; E: onda de llenado temprano del ventrículo izquierdo. (Extraída de: García *et al.* *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:865-75).

b) Medida de la velocidad de propagación del flujo transmitral (V_p) en el ventrículo izquierdo (VI).

Varios estudios muestran una asociación entre las anomalías en la relajación del VI y los patrones específicos de la velocidad de propagación en Doppler transmitral. La ecocardiografía “Doppler color en modo-M” codifica las distintas velocidades registradas dentro del corazón, de color rojo el flujo que se acerca al transductor y azul el que se aleja, (Fig. 18), proporcionando una distribución espacio temporal de esas velocidades a través de una línea vertical. Así, la información que se observa en una grabación “Doppler color en modo-M” del flujo en el VI es comparable a múltiples trazados simultáneos de “Doppler pulsado”, obtenidos a niveles diferentes del VI desde válvula mitral hasta el ápex (Thomas *et al.*, 1996).



Uno de los parámetros que determinamos mediante esta técnica es la velocidad de propagación del flujo transmitral (V_p) que es la velocidad a la que el flujo se propaga dentro del ventrículo, dada por la pendiente que conecta la línea de isovelocidad desde la punta de las valvas mitrales hasta la región apical del ventrículo (Fig. 18). La variabilidad intraobservador que obtuvimos fue de 7%. Otro parámetro medido fue el cociente de la onda E y la velocidad de propagación (E/V_p) que se relaciona con la presión de la aurícula izquierda o la presión capilar pulmonar (García *et al.*, 1997).

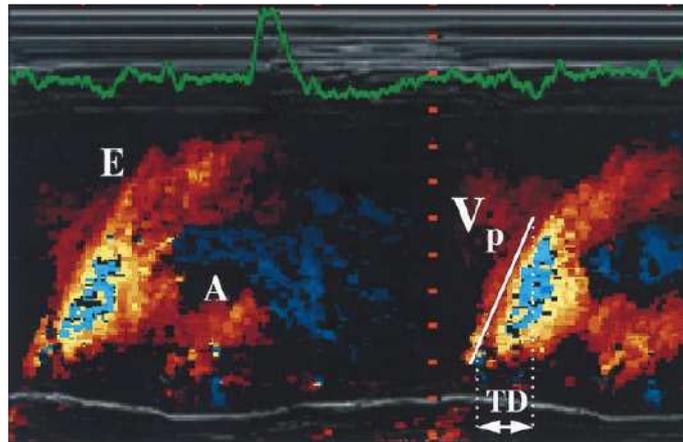


Figura 18. Trazado Doppler color en modo-M del flujo en el ventrículo izquierdo mostrando la onda de llenado temprano (onda E), la onda de contracción auricular (onda A), la velocidad de propagación del flujo transmitral (V_p) y el tiempo de deceleración (TD). (Extraída de: García *et al.* *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:865-75).

En contraste con los índices de llenado Doppler estándares (onda E, onda A y el cociente E/A), que muestran una distribución típica en “forma de U” desde un patrón normal de relajación a uno pseudonormal o retrasado, se sugiere que la V_p es relativamente independiente de la precarga (Takatsuji *et al.*, 1996), mostrando un patrón de descenso en los dos últimos grupos. Esta circunstancia la convertiría en un índice más sensible de la función diastólica.

Para obtener la imagen “Doppler color en modo-M”, el cursor se situó en el centro de la región del flujo mitral en una vista apical de 4 cámaras. Se podría desplazar el transductor hacia la pared lateral si se necesitase poner la línea de modo-M paralela a la dirección del flujo observado en Doppler color. La profundidad se ajustó para incluir todo el ventrículo izquierdo desde la punta de las valvas mitrales al ápex.



c) Desplazamiento del plano aurículoventricular (DPAV) y velocidad máxima de relajación (RVm)

El desplazamiento del plano aurículoventricular (DPAV) se determinó mediante ecocardiografía en modo M, a partir de una proyección apical bidimensional de 2 cámaras para la medida en la región anterior y posterior, y en proyección de 4 cámaras para la región septal y lateral, con la técnica descrita previamente (Willenheimer 1997) (Fig. 19). La región del DPAV fue la distancia cubierta por el plano aurículoventricular entre la posición más lejana del ápex (correspondiente al inicio de la contracción) y la posición más cercana al ápex (correspondiente al final de la contracción, incluyendo el acortamiento posteyección). Se calculó la media del DPAV en las cuatro regiones (Willenheimer *et al.*, 1998); la variabilidad intraobservador fue del 3%.

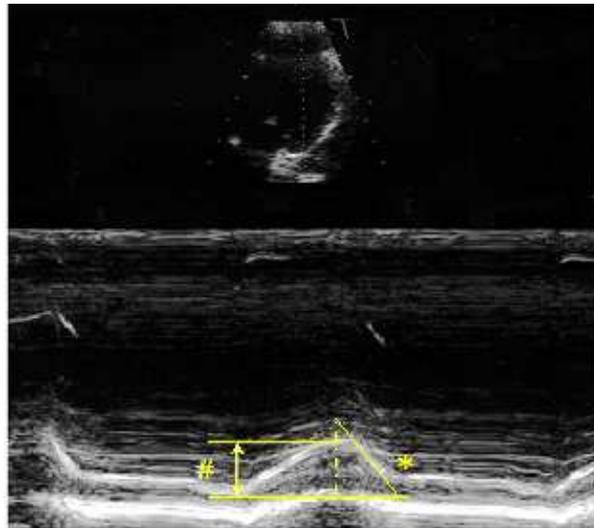


Figura 19. Registro del desplazamiento del plano aurículoventricular (DPAV) mediante ecocardiografía bidimensional en modo M. Se sitúa el transductor en la región lateral del plano perpendicular a la dirección del movimiento (arriba), permitiéndonos el registro en modo M del desplazamiento mediante una proyección de 4 cámaras (abajo). La distancia vertical entre el punto del plano más distante del ápex y el punto más cercano al ápex es medida en modo M (#). La inclinación de la línea recta muestra la velocidad máxima (RVm) ascendente del desplazamiento del plano durante la fase temprana en diástole (*).



La disfunción diastólica se estima frecuentemente mediante el patrón de velocidad de flujo transmitral, donde el cociente E/A es el índice más empleado. Sin embargo, existen ciertas limitaciones relacionadas con sus rangos en sujetos sanos y su distribución en pacientes con IC (Lang *et al.*, 2005) que hacen necesario nuevos parámetros que reflejen la función diastólica.

La velocidad máxima de relajación (RVm) es un parámetro sencillo que se define como la velocidad máxima del DPAV hacia la base del corazón durante la fase de llenado temprano. Se determinó mediante registro en modo M del DPAV ascendente. Se identificó la porción en meseta y dos “calipers = pies de rey” se colocaron tangencialmente a la curva. La inclinación de la recta muestra la velocidad máxima ascendente (mm/seg) del DPAV durante la fase temprana de la diástole (Fig. 19). Se registraron las velocidades máximas ascendentes en las regiones septal, lateral, posterior, y anterior del DPAV, reflejando las velocidades máximas longitudinales de relajación del ventrículo izquierdo. La RVm se calculó como la media de las velocidad máximas en las cuatro regiones; la variabilidad intraobservador fue del 7% .

2.3.3. Masa del ventrículo izquierdo

Todos los algoritmos de cálculo de la masa del VI, tanto si se usa modo-M, eco bidimensional o en tres dimensiones, están basados en la sustracción del volumen de la cavidad interna del VI del volumen encerrado por su pericardio, obteniéndose el volumen del músculo cardiaco para el VI. Este volumen es convertido después en masa multiplicando por la densidad miocárdica. Para la cuantificación de la masa del VI se requiere identificar las interfases entre la sangre cardiaca y el endocardio, y entre el epicardio y el pericardio (Fig. 20).

La mayoría de cálculos de la masa del VI han sido realizados usando medidas lineales derivadas de la ecocardiografía bidimensional en modo-M, o más recientemente de medidas lineales del VI en dos dimensiones (Ilercil *et al.*, 2001). En nuestro estudio se calculó según el modelo de *Devereux y col.* 1986, recomendado por la “*American Echocardiography Association*” (validadas en necropsias $r=0,90$, $p<0,001$) y considerando el VI como una elipse de revolución:



$$\text{Masa del VI} = 0.8 \times [1.04 \times (\text{DTD} + \text{GSI} + \text{GPP})^3 - (\text{DTD})^3] + 0.6$$

Donde GPP, GSI y DTD son grosor de pared posterior, grosor de septo interventricular y diámetro de telediastólico del VI, respectivamente. Para obtener las medidas exactas de estos parámetros, las grabaciones en modo-M se hicieron con una vista paraesternal de eje corto, en la punta de las valvas de la válvula mitral, por lo que el transductor se situó perpendicular al septo y pared posterior del VI (Fig. 20).

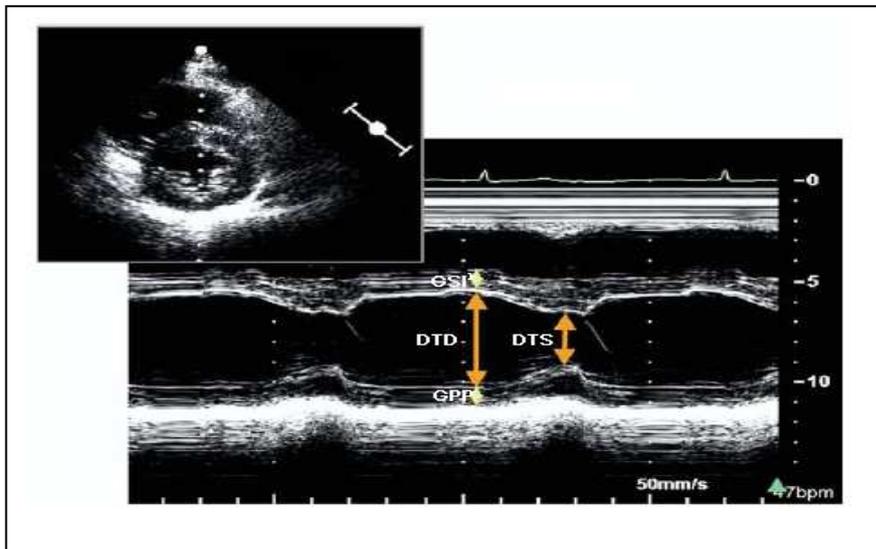


Figura 20. Medida del diámetro telediastólico (DTD) y telesistólico (DTS) en modo-M, guiado por imagen paraesternal de eje corto (panel superior) para optimizar la orientación del transductor. GPP: grosor de la pared posterior; GSI: grosor del septo interventricular. (Modificada de: Lang et al. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440-1463).

2.4. VALORES DE REFERENCIA

Las dimensiones intracardiácas están relacionadas con el tamaño corporal, así en las personas con un mayor tamaño u obesos puede resultar difícil distinguir si la dimensión de una cavidad está dentro del rango de la normalidad. Es tradicional clasificar estas dimensiones con respecto a la superficie corporal (SC) en metros cuadrados (Tabla 4), aunque hay pruebas



convincientes de que algunas dimensiones guardan más relación con la talla (Nidorf *et al.*, 1992).

Tabla 4. Valores de referencia de las dimensiones intracardíacas del ventrículo izquierdo según género y ajustadas por la superficie corporal, obtenidas mediante eco-bidimensional.

Variables	Rango normalidad	
	Varones	Mujeres
Diámetro aurícula izquierda (mm)	30 – 40	27 – 38
Diámetro aurícula izquierda/SC (mm/m ²)	15 – 23	
Área aurícula izquierda (cm ²)	≤ 20	
Volumen aurícula izquierda (ml)	18 - 58	22 - 52
Volumen aurícula izquierda/SC (ml/m ²)	22 ± 6	22 ± 6
Diámetro telediastólico del VI (DTD) (mm)	42 – 59	39 – 53
Diámetro telediastólico del VI/SC (mm/m ²)	22 – 31	24 – 32
Diámetro telesistólico del VI (DTS) (mm)	26 – 40	23 – 35
Área en diástole del VI (cm ²)	18,6 – 48,6	
Área en sístole del VI (cm ²)	8,6 – 30,4	
Volumen telediastólico del VI (VTD) (ml)	67 - 155	56 – 104
Volumen telediastólico/SC (ml/m ²)	35 - 75	35 - 75
Volumen telesistólico del VI (VTS) (ml)	22 - 58	
Volumen telesistólico/SC (ml/m ²)	12 - 30	
Fracción de acortamiento (FA) (%)	25 - 43	
Fracción de eyección (FE) (%)	≥ 55	
Desplazamiento del plano aurículoventricular (DPAV)(mm)	≥ 10	
Grosor septo interventricular (GSI) (diástole) (mm)	6 – 10	6 – 9
Grosor pared posterior (GPP) (diástole) (mm)	6 – 10	6 – 9
Masa del VI (g)	88 - 224	67 - 162
Masa del VI/SC (g/m ²)	49 - 115	43 - 95

SC: superficie corporal; VI: ventrículo izquierdo. (Modificada de: Schiller *et al.* *Am Soc Echocardiogr* 1989; 2:358-67; Lang *et al.* *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440-63; Willenheimer R. *Scand Cardiovasc J* 1998; 48:1-31).

Las personas de edad avanzada constituyen otro grupo difícil, pues no está claro si las variaciones son estrictamente normales o representan el efecto de una enfermedad leve de larga duración u oculta, como hipertensión o enfermedad coronaria. Se ha descrito que las dimensiones de las cavidades son más grandes (Pearson *et al.*, 1991, Persson *et al.*, 2007) o más pequeñas (Klein *et al.*, 1994) que la media, posiblemente como reflejo de la presencia de distintas enfermedades (Tabla 5). Actualmente existe una controversia con respecto al hecho de considerar estos valores de referencia para los sujetos ancianos como



“normales”, aunque en estos pacientes la media de estas variables sea mayor (Kollias 2007).

Tabla 5. Valores de referencia para las variables Doppler de función diastólica del ventrículo izquierdo.

VARIABLES	Personas < 50 años	Personas > 50 años
Onda E de la válvula mitral (cm/seg)	44 – 100	34 – 90
Onda A de la válvula mitral (cm/seg)	20 – 60	31 – 87
Cociente E/A	>1	>1
TD (mseg)	140 – 200	140 – 230
TRIV (mseg)	50 – 90	60 – 110
Vp (cm/seg)	>55	> 45

A: velocidad de llenado tardío del ventrículo izquierdo; E: velocidad de llenado temprano del ventrículo izquierdo; TD: tiempo de deceleración de la onda E; TRIV: tiempo de relajación isovolumétrico; Vp: velocidad de propagación del flujo transmitral. (Modificada de: García *et al.* *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:865-75; Persson *et al.* *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:687-94).

También pueden producirse confusiones diagnósticas en los deportistas. El corazón de un deportista entrenado puede estar ligeramente dilatado o hipertrofiado (Pelliccia *et al.*, 1991). Como habitualmente está sometido a una gran carga de trabajo, el ventrículo izquierdo puede ser relativamente hipocontráctil en reposo, por ello es fácil diagnosticar en exceso miocardiopatías dilatadas leves en estas personas. Sin embargo, en nuestro grupo clínico no se encontraron deportistas profesionales, por lo que no se tuvo en cuenta esta variable.



3. ESTUDIO BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. GRUPOS CLÍNICOS

Se estudiaron 44 pacientes caucásicos diagnosticados de insuficiencia cardíaca (IC) (51 ± 9 años, 98% varones) (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005) sometidos a trasplante cardíaco entre los años 2001 - 2008 en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. A todos los pacientes se les realizó un estudio pre-trasplante en el Servicio de Cardiología que incluyó: análisis bioquímico y hematológico, placa de tórax, electrocardiograma, estudio eco-Doppler, estudio hemodinámico y coronariografía. Además, tenían historial clínico con antecedentes personales (hipertensión, diabetes, dislipemia, eventos cardíacos previos, fecha diagnóstico IC...). Se diagnosticó miocardiopatía dilatada no isquémica cuando los pacientes tuvieron las arterias coronarias intactas (mediante angiografía) y disfunción sistólica del VI (FE <40%) con VI dilatado sin hipertrofia (DTD > 55 mm, mediante ecocardiografía): 28 pacientes eran isquémicos y 16 dilatados. La Tabla 6 muestra las características clínicas según la etiología de IC.

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes según etiología de insuficiencia cardíaca

	MCI (n=28)	MCD (n=16)
Edad (años)	54 ± 7	$46 \pm 10^*$
Género varón (%)	100	94
Clase funcional (NYHA)	$3,5 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,4$
IMC (kg/m ²)	27 ± 4	26 ± 5
Diabetes mellitus (%)	57	0***
Hipertensión	46	25
Dislipidemia	54	31
Hipercolesterolemia	18	13
Exfumador	86	56
Parámetros ecocardiográficos		
FE (%)	24 ± 11	21 ± 8
FA (%)	17 ± 7	14 ± 8
DTS (mm)	55 ± 10	$71 \pm 9^{***}$
DTD (mm)	64 ± 10	$78 \pm 10^{**}$
Índice cardíaco (mL/min/m ²)	2231 ± 871	1814 ± 439
Masa del ventrículo izquierdo (g)	275 ± 70	$375 \pm 166^*$
Duración enfermedad (meses)	43 ± 41	65 ± 55

La duración de la enfermedad se mide desde el diagnóstico de insuficiencia cardíaca hasta el trasplante. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DTD: diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DTSVI: diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; FA: fracción de acortamiento; FE: fracción de eyección; IMC: índice de masa corporal; MCD: miocardiopatía dilatada; MCI: miocardiopatía isquémica; NYHA: *New York Heart Association*.



Los pacientes habían sido sometidos a prueba de esfuerzo y estaban clasificados funcionalmente según la *New York Heart Association* (clase funcional NYHA); y se encontraban bajo tratamiento médico siguiendo las guías de la ESC y de la AHA (Swedberg *et al.*, 2005, Hunt *et al.*, 2005).

El grupo control estuvo formado por 5 sujetos sanos donantes anónimos (edad media 48 ± 18 años, 60% varones), que habían fallecido 3 por accidente de tráfico y 2 por hemorragia cerebral; ninguno de ellos tenía antecedentes de enfermedad cardiovascular.

3.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.2.1. Obtención

El corazón del paciente fue introducido inmediatamente después de su extracción en un bote estéril con 0,9 % NaCl y se almacenó a 4°C por un máximo de 8 horas desde la pérdida de la circulación coronaria hasta su almacenaje a -80°C, tiempo medio de $4,4 \pm 3$ horas. Se cortaron mediante bisturí 2 muestras transmurales de tejido miocárdico del ápex del ventrículo izquierdo por cada caso (tamaño aproximado de superficie externa de 4 cm² cada una) (Fig. 21) y se introdujeron en botes estériles con 0,9% NaCl a una temperatura de 4°C para su transporte. Todas las muestras fueron obtenidas con consentimiento informado de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario La Fe y realizado de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki.

3.2.2. Almacenaje

Una vez en el laboratorio se procedió al troceado de las muestras transmurales en fragmentos más pequeños (aproximadamente 0,5 mm³) a una temperatura de 4°C. Se eliminó la membrana del epicardio y la cara más profunda del endocardio, donde se encuentran anclados los músculos papilares, quedándonos con la zona media del endocardio. A continuación los fragmentos obtenidos fueron almacenados en criotubos serigrafados a una temperatura de -80°C hasta su posterior análisis.

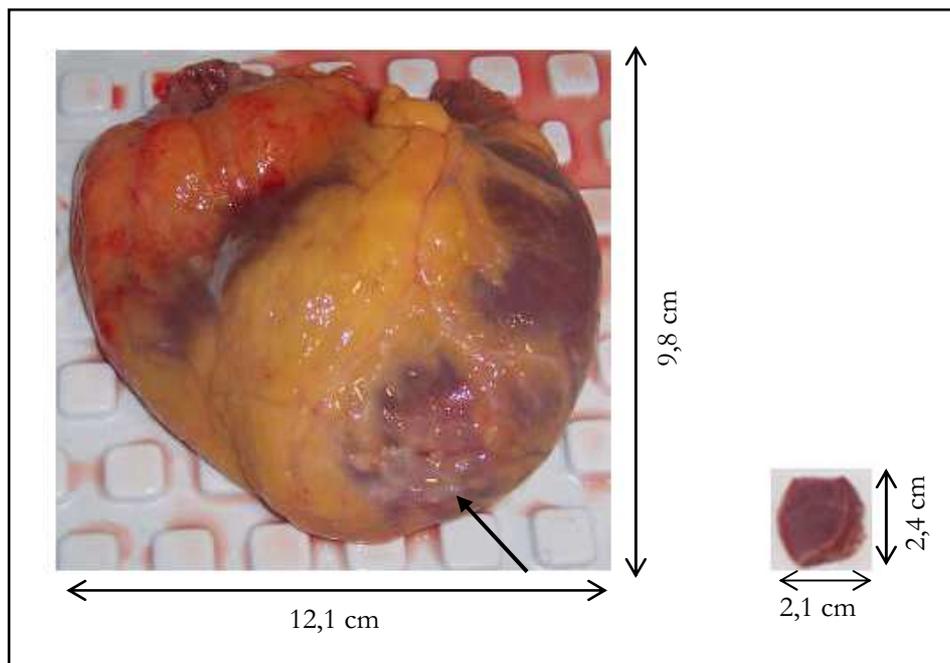


Figura 21. Imagen de un corazón con miocardiopatía isquémica (infarto agudo de miocardio apical anterior) inmediatamente después de la extracción (izquierda). Abundante grasa pericárdica (color amarillento). Fragmento obtenido del ápex del ventrículo izquierdo (derecha), de dimensiones aproximadas de 2 x 2 x 1 cm.

3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MUESTRAS CARDIACAS

Se cortó un fragmento de aproximadamente 100 mg de las muestras endocárdicas del ventrículo izquierdo previamente congeladas a -80°C . Se introdujo el fragmento en tubos “Lysing Matriz” diseñados para su uso con el homogenizador *FastPrep-24* (*MP Biomedicals, USA*) en tampón de extracción proteica (2% SDS, 250 mM sucrosa, 75 mM urea, 1 mM de ditiotreitól y 50 mM Tris-HCl, pH 7,5), con inhibidores de proteasas (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinina y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina). Todo el proceso de extracción se realizó a 4°C .

A continuación alicuotamos los homogenados en tubos tipo “eppendorfs” estériles de 1,5 ml y los centrifugamos a 13.000 rpm a TA durante 5 minutos (*centrífuga Eppendorf modelo 5415 R, Alemania*). Se aisló el sobrenadante y se hicieron alícuotas de 150 μl para la determinación de proteínas.



3.4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS

La valoración cuantitativa de proteínas de cada alícuota se determinó por el método espectrofotométrico de Lowry y colaboradores (1951) que se basa en que la intensidad de color de la disolución es proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer ($A=\epsilon.l.c$).

La preparación de las muestras consta de dos reacciones químicas: (a) el tartrato cúprico en medio alcalino se une a los átomos de nitrógeno de los puentes peptídicos de las proteínas, formando complejos de color azul pálido y (b) la reducción del ácido fosfomolibdotúngstico, principal componente del reactivo Folin & Ciocalteu de color amarillo, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas resultando un color azul intenso (*Total Protein Kit., Micro Lowry, Sigma Diagnostics, San Luis, USA*). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 620 nm, utilizando una longitud de onda de referencia de 450 nm. La concentración de proteínas se calculó por la interpolación de la absorbancia en una curva de calibración, utilizando como estándar distintas concentraciones de albumina bovina (BSA).

3.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BIS-TRIS 4-12% E INMUNOTRANSFERENCIA

3.5.1. Electroforesis

Previo a su electroforesis las muestras fueron descongeladas y preparadas en un “cóctel de carga” para cada muestra con un volumen final de 25 μ l por pocillo: 6,25 μ l de tampón de carga (450 mM Tris HCl, 12% Glicerol, 4% SDS, 0,0025% Azul de Coomassie G, 0,0025% Rojo Fenol, pH 8,45) (*NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X), Invitrogen, REF: NP0007*), 2,5 μ l de agente reductor (*NuPAGE[®] Reducing Agent, Invitrogen, REF: NP0004*), un volumen de muestra que garantice 45 μ g de proteína/25 μ l. Por último, una cantidad de agua bidestilada hasta alcanzar un volumen final de 25 μ l. Inmediatamente después las muestras fueron calentadas en un bloque termostático (*Termohyne, Thermodyne, Barnstead International, USA*) 10 minutos a 70°C. Los geles se introdujeron en una cubeta de electroforesis (*Xcell4 SureLock[™] Midi-Cell, Invitrogen REF: WR0100*) que contenía tampón de electroforesis (*NuPAGE[®]*



MES SDS Running Buffer, REF: NP0002), y a continuación las muestras se cargaron en los pocillos correspondientes del gel, junto con un marcador de peso molecular conocido (*SeeBlue™ Plus2 Pre-Stained Standard*, Invitrogen REF: LC5925), en otro pocillo del gel.

Las proteínas de las diferentes muestras se separaron en un rango de 3–188 kDa mediante electroforesis en geles verticales (20 pocillos) de 13 x 8,3 cm de Bis-Tris 4-12% (NuPAGE® Bis-Tris Midi Gels, Invitrogen REF: WG1402BOX) según el procedimiento desarrollado por Schaeffer & VonJagow (1970). Se utilizaron a temperatura ambiente, condiciones de voltaje constantes (200 V) y 200 mA durante 90 minutos.

Una vez realizadas las electroforesis, los geles se tiñeron y se secaron o se sometieron a inmunotransferencia.

3.5.2. Tinción de geles Bis-Tris 4-12%

Protocolo suministrado por NOVEX (*Colloidal Blue Staining Kit*, Invitrogen REF: LC6025):

1. Se lavan con agua destilada.
2. Se tiñen con una solución de azul coloidal (*Sensitive Colloidal Coomassie G-250*) durante un mínimo de 3 horas y un máximo de 12 horas
3. Se lavan con agua destilada 2 veces.
4. Cada gel se deja en un volumen de 200 ml de agua destilada, para eliminar el exceso de tinción, en agitación suave durante al menos 7 horas y un máximo de 3 días; o hasta que no se aprecie cambios en la intensidad de las bandas.

3.5.3. Secado de geles Bis-Tris 4-12%

Protocolo suministrado por DIVERSIFIED BIOTECH (*Gel Drying Frames 24x24 cm*, REF: AB-110760):

1. Se decanta el agua y se añaden de la solución de secado 35 ml (20% etanol/10% glicerol) por gel, y se mantiene en esta solución durante 15-20 minutos con agitación suave.



2. Se mojan en la misma solución dos piezas de celofán durante 15-20 segundos, y no más de 2 minutos.
3. Se coloca el gel con las dos piezas de celofán formando un sándwich y evitando la formación de burbujas.
4. Se monta en los soportes del kit (tipo marco de ventana) y se mantienen en posición vertical, para eliminar el exceso de humedad, de 12 a 36 horas dependiendo del tamaño, humedad y tirantez del gel (no más de 48 horas ya que el gel se fractura).
5. Cuando el celofán está seco al tacto, se prensa el gel, colocándolo bajo alguna superficie pesada durante algunos días.

3.5.4. Transferencia a membrana o **WESTERN BLOT**

Las proteínas separadas en los geles se sometieron por transferencia a un soporte sólido, en nuestro caso a una membrana de PVDF, utilizando un sistema en seco *iBlot™ Dry Blotting System* (Invitrogen, REF: IB1001EU), para *Western Blotting*.

Para usar el *iBlot™ Dry Blotting System* en la transferencia de proteínas, se encajó el *iBlot™ Gel Transfer Stacks* (Invitrogen, REF: IB3010-01), que contiene la membrana de transferencia de PVDF, junto con el gel extraído de la electroforesis en la unidad *iBlot™ Gel Transfer Device*. Los pasos seguidos fueron los siguientes (Fig. 20):

- 1- Se colocó primero el *iBlot™ Anode Stack* sobre la superficie del *iBlot™ Gel Transfer Device*. La capa de cobre quedó en la parte inferior y en su cara externa se encontraba la membrana de transferencia de PVDF (0,2 μm).
- 2- Se situó el gel extraído de la electroforesis sobre la membrana de PVDF, y sobre él un papel de filtro. Las posibles burbujas que interfieren con la transferencia se eliminaron con el *Blotting Roller*.
- 3- Se colocó sobre el papel de filtro el *iBlot™ Cathode Stack*, (que contiene el gel), situándose en contacto con el papel de filtro, quedando la cara de cobre en la cara externa. Las burbujas se eliminaron mediante el *Blotting Roller*.



- 4- A continuación se colocó una esponja de melamina blanca (*iBlot™ Disposable Sponge*), que contenía en su extremo superior derecho un trozo de aluminio que hará contacto con la tapa del *iBlot™ Gel Transfer Device*.
- 5- Se cerró la tapa del *iBlot™ Dry Blotting System* y se eligió el programa de transferencia (P3: 20V), con un tiempo de duración modificado a 10 minutos.

Los *iBlot™ Gel Transfer Stacks* actuaron como depósitos de iones que contenían los tampones (ánodo y cátodo) en una matriz gelificada. Este procedimiento minimiza la manipulación y da lugar a un método más preciso. Los *iBlot™ Gel Transfer Stacks* también contenían los electrodos de cobre (ánodo y cátodo) que se requieren en la transferencia. La precisión aumentó puesto que el ánodo de cobre no genera oxígeno como ocurre con la electroforesis húmeda (Fig. 22).

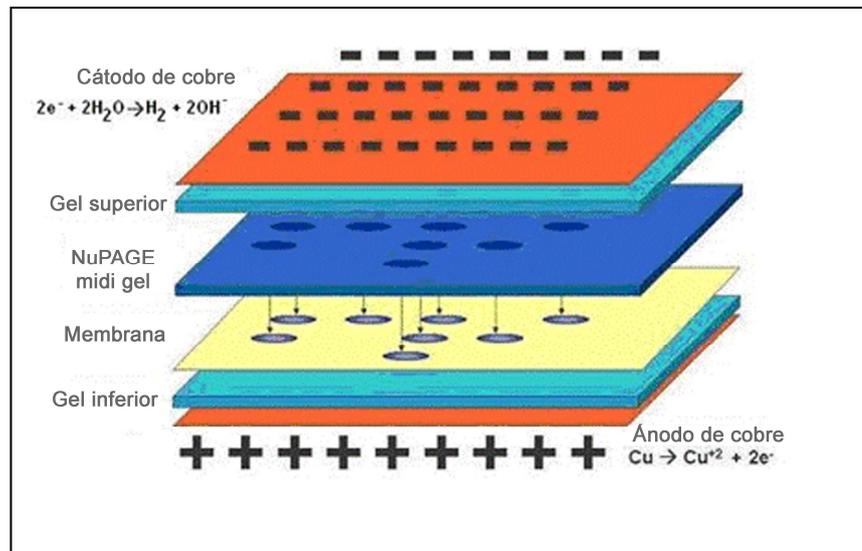


Figura 22. Método de transferencia en seco mediante el sistema *iBlot™ Dry Blotting System* (Invitrogen).



El diseño de *iBlot™ Gel Transfer Device* reduce la distancia entre los electrodos y el voltaje necesario. Este sistema único, combinado con la tecnología de la matriz gelificada de los *iBlot™ Gel Transfer Stacks* permite al sistema generar una alta energía y corriente que aumentan la velocidad y reducen el tiempo de transferencia de las proteínas. Terminada la transferencia se tiñeron los geles, como se indica en el apartado anterior, para comprobar la eficacia de la misma.

La membrana de PVDF se incubó inmediatamente, para bloquear los sitios de unión inespecíficos, con TBS-Tw + 1% de albumina bovina (BSA) (*Albumin bovine A-8022 Fraction V, Sigma Chemical Co*), durante toda la noche a 4°C.

3.5.5. Inmunodetección de proteínas (proBNP, BNP y NT-proBNP)

El protocolo utilizado para detectar las proteínas transferidas se basó en el descrito por Tobwin y col (1979), utilizándose de la siguiente forma:

1. Incubación con primer anticuerpo: se sustituye la solución de bloqueo por TBS-Tw que contiene una dilución apropiada de anticuerpo primario monoclonal, en nuestro caso, previamente determinada en un ensayo de diluciones seriadas.

Se incubaron las membranas de PVDF durante 2 horas a TA, en agitación.

- a. Anti-BNP & proBNP (*HyTest Ltd; Mab 50E1 REF: 4BNP2*) dilución 1/300
 - b. Anti-NT-proBNP & proBNP (*HyTest Ltd; Mab 24E11, REF: 4NT1*) dilución 1/300
2. Lavados: 4 lavados de 5 minutos con TBS-Tw, en agitación (400 ciclos por segundo; *KS125 basic, IKA Labortechnik, Alemania*).
 3. Incubación con anticuerpo secundario: se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (*Sigma Chemical Co, REF: A3562*). Se incubó 1 hora, a temperatura ambiente, en agitación y a una dilución 1:20.000 en



TBS-Tw + 1% de Nonidet-P40 (Nonylphenyl-polyethylene glycol; *Biochemika, Sigma Aldrich*).

4. Lavados: 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-Tw y 3 lavados de 5 minutos con TBS, en agitación.
5. Revelado del antígeno-anticuerpo: se transfiere la membrana a la solución de revelado BCIP/NBT (*Sigma FastTM BCIP/NBT Buffered Substrate Tablets, Sigma Chemical Co*) preparada en el momento de uso (1 pastilla + 10 ml de agua bidestilada). La reacción se lleva a cabo en total oscuridad y se observa la aparición de bandas durante aproximadamente 20 minutos.
6. Parada de la reacción colorimétrica: se lava la membrana con agua bidestilada o ultrapura; 3 lavados de 10 minutos cada vez.
7. Análisis densitométrico de la membrana de PVDF: una vez seca se digitalizó, utilizando una estación de análisis de imagen para aplicaciones colorimétricas y fluorescencia (*DNR Bio-Imaging Systems*), equipado con un software de captura (*Gel Capture*) y de cuantificación de geles y membranas de Western blot (*TotalLab TL-100, v2008*).



3.6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR-CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

La cuantificación de los niveles de ARNm es un aspecto importante en los estudios de expresión génica y en la comprensión de los distintos mecanismos que regulan la expresión génica. La cuantificación de ARNm de proBNP se realizó en 44 muestras de ventrículo izquierdo de pacientes sometidos a trasplante cardíaco diagnosticados con insuficiencia cardíaca y 5 muestras de donantes, previamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C , mediante la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Para ello las muestras tuvieron que seguir estos pasos previos a la amplificación:

1. Extracción de ARNm del tejido cardíaco, para la cual se utilizó el ensayo comercial Tri® Reagent (Sigma-Aldrich).
 - a. En primer lugar el tejido (peso aproximado de 25 mg) se lisa y homogeniza en presencia de tampón TRI (500 μl), que contiene tiocianato de guanidino y fenol, mediante el homogenizador (TissueLyser, QIAGEN) con bolas de tungsteno de 3 mm.
 - b. En segundo lugar, se produce la fase de separación (contenido proteico, contenido en ADN y contenido en ARN) añadiendo 1-bromo-3-cloropropano al homogenado y centrifugando a 11.000 rpm por 15 minutos a $2-8^{\circ}\text{C}$.
 - c. En tercer lugar, se trasvasa el sobrenadante a un tubo “eppendorf” nuevo. Se añade isopropanol y se centrifuga a 11.000 rpm durante 10 minutos a $2-8^{\circ}\text{C}$. El ARN forma un *pellet* en el fondo del tubo.
 - d. A continuación se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pellet* con 500 μL de etanol al 75%. Se centrifuga a 7.000 rpm durante 5 minutos a $2-8^{\circ}\text{C}$.
 - e. Por último, se aísla el ARN y se añade un volumen apropiado de agua, mezclando la solución sucesivas veces con una micropipeta.



2. Análisis de la calidad y concentración de ARN mediante el uso de una plataforma basada en microfluidos para la realización de la electroforesis (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) y con el uso de un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop, Thermo Scientific) para cuantificar la concentración de ARN en la muestra.
3. Transcripción reversa. El ARN es normalmente una molécula de una sola hebra, sensible al calor y no es un sustrato adecuado para la Taq polimerasa. Por eso, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) del ARN antes de iniciar la amplificación por PCR, generando una copia de la hebra de ARN, pero esta copia es ADN complementario (ADNc) el cual es estable al calor y puede ser amplificado por la Taq polimerasa.
 - Para realizar la transcripción reversa se usó el kit *High Capacity ADNc Archive* (Applied Biosystems), el cual contiene la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, que proporciona las cadenas de ADNc, junto con un inhibidor de la actividad RNase. Al final de la transcripción obtenemos un híbrido ADNc-ARNm, pero el ARNm no interfiere en posteriores amplificaciones por PCR, ya que es lábil al calor y no es sustrato de la Taq polimerasa.
 - La mezcla de reacción incluyó: 10x de tampón para la RT, 100 mM dNTP Mix, 1 µl de transcriptasa reversa, 2 µl de *primers*, 1 µl de inhibidor de RNasas y 3,2 µl de nucleasa libre de agua.
 - A un volumen de 10 µl de esta mezcla se le añaden a 10 µl de la solución que contienen 500 ng de RNA y se incubó a 25°C durante 10 minutos, a 37°C durante 120 minutos y se inactiva la enzima a 85°C durante 5 segundos. Posteriormente el ADNc obtenido se almacenó a -80°C.

Otro aspecto a tener en cuenta previo a la amplificación mediante PCR fue la elección de los cebadores los cuales se situaron flanqueando intrones para evitar contaminaciones con ADN genómico, dificultando su amplificación debido al gran tamaño del fragmento, y en el caso de que se produjesen poder detectar su presencia por análisis de la curva de desnaturalización o mediante electroforesis.



La reacción de PCR consta de tres fases: una fase inicial, donde la señal corresponde al ruido de fondo, una fase de crecimiento exponencial (la fluorescencia es proporcional al logaritmo de la cantidad de producto) y una fase “*plateau*” o de saturación. La información cuantitativa proviene de la fase exponencial, sólo 4 o 5 ciclos, de los 40 que suele constar la PCR, se encuentran en esta fase y contienen toda la información.

La PCR cuantitativa en tiempo real monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre, esto se hace usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad del producto amplificado. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Como se ha descrito, los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADNc en estudio (Walker 2002). Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo (Ct, *cycle threshold*) deben ser determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del *background* en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin *et al.*, 2005).

En nuestro caso hemos utilizado el termociclador 7900HT Fast Real-Time RT-PCR System (*Applied Biosciences*) usando como marcadores específicos fluorescentes las sondas TaqMan® (*Assays-on-Demand, Applied Biosystems*) que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos (Fig. 23). Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (“*quencher*”); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa



con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del “*quencher*” del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia que está relacionada con la cantidad de amplicón producido (Heid *et al.*, 1996) y que se cuantifica por un software que puede determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Dorak 2009).

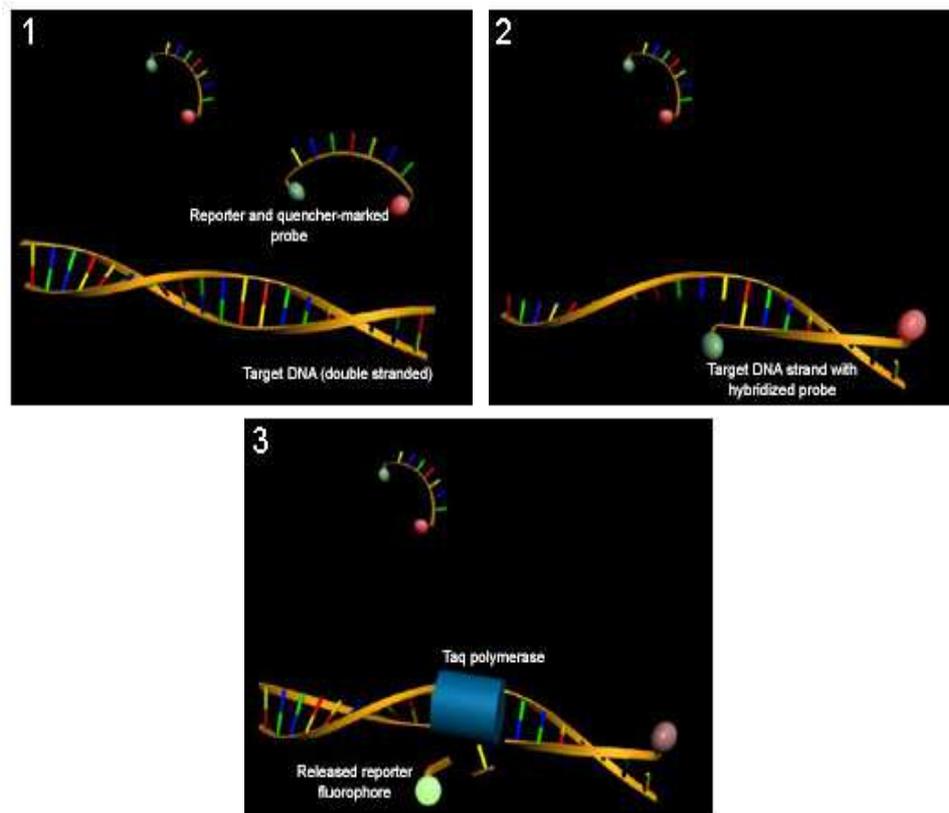


Figura 23. Mecanismo de acción de las sondas TaqMan. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 3' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 5' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (1). Cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia (2); cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del “*quencher*” del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia (3) (Heid *et al.*, 1996).



A continuación se realizó la cuantificación relativa de la expresión de mRNA de la molécula de proBNP. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl 2004). Hay que tener en cuenta que la expresión de los genes de referencia debe ser constante en las células estudiadas. Por esto, las secuencias utilizadas para la cuantificación relativa son generalmente genes “housekeeping”. En nuestro caso se utilizó como gen de referencia el gen de β -actina, y los cambios se cuantificaron mediante el modelo de Pfaffl (2001).

En este modelo las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los gen en estudio (“target” = proBNP) como para el gen de referencia (ref = β -actina) se toman en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t_{\text{target}}}(\text{control} - \text{muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t_{\text{ref}}}(\text{control} - \text{muestra})}}$$

En esta ecuación el ratio del gen en estudio se expresa en una muestra (corazones con miocardiopatía isquémica o dilatada) frente a un control (donantes) en comparación con un gen de referencia (β -actina). E_{target} representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de estudio (proBNP); E_{ref} representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia; $\Delta C_{t_{\text{target}}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen en estudio; y $\Delta C_{t_{\text{ref}}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen de referencia. En nuestro caso consideramos que la eficiencia de nuestro gen de estudio y del gen referencia es del 100%, dándole un valor de 2. Las muestras se ensayaron por triplicado y sólo una variabilidad menor al 5% se consideró aceptable.



4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (DS) para las variables continuas, y como porcentaje para las discretas. La normalidad de las variables se evaluó mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. La comparación de medias de dos grupos de variables continuas que mostraron una distribución normal se realizó mediante la prueba estadística *t-Student*, mientras que se empleó el test *U de Mann-Whitney* para las variables no normales. Al comparar las medias de tres o más grupos se empleó el test *ANOVA* o *Kruskal-Wallis* según las variables tuviesen una distribución normal o no. Se empleó el test *exacto de Fisher* para la comparación de variables categóricas.

Para estudiar la relación simple existente entre dos variables se realizó un análisis de regresión simple, utilizando como coeficientes de correlación (r) el de *Pearson* o *Spearman*. Posteriormente se analizó la influencia de varias variables independientes (covariables) sobre una variable dependiente (niveles de péptidos natriuréticos), mediante el análisis de regresión múltiple. Eligiéndose como mejor modelo el que presentó la " r^2 " más elevada.

La sensibilidad (ss), especificidad (sp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los niveles de péptidos natriuréticos en el diagnóstico de la insuficiencia cardiaca o disfunción ventricular sistólica ($FE \leq 40\%$), y el valor pronóstico para la mortalidad de origen cardiaco, se establecieron mediante la construcción de curvas ROC ("*Receiver Operating Characteristic Curves*"). Las áreas bajo la curva (ABC) de las curvas ROC de distintos parámetros se compararon mediante el método de *DeLong* y colaboradores (*DeLong et al.*, 1988).

Para el análisis del valor pronóstico de los péptidos natriuréticos en un seguimiento a 12 o 24 meses, se empleó la regresión binaria logística. Estableciéndose como variables dependientes los eventos de origen cardiaco (mortalidad + ingresos), o mortalidad cardiaca aislada, y como marcador de riesgo relativo utilizamos la "*odds-ratio*". También se analizó el pronóstico a 12 meses para eventos cardiacos o mortalidad cardiovascular aislada teniendo en cuenta la variable tiempo, para lo que se realizaron curvas de supervivencia *Kaplan-Meier*, comparándose mediante el estadístico *log-rank*, y regresiones de



Cox, cuyo riesgo relativo se mostró con el parámetro *Hazard Ratio*. Las curvas de supervivencia se construyeron estratificando los niveles de NT-proBNP en orina por encima o por debajo de los puntos de corte seleccionados de las curvas ROC para el pronóstico a 12 meses, así como en las regresiones de Cox donde los niveles de péptidos natriuréticos se codificaron como variables categóricas, por encima del punto de corte (curvas ROC).

Para analizar la concordancia de los niveles de NT-proBNP en suero y orina en dos intervalos de tiempo diferentes (basal; 12 meses o estadio I; y 24 meses o estadio II), se utilizó el método de *Bland & Altman*, 1986. Representando el porcentaje de cambio de las medias [(NT-proBNP en el estadio I – NT-proBNP en basal) / (media NT-proBNP en estadio I + media NT-proBNP en basal)] frente la media de las determinaciones de NT-proBNP en los dos estadios. Este modelo de *Bland & Altman* es útil para normalizar y comparar los datos sin tener en cuenta la magnitud de la medida de NT-proBNP. Basándose en esta aproximación, se determinaron los límites de concordancia por la diferencia de la media más o menos el coeficiente de reproducibilidad (CR), donde éste se calculó como 1,96 x DS del porcentaje de cambio. En este caso, un CR alto indica una baja reproducibilidad.

Se consideró estadísticamente significativo un “p valor” menor de 0,05 para todos los modelos. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SPSS 10.1 (*“Statistical Package for Social Sciences”, SPSS Inc., Chicago, Illinois*).



IV. RESULTADOS

“El espíritu vital tiene su propio origen en el ventrículo izquierdo del corazón, y los pulmones tienen un papel importante en su desarrollo. Se trata de un espíritu enrarecido, producido por la fuerza del calor, de color amarillo rojizo (flavo) y de potencia igual a la del fuego. De manera que es una especie de vapor de sangre muy pura que contiene en sí mismo las sustancias del agua, aire y fuego. Se genera en los pulmones a partir de una mezcla de aire inspirado con la sangre elaborada y ligera que el ventrículo derecho del corazón comunica con el izquierdo. Sin embargo, esta comunicación no se realiza a través de la pared central del corazón, como comúnmente se cree, sino que, a través de un sistema muy ingenioso, la sangre fluye durante un largo recorrido a través de los pulmones. Elaborada por los pulmones, adquiere el tono amarillo rojizo y se vierte desde la arteria pulmonar hasta la vena pulmonar. Entonces, una vez en la vena pulmonar, se mezcla con aire inspirado y a través de la espiración se libera de sus impurezas. Así, completamente mezclada y preparada correctamente para la producción del espíritu vital, es impulsada desde el ventrículo izquierdo del corazón por medio de la diástole...”

*Descripción de la Circulación Menor
“Christianismi Restitutio” (Restitución del Cristianismo) (1546)
Miguel Servet (1511 – 1553)*



1. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE NT-proBNP CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1. FUNCIÓN DIASTÓLICA VENTRICULAR. VELOCIDAD MÁXIMA DE RELAJACIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-proBNP EN SUERO

La población de estudio incluyó 97 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca (65 ± 13 años, 72% varones). La etiología de la IC en nuestros pacientes fue la miocardiopatía isquémica ($n=44$, 45,4%), miocardiopatía dilatada ($n=39$, 40,2%), miocardiopatía hipertensiva ($n=13$, 13,4%) y enfermedad valvular ($n=1$, 1%). De los 97 pacientes, 56 (58%) eran hipertensos y 39 (40%) diabéticos. Recibían tratamiento médico con diuréticos 79%, con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina un 70%, con bloqueadores beta un 62%, con antagonistas de la aldosterona un 48%, con digoxina un 24%, con calcioantagonistas el 15%, y con antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) el 17%.

En el grupo de pacientes con IC y una fracción de eyección (FE) $\leq 40\%$ ($n=62$, edad media 65 ± 13 años) el valor medio para la velocidad máxima de relajación (RVm) fue de 20 ± 7 mm/s, para el desplazamiento del plano aurículoventricular (DPAV) fue $6,9 \pm 1,5$ mm, para la FE 29 ± 6 %, para la velocidad de propagación del flujo transmitral (Vp) fue 31 ± 9 cm/s, para el cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardío en diástole (E/A) fue $1,3 \pm 0,9$, tiempo de deceleración (TD) 181 ± 51 ms, y los niveles promedio de NT-proBNP sérico fueron 1.766 ± 2.057 pg/mL. En los pacientes diagnosticados de IC con una FE $>40\%$ ($n=35$, edad media 66 ± 14 años) encontramos una RVm de 29 ± 15 mm/s, un DPAV de $9,3 \pm 1,3$ mm, una FE igual a 49 ± 6 , una Vp de 37 ± 13 cm/s, un E/A igual a $0,8 \pm 0,3$, un TD de 212 ± 60 ms, y una concentración sérica de NT-proBNP igual a 580 ± 745 pg/mL.

La figura 1 muestra la correlación entre los niveles de NT-proBNP en suero y la RVm en ambos grupos (FE $\leq 40\%$ y FE $>40\%$). Además, correlacionamos la RVm con los distintos parámetros de función ventricular estudiados, y también con NT-proBNP en pacientes con FE $\leq 40\%$ o $>40\%$



(Tabla 1). Estas correlaciones también se analizaron en pacientes con una FE $>50\%$ y $\leq 50\%$ y, aunque el número de pacientes con una FE $>50\%$ fue pequeño ($n=15$), los resultados no fueron diferentes significativamente.

Se hipotetizó que la velocidad máxima de relajación (RVm) podría ser útil en la clasificación funcional de los pacientes. Por ello, analizamos los valores de la RVm en las distintas clases funcionales de la NYHA en los pacientes estudiados, encontrando que la RVm fue 40 ± 22 mm/s en la clase funcional NYHA I, 22 ± 7 mm/s en la clase NYHA II, y 20 ± 11 mm/s en la NYHA III, con una significación estadística de $p < 0,0001$ (siendo entre la clase NYHA I frente a NYHA II y III de $p < 0,0001$).

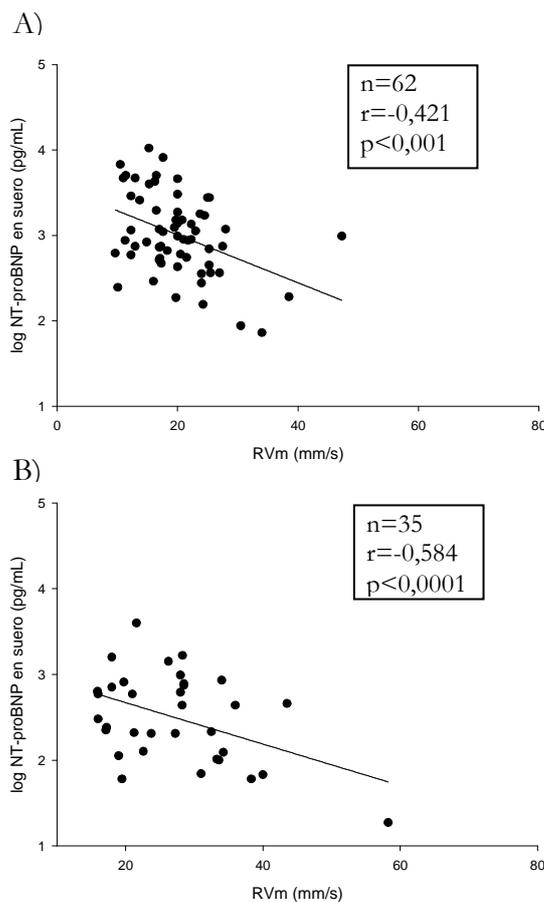


Figura 1. Relación entre el logaritmo de los niveles de NT-proBNP en suero y la velocidad máxima de relajación (RVm) en pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca con una FE $\leq 40\%$ (A) o con una FE $>40\%$ (B).



Tabla 1. Coeficientes de correlación de la velocidad máxima de relajación (RVm) en pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca con FE \leq 40% o FE $>$ 40%.

	FE \leq 40% (n=62)		FE $>$ 40% (n=35)	
	Coefficiente de Pearson (r)	p valor	Coefficiente de Pearson (r)	p valor
Edad (años)	-0,112	NS	-0,602	$<$ 0,0001
DPAV (mm)	0,543	$<$ 0,0001	0,589	0,001
Vp (cm/s)	0,132	NS	0,401	0,02
E/A	0,143	NS	0,533	0,006
TD (ms)	-0,124	NS	-0,323	NS
FE (%)	0,447	0,005	0,247	NS

DPAV: desplazamiento del plano aurículoventricular; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardía en diástole del ventrículo izquierdo; FE: fracción de eyección; TD: tiempo de deceleración; Vp: velocidad de propagación del flujo mitral.

Por otro lado, se realizó una regresión lineal múltiple para determinar el poder predictivo independiente de la RVm sobre los niveles de NT-proBNP en suero en pacientes con IC. El modelo fue ajustado por la edad, FE y E/A, obteniéndose que la RVm estaba relacionada inversamente con los niveles de NT-proBNP (r^2 ajustada=0,544, $p<$ 0,0001). Cuando el mismo análisis múltiple se realizó en el subgrupo de pacientes con una FE $>$ 40%, se encontró una r^2 ajustada de 0,434 ($p<$ 0,0001). Teniendo en cuenta la medicación empleada (diuréticos, IECA, bloqueadores beta, antagonistas de la aldosterona, digoxina, bloqueadores de los canales de calcio, y antagonistas de los receptores de angiotensina II) en el análisis múltiple, no encontramos cambios en la relación entre RVm y la concentración de NT-proBNP en suero, tanto en todo el grupo de pacientes diagnosticados de IC como en los pacientes con una FE $>$ 40%.

1.2. FUNCIÓN VENTRICULAR. VALORES DE LAS ÁREAS TELEDIASTÓLICA Y TELESISTÓLICA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-PROBNP EN SUERO

Se estudiaron un total de 106 sujetos (edad 64 ± 13 años, 74% varones) diagnosticados de insuficiencia cardiaca (IC). El 45% de nuestros pacientes tenían miocardiopatía isquémica (n=48), el 39% miocardiopatía dilatada (n=41), el 13% miocardiopatía hipertensiva (n=14) y el 3% enfermedad valvular (n=3). Se determinaron las relaciones entre NT-proBNP en suero y las



áreas en dos dimensiones del ventrículo izquierdo (VI) en pacientes diagnosticados de IC, comparando etiología isquémica y dilatada.

Al correlacionar los niveles de NT-proBNP con el área telediastólica del VI (ATD) y telesistólica (ATS) se encontró una $r=0,223$ ($p<0,05$) y una $r=0,364$ ($p<0,0001$), respectivamente. Al normalizar el ATD y el ATS por la superficie corporal y correlacionar los índices obtenidos con los niveles de NT-proBNP, se obtuvo $r=0,384$ ($p<0,0001$) para el índice del área al final de la diástole (IATD), y una $r=0,502$ ($p<0,0001$) al final de la sístole (IATS) (Fig. 2). Cuando se analizó la correlación entre la fracción de cambio del área del VI (FCA) con los niveles de NT-proBNP en suero se obtuvo una correlación negativa de $r=-0,514$ ($p<0,0001$).

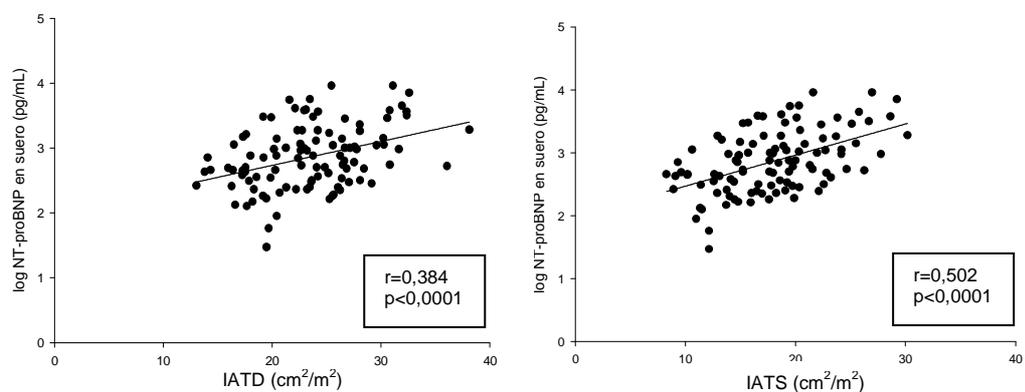


Figura 2. Correlación del las áreas del ventrículo izquierdo al final de la diástole (A) y al final de la sístole (B) con el logaritmo de la concentración sérica de NT-proBNP (pg/mL) en pacientes con insuficiencia cardiaca ($n=106$). IATD: índice del área en telediástole; IATS: índice del área en telesístole.

Por otro lado, la Tabla 2 muestra los resultados obtenidos cuando se compararon las áreas del VI en pacientes con IC según su etiología fuese dilatada o isquémica. Los valores obtenidos en los pacientes con miocardiopatía dilatada fueron más altos que en pacientes con miocardiopatía isquémica, obteniéndose diferencias significativas sólo con el IATD. Los niveles de NT-proBNP fueron similares en ambos grupos.

**Tabla 2.** Valores de las áreas del ventrículo izquierdo en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico y dilatado

	Miocardiopatía dilatada (n=41)	Miocardiopatía isquémica (n=48)	p valor
ATS (cm ²)	35 ± 9	33 ± 8	NS
IATS (cm ² /m ²)	20 ± 6	18 ± 4	NS
ATD (cm ²)	46 ± 10	43 ± 9	NS
IATD (cm ² /m ²)	26 ± 6	23 ± 4	<0,05
FCA (%)	23 ± 9	23 ± 7	NS
NT-proBNP (pg/mL)	1370 ± 1955	1461 ± 1759	NS

Los datos se expresan como media ± DS. ATD: área telediastólica del ventrículo izquierdo; ATS: área telesistólica del ventrículo izquierdo; FCA: fracción de acortamiento del área del ventrículo izquierdo; IATD: índice del área en telediástole; IATS: índice del área en telesístole; NT-proBNP: fragmento N-terminal de BNP.

Los coeficientes de correlación entre las áreas del VI y la concentración de NT-proBNP en suero se calcularon ambos en la miocardiopatía dilatada e isquémica. En el grupo de pacientes con miocardiopatía dilatada, los niveles de NT-proBNP estuvieron correlacionados con ATD ($r=0,546$), ATS ($r=0,601$), IATD ($r=0,623$), IATS ($r=0,743$) y con FCA ($r=-0,623$), todas ellas con una significación de $p<0,001$. Sin embargo, en los pacientes con miocardiopatía isquémica, los niveles de NT-proBNP estuvieron correlacionados exclusivamente con IATS ($r=0,334$; $p<0,05$) y FCA ($r=-0,423$; $p<0,01$).

Por último, se realizó una regresión lineal múltiple para analizar el poder predictivo de IATD, IATS, FCA y otras variables sobre los niveles de NT-proBNP en pacientes con IC (Tabla 3). El mejor modelo asociado con el *biomarcador* se ajustó por IATS, IMC, edad y FCA, con una $r^2 = 0,534$; $p<0,001$.

Tabla 3. Resultados de la regresión lineal múltiple entre los niveles de NT-proBNP en suero y las áreas del ventrículo izquierdo.

Variable	Beta	ES	p valor
IATS (cm ² /m ²)	0,029	0,010	0,004
IMC (kg/m ²)	-0,017	0,007	0,021
Edad (años)	0,015	0,003	<0,0001
FCA (%)	-0,015	0,006	0,013

La regresión lineal múltiple incluyó las áreas del ventrículo izquierdo y sus índices derivados, género, edad, velocidad de propagación del flujo mitral (Vp) y el índice de masa corporal (IMC) como variables independientes, con el logaritmo de NT-proBNP en suero como variable dependiente.



2. RELACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP CON *big* ENDOTELINA-1 Y ALDOSTERONA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La población de estudio incluyó 103 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca (63 ± 13 años, 73% varones). La etiología de la insuficiencia cardiaca en nuestros pacientes fue la miocardiopatía dilatada ($n=44$, 43%), miocardiopatía isquémica ($n=43$, 41%), miocardiopatía hipertensiva ($n=13$, 13%) y enfermedad valvular ($n=3$, 3%). De los 103 pacientes, 44 (43%) eran hipertensos y 39 (38%) diabéticos. Recibían un tratamiento médico con diuréticos el 79%, con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) el 74%, con bloqueadores beta el 51%, con antagonistas de la aldosterona el 46%, con digoxina el 33%, con calcioantagonistas el 15%, y con antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) el 14%.

Para toda la población la concentración de NT-proBNP fue 1.262 ± 1.570 pg/mL, de *big* ET-1 fue $1,03 \pm 0,75$ fmol/mL, y de aldosterona 168 ± 102 pg/mL. Los niveles de NT-proBNP mostraron una correlación positiva con los niveles de *big* ET-1 ($r=0,512$; $p<0,0001$) (Fig. 3). Cuando correlacionamos ambos marcadores bioquímicos en el subgrupo de pacientes con miocardiopatía dilatada obtuvimos una mayor correlación de $r=0,627$ ($p<0,0001$), mientras que en el grupo de pacientes con miocardiopatía isquémica la correlación fue de $r=0,332$ ($p=0,034$).

Al dividir los niveles de NT-proBNP en cuartiles (Q1: 212 ± 59 pg/mL; Q2: 462 ± 89 pg/mL; Q3: 997 ± 233 pg/mL; Q4: 3.925 ± 1.597 pg/mL) y comparar los valores de *big* ET-1 en cada subgrupo (Q1: $0,80 \pm 0,30$ fmol/mL; Q2: $1,05 \pm 0,97$ fmol/mL; Q3: $0,83 \pm 0,38$ fmol/mL; Q4: $1,70 \pm 1,3$ fmol/mL), obtuvimos un nivel de significación de $p<0,01$.

Por último, al analizar la relación entre la concentración sérica de NT-proBNP con los niveles plasmáticos de aldosterona, no encontramos una correlación significativa ($r=0,08$; $p=0,686$). Tampoco encontramos diferencias significativas al comparar los valores de aldosterona (Q1: 204 ± 220 pg/mL; Q2: 158 ± 120 pg/mL; Q3: 192 ± 179 pg/mL; Q4: 151 ± 123 pg/mL; $p=0,759$), con los cuartiles de NT-proBNP.

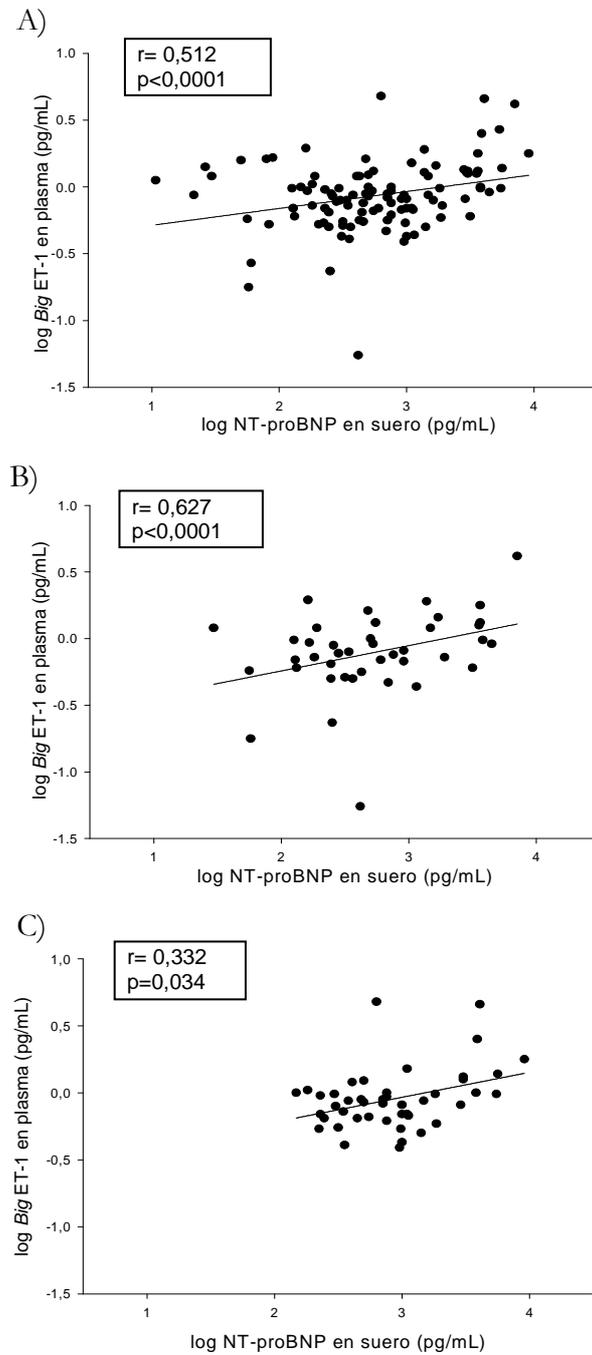


Figura 3. Correlación directa entre el logaritmo de la concentración sérica de N-terminal propeptido natriurético tipo B [log NT-proBNP (pg/mL)] y el logaritmo de *big* endotelina-1 [log *big* ET-1 (pg/mL)] en nuestro grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca (n=103) (A), con miocardiopatía dilatada (n=44) (B), y miocardiopatía isquémica (n=43) (C). Los pacientes (n=14) que tuvieron miocardiopatía hipertrófica o valvular no estuvieron representados en esta figura.



3. INFLUENCIA DE LA OBESIDAD SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

Se estudiaron 111 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca (64 ± 13 años, 71% varones). Como indicador de obesidad se utilizó el índice de masa corporal (IMC), que se calculó como el peso en kilos (kg) dividido por la altura en metros al cuadrado (m^2). Estableciéndose como punto de corte para definir la obesidad valores para el $IMC \geq 30 \text{ kg}/m^2$ (WHO 2000). En nuestro estudio, 34 pacientes eran obesos (31%) y 77 no obesos (69%) (Tabla 4).

Tabla 4. Características de la población diagnosticada de insuficiencia cardiaca (n=111)

Variables	Obesos (n=34)	No obesos (n=77)	p valor
Edad (años)	63 ± 14	65 ± 13	NS
Género (M/V)	8/26	23/54	NS
PAS (mm Hg)	133 ± 23	125 ± 19	NS
IMC (kg/m^2)	34 ± 4	26 ± 2	<0,001
Fumadores	5 (16%)	6 (8%)	NS
Diabetes mellitus	8 (25%)	34 (43%)	NS
Hipertensión	20 (59%)	34 (44%)	NS
Colesterol total (mg/dL)	211 ± 40	186 ± 43	<0,01
Creatinina plasmática (mg/dL)	$1,11 \pm 0,34$	$1,13 \pm 0,32$	NS
Miocardopatía isquémica	13 (38%)	35 (45%)	NS
Miocardopatía dilatada	13 (38%)	32 (42%)	NS
Miocardopatía hipertensiva	8 (24%)	7 (9%)	NS
Enfermedad Valvular	0	3 (4%)	NS
Clase funcional (NYHA I / II / III)	(3 / 27 / 4)	(6 / 55 / 16)	NS
Tratamiento			
Bloqueadores beta	20 (65%)	33 (43%)	NS
Diuréticos	27 (87%)	60 (77%)	NS
IECA	20 (65%)	60 (78%)	NS
Calcioantagonistas	4 (13%)	12 (16%)	NS
Digoxina	8 (26%)	25 (32%)	NS
Antagonistas de la aldosterona	15 (48%)	32 (42%)	NS
ARA II	7 (23%)	11 (14%)	NS
FE (%)	40 ± 10	37 ± 11	NS
E/A	$1,10 \pm 0,54$	$1,01 \pm 0,63$	NS

Los datos se expresan como media \pm DS, o número de pacientes y porcentaje. ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardía en diástole del ventrículo izquierdo; FE: fracción de eyección; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; IMC: índice de masa corporal; NYHA: New York Heart Association; PAS: presión arterial sistólica.



El nivel de colesterol así como el de IMC (por definición) fue más elevado en el grupo de pacientes obesos, ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes en cada clase funcional (NYHA), en el número de pacientes según la etiología de la insuficiencia cardíaca, ni en los tratamientos farmacológicos recibidos entre obesos y no obesos (Tabla 4).

La media de los niveles séricos de NT-proBNP fue significativamente menor en el grupo de pacientes obesos (617 ± 512 pg/mL) frente al grupo de no obesos (1.683 ± 2.007 pg/mL), $p < 0,01$ (Fig. 4). Los pacientes obesos tuvieron un descenso en la concentración de NT-proBNP en suero del 63%.

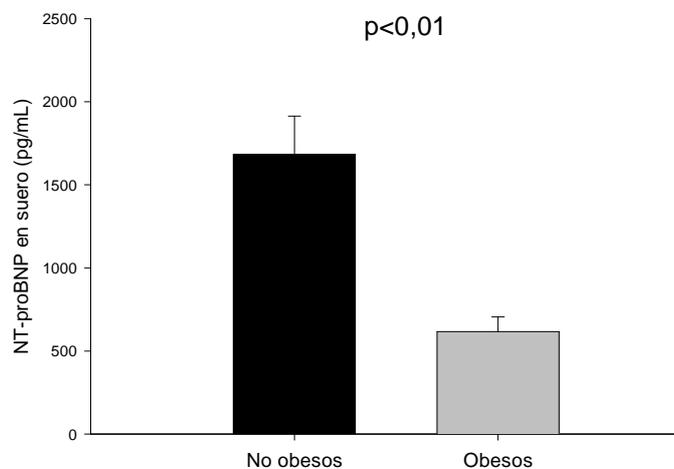


Figura 4. Valores séricos de NT-proBNP en pacientes no obesos ($n=77$) y obesos ($n=34$) con IC (media \pm ESM). IC, insuficiencia cardíaca

El descenso en los niveles de NT-proBNP a lo largo de las categorías establecidas por el IMC se observó tanto en el grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico como dilatado (Fig. 5). Los niveles de NT-proBNP en el grupo de isquémicos descendió un 65% en los obesos (632 ± 114 pg/mL) frente a los no obesos (1.799 ± 341 pg/mL, $p < 0,05$). En pacientes con miocardiopatía dilatada se encontró también un descenso del 65% en la concentración de NT-proBNP en suero, (557 ± 173 pg/mL vs. 1.589 ± 390 pg/mL, $p < 0,05$).

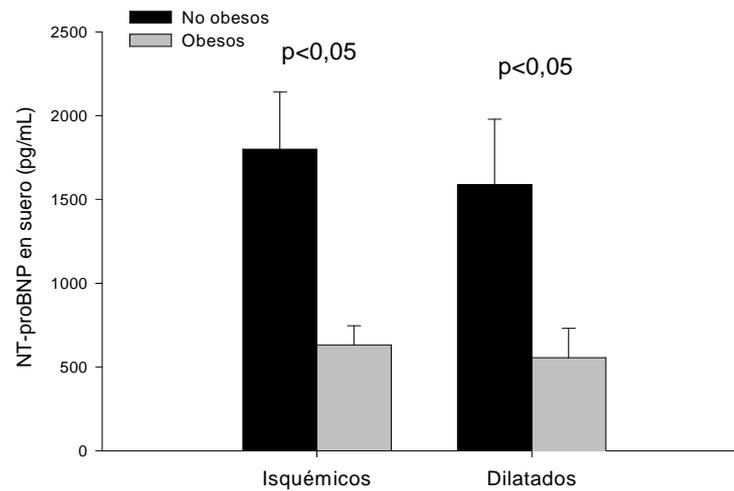


Figura 5. Niveles séricos de NT-proBNP (media \pm ESM) en pacientes no obesos y obesos con miocardiopatía isquémica (n=48) y dilatada (n=45).

Al realizar un análisis de regresión lineal múltiple, ajustando el modelo por edad, función sistólica (FE) y diastólica (E/A), el IMC se correlacionó inversamente con los niveles plasmáticos de NT-proBNP ($p=0,049$) (Tabla 5). La obesidad se asoció con un descenso del 17% en los niveles séricos del péptido natriurético en los pacientes obesos con IC ($p=0,036$) (Tabla 5). Teniendo en cuenta la medicación en el análisis múltiple (bloqueadores beta, IECA, diuréticos, antagonistas de la aldosterona y digoxina), así como factores de riesgo (hipertensión y diabetes mellitus), no se encontraron cambios en la asociación entre la obesidad e IMC con los niveles de NT-proBNP en suero. La distinta etiología de la IC tampoco influyó en el efecto de la obesidad sobre los niveles de NT-proBNP.

Por último, se correlacionó parámetros de función ventricular con niveles de NT-proBNP en suero en el grupo de pacientes obesos (Tabla 6). Obteniéndose buena correlación con los parámetros de función ventricular sistólica [fracción de eyección (FE) e índice de volumen telesistólico (IVTS)] y función diastólica como el índice de volumen telediastólico (IVTD). Sin embargo, el E/A (parámetro diastólico) no mostró una correlación significativa



Tabla 5. Resultados de la regresión lineal múltiple sobre el efecto de la obesidad e IMC sobre los niveles de NT-proBNP en suero (pg/mL).

Variable	β	(ES)	p valor
Log NT-proBNP sérico			
IMC continuo	-0,020	0,008	0,049
Categorías IMC			
No obesos (< 30 Kg/m ²)	referencia	referencia	
Obesos (\geq 30 Kg/m ²)	-0,184	0,086	0,036

Modelo estadístico ajustado por edad, FE y E/A. El efecto sobre los niveles de NT-proBNP en suero se estimó por el exponente del coeficiente β . La obesidad se asoció con un 17% de reducción en los niveles de NT-proBNP, ($e^{-0.184}=0,83$; $1-0.83=0,17$).

con los niveles de NT-proBNP en suero. También se correlacionó el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) y el desplazamiento del plano aurículoventricular (DPAV), parámetro sensible a cambios en la función sistólica y diastólica, con los niveles de NT-proBNP.

Tabla 6. Correlaciones simples de NT-proBNP en suero con parámetros de función ventricular en pacientes obesos con insuficiencia cardiaca.

	Coefficiente de correlación	p valor
Fracción de eyección (%)	$r=-0,468$	0,008
Cociente E/A	$r=0,046$	NS
Índice de volumen telediastólico (mL/m ²)	$r=0,461$	0,009
Índice de volumen telesistólico (mL/m ²)	$r=0,348$	0,033
Desplazamiento del plano aurículoventricular (mm)	$r=-0,373$	0,039
Índice de masa del ventrículo izquierdo	$r=0,548$	0,001

E/A: cociente velocidad de llenado temprano y tardío en diástole del ventrículo izquierdo.



4. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE NT-proBNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Se estudiaron un total de 116 sujetos, de estos 96 pacientes (edad 66 ± 12 años, 71% varones) diagnosticados de insuficiencia cardíaca (IC) y 20 controles pareados por edad y sexo (61 ± 8 años, 68% varones). El 45% de nuestros pacientes tenían miocardiopatía isquémica, el 39% miocardiopatía dilatada, el 13% miocardiopatía hipertensiva y el 3% enfermedad valvular.

Al comparar los niveles urinarios y séricos de NT-proBNP entre los pacientes y grupo control, se encontraron diferencias significativas en ambos casos ($p < 0,0001$) como muestra la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación de los niveles de NT-proBNP en orina y suero entre pacientes con insuficiencia cardíaca y sujetos control

Variables	Pacientes (n=96)	Controles (n=20)	p valor
Niveles de NT-proBNP (pg/mL)			
Suero	1.406 ± 1.821	36 ± 24	$<0,0001$
Orina	94 ± 31	67 ± 6	$<0,0001$

Datos expresados como media \pm DS. NT-proBNP: fragmento N-terminal de BNP.

Además, en el grupo de pacientes los niveles de NT-proBNP en suero fueron mayores que los niveles urinarios, mientras que en el grupo control los niveles del péptido natriurético fueron más altos en la orina. Los niveles séricos de NT-proBNP mostraron una buena correlación con los urinarios ($r=0,78$; $p < 0,0001$), para toda la población de estudio (Fig. 6). En el grupo de pacientes con IC la correlación fue $r=0,66$, ($p < 0,0001$). Sin embargo, en el grupo control los niveles urinarios y séricos no estuvieron correlacionados significativamente.

La curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de los niveles de NT-proBNP en orina para detección de IC obtuvo un área bajo la curva (ABC) de $0,96 \pm 0,02$, $p < 0,0001$ (Fig. 7). Cuando realizamos la curva ROC para los niveles séricos de NT-proBNP se obtuvo un ABC ligeramente superior ($0,98 \pm 0,01$; con un valor $p=0,061$ al comparar las ABC de los dos tipos de muestras) (Fig. 7). El punto de corte óptimo extraído de la curva ROC para NT-proBNP en orina fue de $74,23$ pg/mL, con sensibilidad de 93% y especificidad de 95%

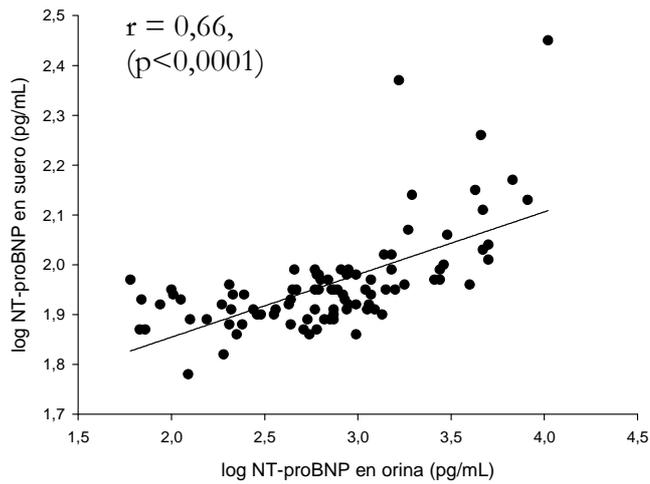


Figura 6. correlación entre el log de la concentración de NT-proBNP en suero y orina, en nuestro grupo de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca (n=96).

para la detección de insuficiencia cardíaca. Los valores predictivos positivo y negativo fueron de 90% y 94%, respectivamente. Para la concentración en suero de NT-proBNP el punto de corte óptimo fue 93,85 pg/mL, con sensibilidad y especificidad de 93% y 100%, respectivamente. Los valores predictivos positivo y negativo fueron 96% y 100%.

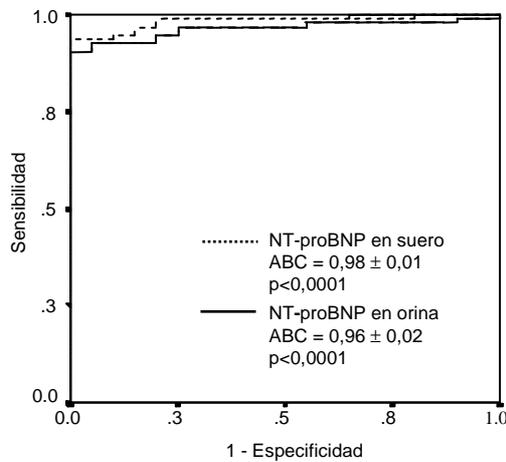


Figura 7. Curva ROC de la concentración de NT-proBNP en suero y orina para la detección de insuficiencia cardíaca.



En el apartado anterior hemos establecido que la obesidad disminuye los niveles séricos de NT-proBNP en pacientes con IC. En concordancia con este hallazgo, los niveles en orina de NT-proBNP son menores en el grupo de pacientes obesos frente a los no obesos ($84,7 \pm 9,8$ pg/mL vs. $98,7 \pm 35,7$ pg/mL, $p=0,007$) (Fig. 8).

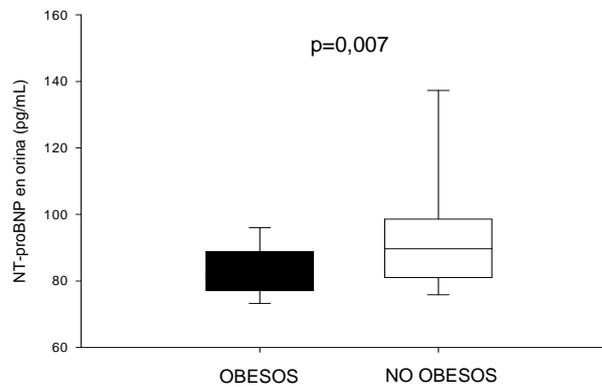


Figura 8. El gráfico de cajas ilustra los niveles urinarios de NT-proBNP en pacientes obesos y no obesos con insuficiencia cardíaca. Las cajas muestran la mediana (línea horizontal), rango intercuartílico (límites superior e inferior de las cajas), y el percentil 5 y 95 (barras de error).

Además, se realizó una regresión lineal múltiple para evaluar el valor predictivo independiente de la obesidad sobre los niveles urinarios de NT-proBNP en estos pacientes. Sin embargo, el modelo ajustado por edad, género, NT-proBNP en suero, creatinina plasmática, FE y E/A, no incluyó la obesidad como factor independiente, sino los niveles de NT-proBNP en suero ($p<0,0001$) y la creatinina ($p=0,016$), alcanzando una r^2 ajustada de 0,764.

La Figura 9A muestra los valores de NT-proBNP en orina en relación con la clase funcional según las NYHA (NYHA I: 77 ± 10 pg/mL, NYHA II: 88 ± 16 pg/mL, NYHA III: 123 ± 51 pg/mL; $p<0,0001$). Los valores de NT-proBNP se elevaron en clases funcionales más deterioradas, además hubo diferencias significativas entre pacientes en clase funcional NYHA I y el grupo control (77 ± 10 pg/mL vs. 67 ± 6 pg/mL, $p=0,006$). Los resultados obtenidos para los valores séricos fueron (NYHA I: 312 ± 369 pg/mL, NYHA II: 1.063 ± 1.201 pg/mL, NYHA III: 2.989 ± 2.084 pg/mL, $p<0,0001$) (Fig. 9B).

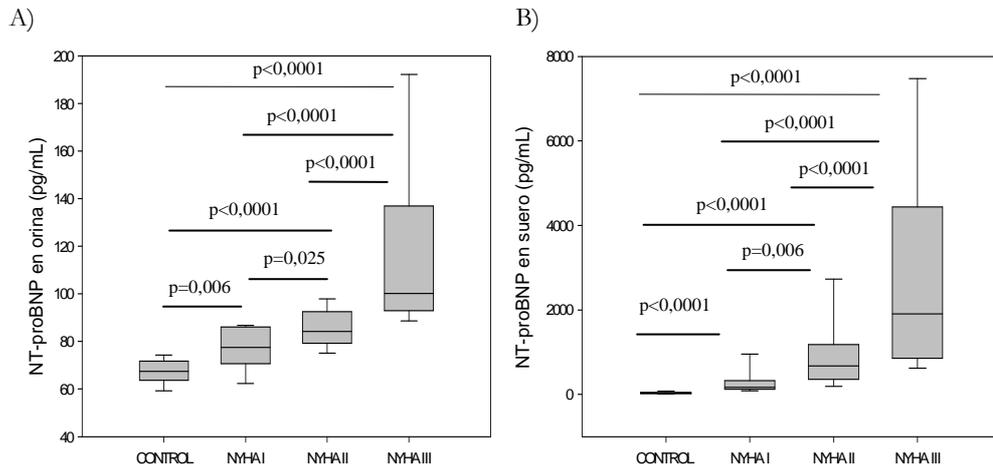


Figura 9. Distribución de los niveles de NT-proBNP en orina (A) y en suero (B) de acuerdo al grado de clase funcional (NYHA). Las cajas muestran la mediana (barra horizontal), el rango intercuartílico (límites superior e inferior de las cajas), y el percentil 5 y 95 (barras de error).

Por otra parte, para analizar el poder de predicción para eventos cardíacos (mortalidad cardíaca o ingresos) se realizaron curvas ROC para los niveles de NT-proBNP en orina y suero. La concentración urinaria mostró un ABC de $0,67 \pm 0,07$ ($p=0,011$), mientras que en suero fue ligeramente superior $0,70 \pm 0,06$ ($p=0,003$); con una $p=0,657$ al comparar las ABC de los dos tipos de muestras (Fig. 10). Los puntos de corte óptimos extraídos de la curva ROC fueron de 90,3 pg/mL, con sensibilidad 60% y especificidad 70%; y 791 pg/mL, con sensibilidad y especificidad de 70% y 67%, respectivamente.

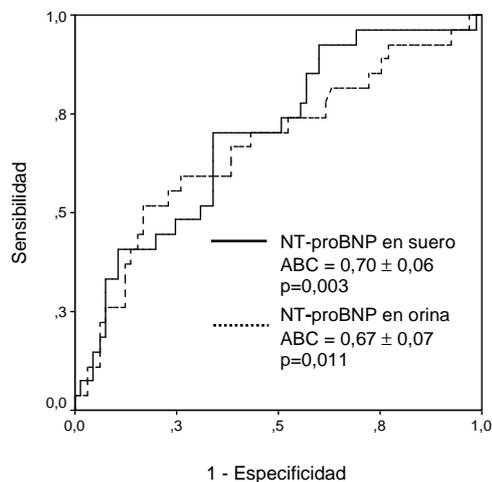


Figura 10. Curva ROC de los niveles de NT-proBNP en suero y orina para predecir los eventos combinados (mortalidad o ingresos) de origen cardíaco en un periodo de 12 meses.



Además, se realizó una regresión binaria logística para analizar si los niveles de NT-proBNP en orina eran predictores independientes de eventos cardiacos (ingresos o mortalidad) en un seguimiento a 12 meses. El modelo incluyó niveles urinarios de NT-proBNP, edad, clase funcional (NYHA), obesidad y FE como variables independientes. Se obtuvo que niveles en orina de BNP eran un fuerte predictor de eventos de origen cardiaco ($p=0,011$), con *odds ratio* de 4,5.

La Figura 11 muestra la curva ROC de NT-proBNP en orina para la predicción de mortalidad cardiovascular a 12 meses, con un ABC de $0,75 \pm 0,10$ ($p=0,015$); punto de corte óptimo de 92,61 pg/mL, 78% de sensibilidad y 71% de especificidad. Los niveles séricos del péptido mostraron un ABC ligeramente superior ($0,80 \pm 0,09$, $p=0,004$) para la detección de mortalidad cardiaca ($p=0,569$ al comparar las ABC de los dos tipos de muestras). Con un punto de corte de 978 pg/mL, con sensibilidad y especificidad de 78 y 70%

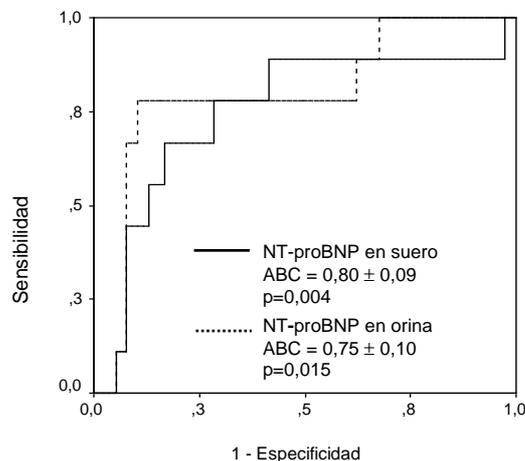


Figura 11. Curva ROC de los niveles de NT-proBNP en suero y orina para predecir la mortalidad de origen cardiaco en un periodo de 12 meses.

Además, para analizar el porcentaje de eventos cardiacos (mortalidad o ingresos) y la mortalidad cardiaca aislada en relación a la concentración de NT-proBNP en orina en el grupo de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca, se clasificaron a los pacientes en dos grupos según sus niveles de NT-proBNP estuviesen por encima o por debajo de 92,61 pg/mL (punto de corte



escogido de la curva ROC de NT-proBNP en orina para predecir la mortalidad cardiaca). El número de eventos cardiacos en el grupo de pacientes con niveles de NT-proBNP menor que 92,61 pg/mL fue 14 (21%), frente a 16 (52%) en el grupo de pacientes con NT-proBNP mayor o igual que 92,61 pg/mL ($p=0,006$). Cuando se comparó la mortalidad cardiaca aislada, también se encontraron diferencias significativas ($p=0,006$) (Tabla 8).

Tabla 8. Eventos cardiacos según el punto de corte de 92,61 pg/mL para NT-proBNP en orina en nuestros pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca.

Variables	NT-proBNP <92,61 pg/mL (n=65)	NT-proBNP \geq 92,61 pg/mL (n=31)	p valor
Eventos	14 (21%)	16 (52%)	0,006
Mortalidad	3 (4%)	7 (24%)	0,006

Datos expresados como número de pacientes y porcentaje. Los eventos cardiacos incluyen: ingresos y mortalidad de origen cardiaco. NT-proBNP: fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B.

Los pacientes se vigilaron analítica y clínicamente durante 12 meses ($11,4 \pm 1,7$ meses). Un total de 10 pacientes fallecieron (10,7%), mientras que 30 pacientes (31,2%) sufrieron un evento combinado (ingreso o muerte).

Por último, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los eventos combinados (mortalidad o ingresos) de origen cardiaco mostraron que la concentración de NT-proBNP en suero por encima del punto de corte escogido de la curva ROC (791 pg/mL) tuvo una más pronta aparición de eventos ($9,4 \pm 0,5$ frente a $11,2 \pm 0,3$ meses; $p=0,002$). Los niveles urinarios de la molécula por encima de 90 pg/mL también mostraron esta tendencia ($9,4 \pm 0,6$ frente a $10,9 \pm 0,3$ meses; $p=0,008$) (Fig. 12). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para la mortalidad cardiaca mostraron también que los niveles de NT-proBNP en suero por encima del punto de corte de la curva ROC (978 pg/mL), tuvieron un peor pronóstico (supervivencia media $10,9 \pm 0,4$ frente a $11,9 \pm 0,08$ meses; $p=0,009$), así como los niveles de orina de NT-proBNP mayores de 92,6 pg/mL (supervivencia media $10,8 \pm 0,4$ frente a $11,9 \pm 0,07$ meses; $p=0,003$), al compararlos con el grupo de pacientes con menores niveles de NT-proBNP (Fig. 13).

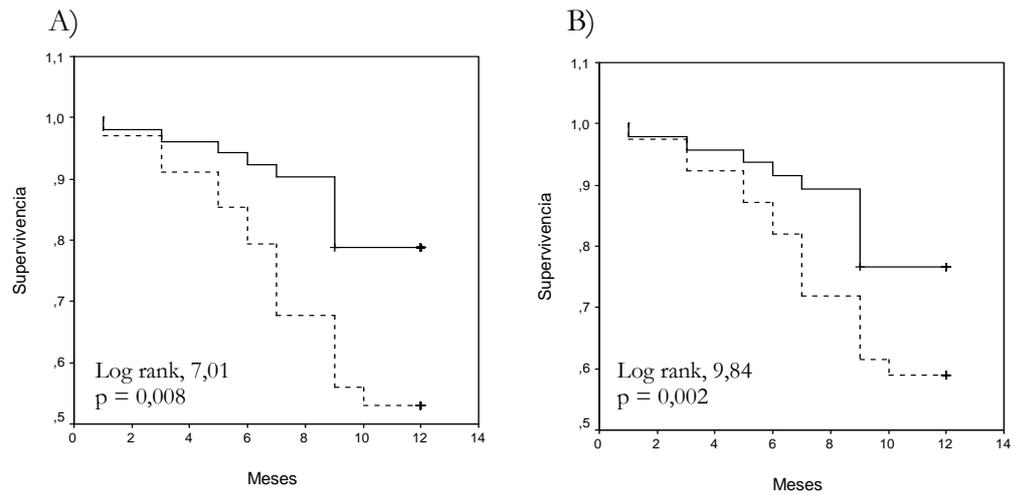


Figura 12. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los niveles en orina de NT-proBNP (A) y en suero (B) para los eventos combinados (mortalidad o ingresos) de origen cardiaco, estratificando los niveles de NT-proBNP por encima (línea continua) o por debajo (línea discontinua) de los puntos de corte extraídos de las curvas ROC (fig. 10), en los 96 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca.

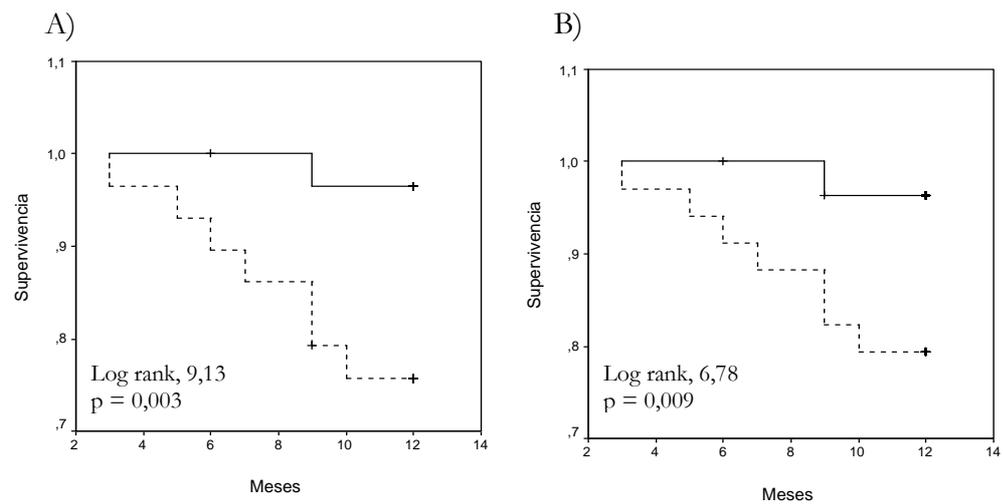


Figura 13. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los niveles en orina de NT-proBNP (A) y en suero (B) para la mortalidad de origen cardiaco, estratificando los niveles de NT-proBNP por encima (línea continua) o debajo (línea discontinua) de los puntos de corte extraídos de las curvas ROC (Fig. 11), en los 96 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca.



5. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE BNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Se estudiaron 92 pacientes no ingresados (65 varones y 27 mujeres (29%), con una edad media de 65 ± 12 años) diagnosticados de insuficiencia cardiaca y 30 controles pareados por edad y sexo (23 varones y 7 mujeres (21%), con edad media de 63 ± 7 años). El 45% de nuestros pacientes tenían miocardiopatía isquémica, el 39% miocardiopatía dilatada, el 13% miocardiopatía hipertensiva y el 3% enfermedad valvular. Después de un seguimiento a 12 meses de los 92 pacientes, 9 fallecieron (11%) y 19 (21%) tuvieron un evento cardiaco no mortal.

Se encontraron diferencias significativas para los niveles de BNP en orina entre el grupo control y pacientes ($0,51 \pm 0,89$ vs. $3,28 \pm 4,24$ pg/mL, respectivamente) ($p < 0,0001$). La concentración de BNP en suero fue más alta que la concentración en orina en ambos grupos. Los niveles del péptido natriurético en suero y orina mostraron una buena correlación en nuestra población de estudio ($r = 0,64$, $p < 0,0001$). En el grupo de pacientes la correlación fue $r = 0,51$ ($p < 0,0001$), mientras que en el grupo control los niveles plasmáticos y urinarios de BNP no estuvieron correlacionados.

La Figura 14A ilustra la distribución de los niveles de BNP en orina con relación a la clase funcional según la NYHA (NYHA I: $1,72 \pm 2,49$ pg/mL; NYHA II: $2,83 \pm 3,11$ pg/mL; NYHA III: $5,49 \pm 6,71$ pg/mL). Los niveles urinarios de BNP fueron más altos en las clases funcionales más deterioradas ($p < 0,05$), y se obtuvo diferencia significativa entre pacientes en clase funcional NYHA I y controles ($1,72 \pm 2,49$ pg/mL vs. $0,51 \pm 0,89$ pg/mL; $p = 0,023$). Los niveles de BNP en suero (14B) mostraron diferencias significativas al comparar las clases funcionales NYHA entre ellas y con los sujetos control.

Al analizar la influencia de la obesidad sobre los niveles de BNP en orina se obtuvieron concentraciones más bajas en pacientes obesos ($1,93 \pm 2,16$ pg/mL vs. $3,83 \pm 4,78$ pg/mL, $p = 0,042$). Además, se realizó una regresión lineal múltiple para analizar la influencia de la obesidad sobre BNP urinario, ajustando por edad, género, niveles séricos de BNP, creatinina plasmática, FE,



obesidad, y cociente E/A. Sin embargo, el modelo mejor asociado con BNP en orina no incluyó esta variable como un factor predictivo, sino niveles séricos de BNP ($p=0,001$) y FE ($p=0,002$), alcanzando una r^2 ajustada de 0,60.

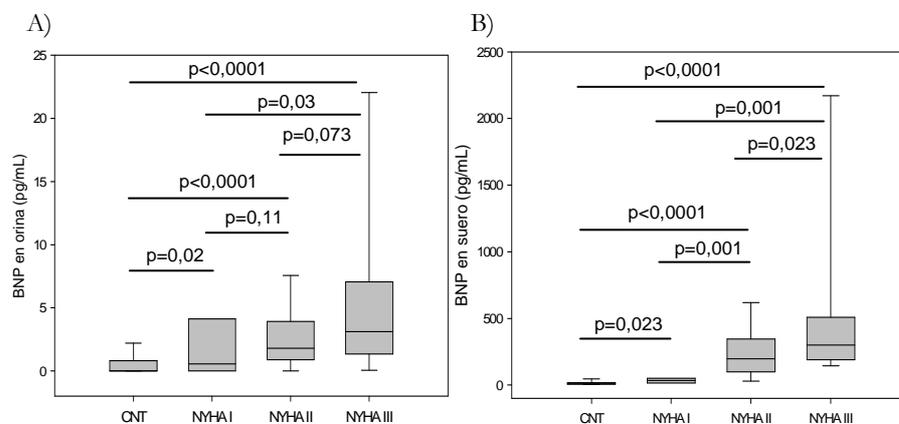


Figura 14. Niveles de BNP en orina (A) y suero (B) en pacientes con insuficiencia cardiaca según las clases funcionales de la *New York Heart Association*. Las cajas muestran la mediana (barra horizontal), rango intercuartílico (límites superior e inferior de las cajas) y los percentiles 5 y 95 (barras de error).

La curva ROC de los niveles de BNP en orina para la detección de IC mostró un ABC de $0,91 \pm 0,06$, $p<0,0001$ (Fig. 15), para los niveles en suero el ABC fue ligeramente superior ($0,95 \pm 0,02$, $p<0,0001$) (con una $p=0,457$ al comparar las ABC de ambos tipos de muestras). De la curva ROC para la concentración de BNP en orina se eligió un punto de corte de 2,21 pg/mL con sensibilidad de 43% y especificidad de 100% para la detección de IC, y valores predictivo positivo y negativo de 100% y 56%, respectivamente.

Por otro lado, para investigar el papel pronóstico de los niveles urinarios de BNP en la IC en un seguimiento a 12 meses, se calculó la proporción de pacientes que tuvieron eventos cardiacos (ingresos + mortalidad) y el porcentaje de mortalidad cardiaca en relación con los terciles de BNP en orina y suero (Fig. 16). Se observó que los pacientes en el último tercil tuvieron una prevalencia de eventos de origen cardiaco 3 veces mayor que los pacientes en el primer tercil (14% vs. 43%). Para los niveles en suero del marcador, los pacientes en el tercer tercil tuvieron también una prevalencia

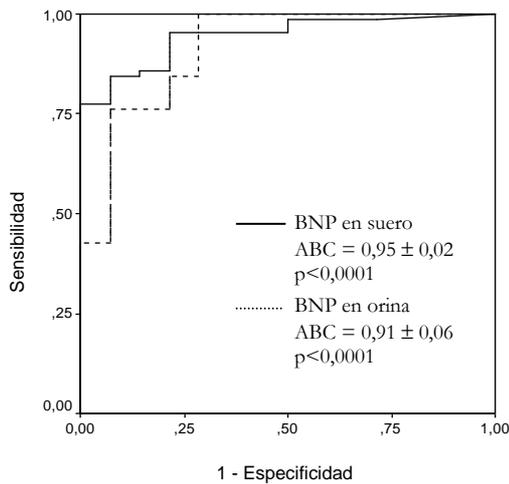


Figura 15. Curva ROC para los niveles de BNP en orina y suero para la detección de insuficiencia cardíaca. ABC: área bajo la curva.

3,5 veces mayor (15% vs. 54%). Además, la proporción de mortalidad cardíaca también se incrementó en el tercer tercil tanto para los niveles urinarios (0% vs. 20%) como para los plasmáticos (4% vs. 23%) de BNP (Fig. 16).

También se realizó una regresión logística para investigar si los niveles del péptido natriurético en orina eran predictores independientes de los eventos cardíacos (ingresos + mortalidad cardíaca) en un seguimiento a 12 meses, incluyendo edad, obesidad, FE, NYHA, y niveles de BNP en orina como variables independientes. El resultado mostró que la concentración de

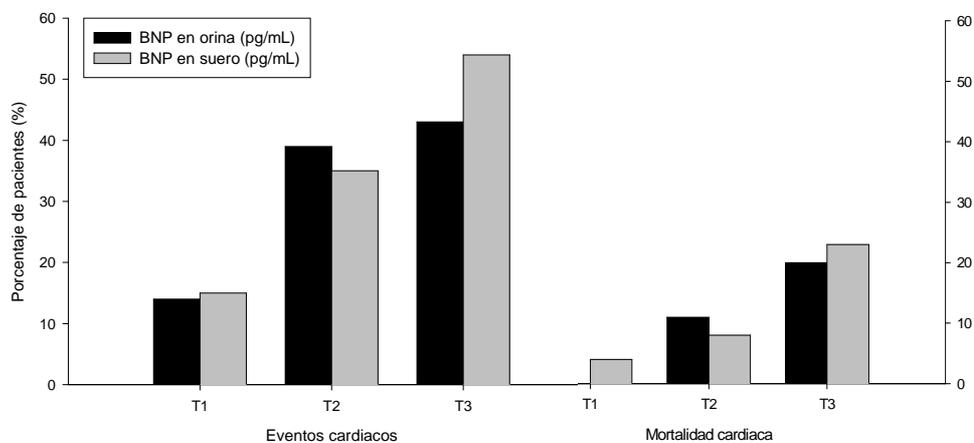


Figura 16. Porcentaje de pacientes con eventos cardíacos (ingresos + mortalidad) (izquierda del gráfico) y mortalidad cardíaca (derecha del gráfico) en relación con los terciles (T) de la concentración de BNP en orina.



BNP en orina tenía una *odds ratio* de 6,6 para los pacientes en el segundo tercil ($p=0,022$), y de 6,4 para los pacientes en el tercil tercero ($p=0,029$).

Por último, se realizó una curva ROC para determinar el poder pronóstico de mortalidad de origen cardiaco para los niveles de BNP en orina en un seguimiento a 12 meses. Se obtuvo un ABC de $0,76 \pm 0,06$ ($p=0,014$) para los niveles en orina y ligeramente superior para el suero $0,78 \pm 0,08$ ($p=0,007$) (con una $p=0,829$ al comparar las ABC de los dos tipos de muestras) (Fig. 17). El punto de corte óptimo para BNP en orina fue 3,22 pg/mL, con sensibilidad y especificidad de 67% y 70%, respectivamente, y valores predictivos positivo y negativo de 21% y 95%. Para la concentración en suero el punto óptimo fue 466 pg/mL, con 67% de sensibilidad y 87% de especificidad, los valores predictivo positivo y negativo fueron 25% y 91%, respectivamente.

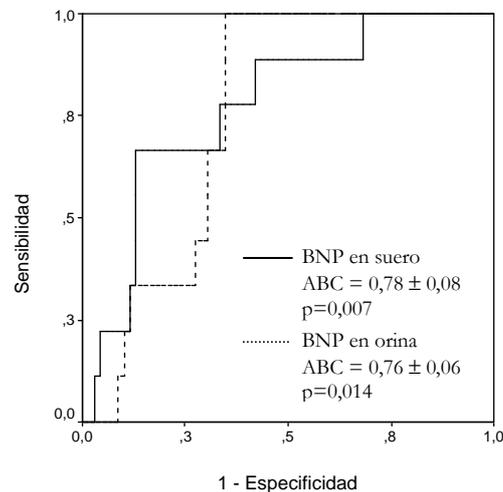


Figura 17. Curva ROC para los niveles de BNP en orina y suero para predecir la mortalidad de origen cardiaco en un seguimiento a 12 meses. ABC: área bajo la curva.



6. DIAGNÓSTICO DE LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR MEDIANTE LOS NIVELES DE BNP EN ORINA

La población de estudio incluyó 90 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca (70% varones, 66 ± 12 años) que tuvieron una fracción de eyección (FE) $\leq 40\%$ (59 pacientes) y FE $>40\%$ (31 pacientes), cuyas características clínicas se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes en función de la fracción de eyección

VARIABLES	Todos	FE $\leq 40\%$ (n=59)	FE $>40\%$ (n=31)
Varón/Mujer	61/29	41/18	20/11
Edad (años)	66 ± 12	65 ± 13	68 ± 12
PAS (mmHg)	128 ± 22	125 ± 19	134 ± 26
Creatinina plasmática (mg/dL)	$1,23 \pm 0,71$	$1,20 \pm 0,34$	$1,24 \pm 0,33$
eFGR (mL/min/1,73 m ²)	74 ± 24	74 ± 25	73 ± 22
Clase funcional NYHA	$2,11 \pm 0,54$	$2,21 \pm 0,45$	$2,01 \pm 0,52$
Parámetros ecocardiográficos:			
FE (%)	36 ± 11	29 ± 13	$48 \pm 6^{***}$
Vp (cm/s)	33 ± 10	31 ± 8	$36 \pm 13^*$
E/A	$1,03 \pm 0,58$	$1,2 \pm 0,66$	$0,8 \pm 0,28^{**}$
E/VP	$2,32 \pm 0,86$	$2,52 \pm 0,89$	$1,93 \pm 0,70^{**}$
IVTD (mL/m ²)	120 ± 61	140 ± 63	$84 \pm 35^{***}$
IVTD (mL/m ²)	81 ± 51	102 ± 52	$43 \pm 16^{***}$
IMVI (g/m ²)	191 ± 67	209 ± 69	$157 \pm 48^{***}$
Hipertensión (%)	51	37	77 ^{***}
Diabetes (%)	41	40	43
Fumar (%)	7	9	4
Obesidad (%)	30	23	42
Tratamiento (%):			
Diuréticos	81	88	68 [*]
IECA	71	70	74
Antagonistas de la aldosterona	52	57	42
Bloqueadores beta	64	63	68
Digoxina	24	27	19
ARA II	15	16	13
Calcioantagonistas	15	13	19
BNP en suero (pg/mL)	296 ± 380	369 ± 447	$159 \pm 124^{**}$
BNP en orina (pg/mL)	$3,34 \pm 4,32$	$4,33 \pm 4,91$	$1,53 \pm 1,74^{***}$

Los datos se expresan como media \pm DS o porcentaje. p valor entre FE \leq ó $>40\%$: *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,0001. ARA II: antagonistas del receptor II de la angiotensina; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardía en diástole; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; IVTD: índice del volumen telediastólico; IVTS: índice del volumen telesistólico; eFGR: filtrado glomerular renal; IMVI: índice de masa del ventrículo izquierdo; PAS: presión arterial sistólica; Vp: velocidad de propagación del flujo mitral.



También se estudió un grupo de 30 controles pareados en edad y sexo (77% varones, edad 63 ± 7 años) que presentaron un estudio eco-Doppler normal, análisis bioquímico, hematológico y no tenían antecedentes de enfermedad cardiovascular.

El grupo de pacientes con una FE $\leq 40\%$ ($n=59$, 66%) mostró un aumento en los índices telesistólico (IVTS) y telediastólico (IVTD), así como en el índice de masa del VI (IMVI). También mostraron un descenso en el valor de la V_p , en el porcentaje de hipertensos y un aumento en la toma de diuréticos, comparados con el grupo de pacientes con FE $>40\%$ (Tabla 9). Además, al comparar los valores de BNP en orina, se obtuvo un aumento significativo en los niveles del péptido en el grupo de pacientes con FE $\leq 40\%$ al comparar con el grupo de FE $>40\%$ y el grupo control ($p < 0,0001$) (Fig. 18).

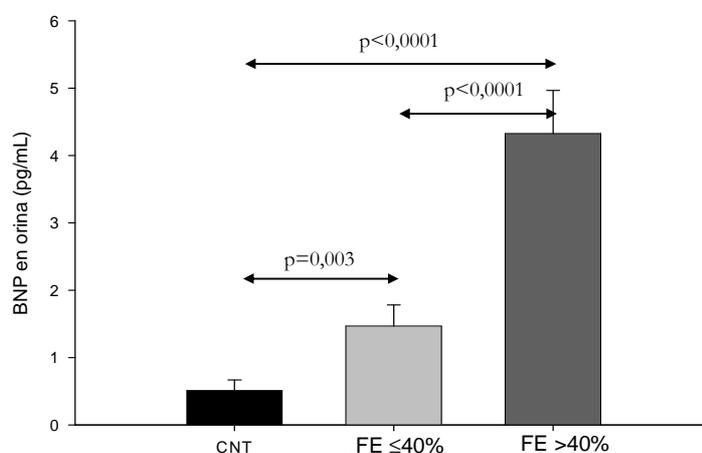


Figura 18. Valores medios de péptido natriurético tipo B (BNP) en orina en el grupo control ($n=30$), y en el grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca con FE $\leq 40\%$ ($n=59$) y con FE $>40\%$ ($n=31$). FE: fracción de eyección

En todos los pacientes ($n=90$), los niveles en orina de BNP estuvieron correlacionados significativamente con parámetros de función del VI (excepto con E/A) y con el IMVI (Tabla 10). Sin embargo, los niveles de BNP no estuvieron correlacionados con la edad ($r=0,07$), creatinina plasmática ($r=-0,04$) y filtrado glomerular ($r=-0,01$). Además, se realizó un análisis de regresión múltiple para testar la correlación independiente entre la edad, género, obesidad, filtrado glomerular, niveles de BNP en suero, FE, V_p , E/A, IVTS, IVTD, IMVI y medicación, con los niveles de BNP en orina. El mejor modelo asociado a los niveles del biomarcador, incluyó BNP en suero



($p < 0,0001$), FE ($p = 0,02$) y ambos volúmenes del VI ($p < 0,0001$), con una r^2 ajustada de 0,67 (Tabla 11).

Tabla 10. Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de BNP en orina y parámetros funcionales en pacientes con insuficiencia cardiaca.

Variable	Coeficiente de correlación de Spearman (r)	p valor
FE (%)	-0,389	<0,0001
Vp (cm/s)	-0,228	0,033
E/A	0,146	0,184
E/Vp	0,236	0,031
IVTS (mL/m ²)	0,451	<0,0001
IVTD (mL/m ²)	0,432	<0,0001
IMVI (g/m ²)	0,222	0,038

E/A: cociente entre velocidad de llenado temprano y tardía en diástole del ventrículo izquierdo; FE: fracción de eyección; IVTD: índice de volumen telediastólico; IVTS: índice de volumen telesistólico; IMVI: índice de masa del ventrículo izquierdo; Vp: velocidad de propagación del flujo mitral.

Tabla 11. Resultados de la regresión lineal múltiple para la detección de factores independientes sobre los niveles de BNP en orina en nuestros pacientes con IC

Variable	Coeficientes No estandarizados		p valor
	Beta	ES	
Edad	0,03	0,05	0,57
Género	-0,58	1,37	0,68
Obesidad	-0,83	1,33	0,54
eFGR	-0,02	0,03	0,46
BNP en suero	0,006	0,001	<0,0001
FE	-0,24	0,10	0,02
Vp	-0,10	0,07	0,13
E/A	-0,11	0,95	0,91
IVTD	0,18	0,05	<0,0001
IVTS	0,27	0,06	<0,0001
IMVI	0,003	0,01	0,76
Diuréticos	-0,10	1,44	0,94
IECA	-1,55	1,52	0,19
Bloqueadores beta	0,47	1,13	0,68

El mejor modelo se asoció con una $r^2 = 0,672$. La obesidad se definió como un IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$. BNP: péptido natriurético tipo B; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardía en diástole del ventrículo izquierdo; FE: fracción de eyección; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; eFGR: índice filtrado glomerular; IMVI: índice de masa del ventrículo izquierdo; IVTD: índice volumen telediastólico, IVTS: índice volumen telesistólico; Vp: velocidad de propagación del flujo mitral.



La curva ROC (Receiver Operating Characteristic) de los niveles de BNP en orina para la detección de FE $\leq 40\%$ en nuestra población de pacientes con IC mostró un área bajo la curva (ABC) de $0,74 \pm 0,05$ ($p < 0,0001$). La concentración de BNP en suero mostró un ABC para la detección de FE $\leq 40\%$ ligeramente peor $0,68 \pm 0,06$ ($p = 0,007$) (con una $p = 0,368$ al comparar las ABC entre ambas muestras) (Figura 19). De la curva ROC de los niveles en orina de BNP, el punto de corte óptimo ($2,30$ pg/mL) tuvo una sensibilidad del 60% y una especificidad del 90% , con unos valores predictivos positivo y negativo de 92% y 54% , respectivamente. Un punto de corte de $13,65$ pg/mL en orina tuvo especificidad del 100% .

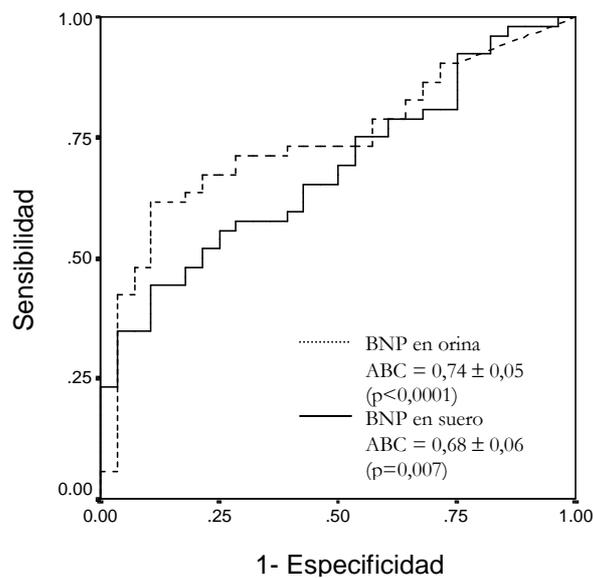


Figura 19. Curva ROC de la concentración de BNP en suero y orina para la detección de fracción de eyección (FE) $\leq 40\%$ en un grupo de pacientes con insuficiencia cardiaca. ABC: área bajo la curva.

Por otro lado, cuando detectamos insuficiencia cardiaca con una FE $\leq 40\%$ en nuestros pacientes frente al grupo control, obtuvimos un ABC de $0,87 \pm 0,04$ ($p < 0,0001$), y para la detección de IC con una FE $> 40\%$ frente al grupo control, obtuvimos un ABC de $0,71 \pm 0,07$, ($p = 0,004$).

Finalmente, se realizó una regresión logística binaria para la detección de la FE $\leq 40\%$. Las variables incluidas en la regresión fueron, la edad, género, filtrado glomerular, diabetes, miocardiopatías y los niveles de BNP en orina. La



concentración urinaria de BNP fue el marcador más fuerte, con una *odds-ratio* de 21 para la presencia de FE \leq 40% ($p=0,001$), con un 40% de la varianza (Nagelkerke $r^2=0,40$, $p=0,003$). Los resultados de la regresión pueden observarse en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de regresión binaria logística para varios predictores de disfunción ventricular sistólica (FE \leq 40%)

<i>Variable</i>	Beta	ESM	p valor	OR	IC 95%
Edad	0,04	0,04	0,28	1,04	0,97 – 1,11
Género (Varón)	-1,30	0,88	0,14	0,27	0,05 – 1,54
Índice de filtrado glomerular	0,03	0,02	0,15	1,03	0,99 – 1,01
Diabetes	0,04	0,65	0,96	1,04	0,29 – 3,71
Miocardopatía isquémica	-2,41	2,12	0,26	0,09	0,00 – 5,73
Miocardopatía dilatada	-3,18	2,23	0,16	0,04	0,00 – 3,32
Miocardopatía hipertensiva	-2,86	2,28	0,21	0,06	0,00 – 4,99
BNP en orina ($>2,30$ pg/mL)	3,04	0,91	0,001	20,9	3,53 – 124,1

P valor y *odds-ratio* (OR) se refieren a los predictores. El mejor modelo asociado tuvo una r^2 Nagelkerke = 0,40. El punto de corte (2,30 pg/mL) del péptido natriurético tipo B fue seleccionado de la curva ROC para la detección de FE \leq 40%.



7. IMPACTO DE LA FUNCIÓN RENAL SOBRE EL VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE INSUFICIENCIA CARDIACA DE BNP Y NT-proBNP EN ORINA.

Se estudiaron 90 pacientes (66 varones, 65 ± 12 años) con IC a los que se les determinó simultáneamente los niveles de BNP y NT-proBNP en orina. Se estimó el filtrado glomerular renal (eFGR) mediante el método de *Crookoft-Gault* (Crookoft & Gault 1976); y se agruparon según el eFGR fuese $<$ o \geq a 60 mL/min. La Tabla 13 muestra las características clínicas en ambos grupos.

Tabla 13. Características clínicas del grupo de estudio según el filtrado glomerular renal.

Variable	eFGR <60 mL/min (n=40)	eFGR ≥ 60 mL/min (n=50)	p valor
Edad (años)	73 ± 8	58 ± 11	$<0,0001$
Género (varón, %)	58%	65%	0,30
PAS (mmHg)	126 ± 23	131 ± 19	0,02
PAD (mmHg)	71 ± 11	78 ± 14	0,30
Colesterol (mg/dL)	181 ± 33	191 ± 29	0,21
Urea (mg/dL)	60 ± 23	41 ± 10	$<0,0001$
Creatinina en suero (mg/dL)	$1,3 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$	$<0,0001$
Na (mEq/L)	140 ± 4	140 ± 4	0,58
K (mEq/mL)	$4,7 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,4$	0,07
eFGR (mL/min)	47 ± 13	90 ± 22	$<0,0001$
IMC (kg/m ²)	26 ± 3	29 ± 6	0,002
Hipertensión (%)	50	60	0,29
Diabetes (%)	58	28	0,004
Clase funcional (NYHA) (%)	$2,3 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,5$	0,02
Medicación (%):			
Bloqueadores Beta	60	64	0,45
Diuréticos	88	72	0,06
IECA	73	68	0,40
ARA II	15	15	0,61
Digoxina	30	21	0,24
Calcioantagonistas	23	9	0,06
Antagonistas de aldosterona	55	43	0,17
FE (%)	34 ± 11	36 ± 11	0,49
E/A	$1,2 \pm 1,1$	$1,0 \pm 0,5$	0,47

Los datos se expresan como media \pm DS o porcentaje. ARA II: antagonistas del receptor II de la angiotensina; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardía en diástole del ventrículo izquierdo; FE: fracción de eyección; eFGR: filtrado glomerular renal; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; IMC: índice de masa corporal; K: potasio; Na: sodio; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica.



Los pacientes con menor eFGR tuvieron mayor edad ($p < 0,0001$), niveles más altos de creatinina sérica y urea ($p < 0,0001$) y clase funcional (NYHA) ($p = 0,02$). Tuvieron más bajas la presión arterial sistólica ($p = 0,02$) y el índice de masa corporal ($p = 0,002$). Además, los pacientes con peor función renal tuvieron un mayor porcentaje de pacientes diabéticos ($p = 0,004$).

Para analizar el metabolismo renal tanto de NT-proBNP como BNP, usamos diferentes parámetros. La cantidad filtrada por el glomérulo renal de péptidos natriuréticos se calculó como: FGR x los niveles séricos de péptidos natriuréticos. Después, calculamos el cociente entre la cantidad en orina de ambas moléculas por la cantidad filtrada: NT-proBNP o BNP urinario / [(cantidad sérica de NT-proBNP o BNP) x FGR].

Ambos grupos de pacientes (con FGR por encima o debajo de 60 mL/min) tuvieron unas concentraciones de péptidos natriuréticos (PN) en orina mayores al grupo control ($p < 0,0001$). Además, los sujetos con peor eFGR tuvieron niveles séricos mayores de NT-proBNP [1.918 ± 2.177 vs. 1.027 ± 1.502 pg/mL, $p = 0,008$] y BNP [413 ± 494 vs. 192 ± 221 pg/mL, $p = 0,004$] que los pacientes con mejor función renal. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles urinarios de NT-proBNP o BNP (Tabla 14). Estas diferencias no mejoraron cuando las concentraciones urinarias de ambos péptidos se normalizaron por los niveles de creatinina en orina. La cantidad filtrada de NT-proBNP y BNP fue significativamente mayor en pacientes que en controles ($p < 0,001$), pero no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos según el FGR.

Tabla 14. Niveles de BNP y NT-proBNP según el filtrado glomerular renal (eFGR).

	CNT (n=30)	eFGR < 60 (n=40)	eFGR ≥ 60 (n=50)	p valor ^a
BNP sérico (pg/mL)	18 ± 15	413 ± 494	192 ± 221	0,004
NT-proBNP sérico (pg/mL)	35 ± 26	1918 ± 2177	1027 ± 1502	0,008
BNP en orina (pg/mL)	0,5 ± 0,9	3,4 ± 4,2	3,1 ± 4,4	0,609
NT-proBNP en orina (pg/mL)	67 ± 6	87 ± 27	102 ± 36	0,101
BNP sérico filtrado (ng/min)	3,6 ± 1,3	77 ± 74	72 ± 78	0,726
NT-proBNP sérico filtrado (µg/min)	2,1 ± 0,9	17 ± 16	17 ± 18	0,993

Los niveles de péptidos estuvieron aumentados ($p < 0,0001$) en ambos grupos de eFGR frente a controles. ^aComparación entre pacientes con eFGR <60 mL/min y eFGR ≥60 mL/min. BNP: péptido natriurético tipo B; NT-proBNP: fragmento N-terminal de proBNP.



A continuación la Figura 20 muestra una relación exponencial inversa entre la cantidad filtrada de los niveles de NT-proBNP o BNP en suero y el cociente entre la cantidad en orina y la filtrada en todos los pacientes estudiados ($r=-0,842$, $p<0,001$; y $r=-0,69$, $p<0,001$, respectivamente). Después, en aquellos pacientes con peor función renal ($FGR < 60$ mL/min), también obtuvimos una correlación inversa significativa para NT-proBNP ($r=-0,87$, $p=0,001$) y BNP ($r=-0,71$, $p<0,001$); coeficientes similares tuvieron el grupo de pacientes con $FGR \geq 60$ mL/min (NT-proBNP $r=-0,84$, $p<0,001$; y BNP $r=-0,72$, $p<0,001$, respectivamente).

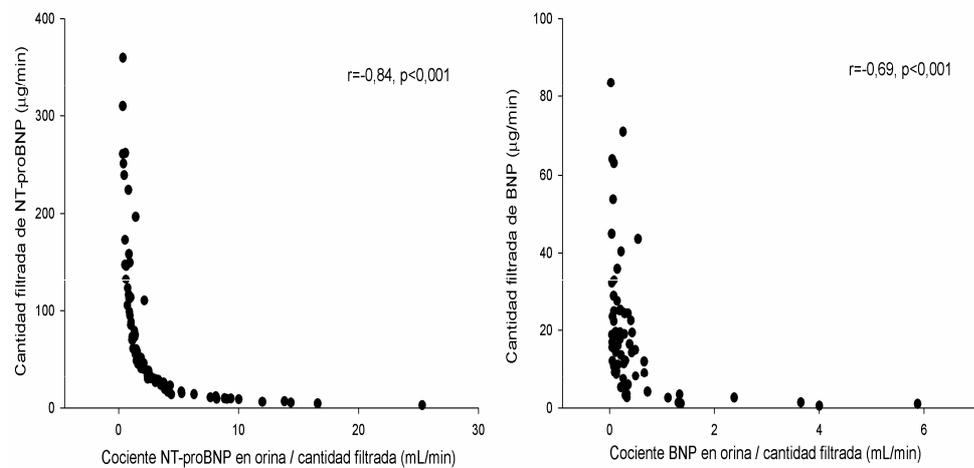


Figura 20. Relación entre la cantidad filtrada de los niveles séricos de NT-proBNP (izquierda) y BNP (derecha) frente al cociente de los niveles urinarios de ambas moléculas y la cantidad filtrada en pacientes con insuficiencia cardíaca.

El papel predictivo para los PN de IC no estuvo influenciado por la función renal en nuestros pacientes (Figura 21). Los niveles de BNP en orina tuvieron áreas bajo la curva (ABC) similares en pacientes con peor eFGR (0,84; (95% IC 0,75–0,94; $p<0,0001$) que en aquellos con eFGR más alto, 0,86 (95% IC 0,77–0,95; $p<0,0001$). En el caso de los niveles de NT-proBNP también tuvieron ABC similares en ambos grupos de pacientes: 0,98 (95% IC 0,99–1,00, $p<0,0001$) vs. 0,97 (95% IC 0,93–1,01, $p<0,0001$), respectivamente.

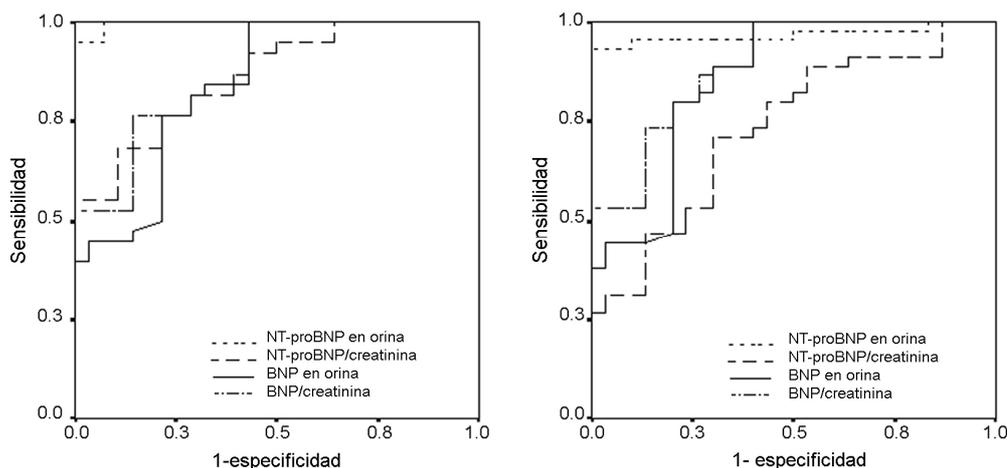


Figura 21. Curva ROC para los niveles de BNP y NT-proBNP con y sin normalización por creatinina en orina en pacientes con eFGR menor que 60 mL/min (n=40) (izquierda) y pacientes con eFGR ≥60 mL/min (n=50) (derecha). BNP: péptido natriurético tipo B; FGR: filtrado glomerular renal; NT-proBNP: fragmento N-terminal proBNP.

La Tabla 15 muestra los puntos de corte, sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, según las categorías de eFGR (mayor o menor de 60 mL/min); viéndose que los valores fueron similares en ambos grupos. Además, los niveles de NT-proBNP en orina tuvieron mejor ABC para la predicción de IC que los de BNP en ambos grupos (eFGR < o ≥ 60 mL/min) (p<0,0001 al comparar las ABC entre marcadores).

Tabla 15. Curvas ROC de péptidos natriuréticos en orina para IC según su eFGR

Variable	ABC	95% IC	Valor corte	ss	sp	VPP	VPN
eFGR < 60 mL/min							
BNP (pg/mL)	0,84	0,75-0,94	2,20	45	96	95	56
BNP/creatinina (pg/mg)	0,88	0,79-0,96	1,95	53	89	100	58
NT-proBNP (pg/mL)	0,98	0,99-1,00	73,49	95	93	88	94
NT-proBNP/creatinina (pg/mg)	0,86	0,78-0,95	63,64	82	71	70	75
eFGR ≥ 60 mL/min							
BNP (pg/mL)	0,86	0,77-0,95	2,23	44	97	95	52
BNP/creatinina (pg/mg)	0,89	0,82-0,96	1,95	53	90	100	55
NT-proBNP (pg/mL)	0,97	0,93-1,01	74,18	93	93	91	89
NT-proBNP/creatinina (pg/mg)	0,73	0,62-0,85	60,30	71	70	70	63

ABC: área bajo la curva; BNP: péptido natriurético tipo B; eFGR: filtrado glomerular renal; IC: intervalo de confianza; NT-proBNP: fragmento N-terminal de BNP; sp: especificidad; ss: sensibilidad; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.



El porcentaje de eventos cardíacos (ingreso o mortalidad) a 12 meses fue del 31% para todo el grupo. Cuando realizamos una curva ROC para predecirlos, ambos péptidos en orina fueron predictores en pacientes con bajo o alto eFGR (Fig. 22). La concentración de BNP tuvo un ABC de 0,74 (95% IC 0,58–0,90; $p < 0,0001$) en pacientes con peor función renal, con punto de corte de 2,90 pg/mL (sensibilidad 50% y especificidad 70%), y en pacientes con mejor función renal un ABC similar de 0,71 (95% IC 0,55 – 0,86) con punto de corte de 2,72 pg/mL (sensibilidad 67% y especificidad 63%). Para NT-proBNP encontramos ABC parecidas en ambos grupos: 0,76 (95% IC 0,59 – 0,93) con valor de 95,5 pg/mL (sensibilidad 79% y especificidad 70%), y un ABC de 0,70 (95% IC 0,55–0,86) con un corte de 87,2 pg/mL (sensibilidad 60% y especificidad 75%), respectivamente. Además, al comparar las ABC entre ambos péptidos para predecir eventos no hubieron diferencias ($p=0,991$).

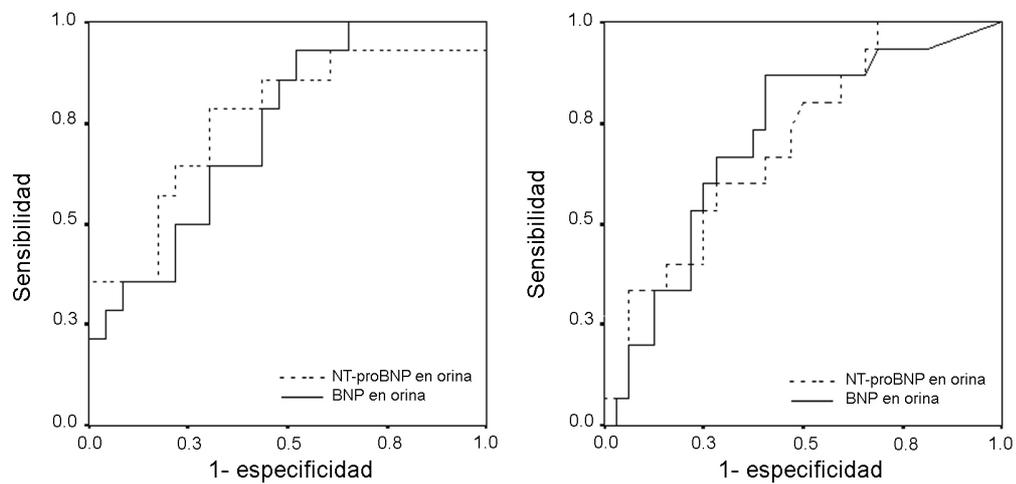


Figura 22. Curva ROC de los niveles de BNP y NT-proBNP en orina para predecir eventos cardíacos (ingreso o mortalidad) en pacientes con eFGR < 60 mL/min ($n=40$) (izquierda) y pacientes con eFGR ≥ 60 mL/min ($n=50$) (derecha). BNP: péptido natriurético tipo B; eFGR: filtrado glomerular renal; NT-proBNP: fragmento N-terminal proBNP.



La Figura 23 muestra las curvas *Kaplan Meier* al englobar la función renal, como eFGR, y péptidos natriuréticos en orina. Los pacientes con niveles de BNP por encima de los puntos de corte de las curvas ROC (2,72 y 2,90 pg/mL) y un eFGR por debajo de 60 mL/min tuvieron alto riesgo de eventos cardiacos (*log rank* 15,61, $p=0,0014$). Resultados similares obtuvimos para NT-proBNP urinario y eFGR (*log rank* 19,01, $p=0,0003$). Además, los pacientes con niveles de BNP y NT-proBNP por encima de los puntos de corte tuvieron el mayor riesgo de evento cardiaco independientemente del valor de eFGR.

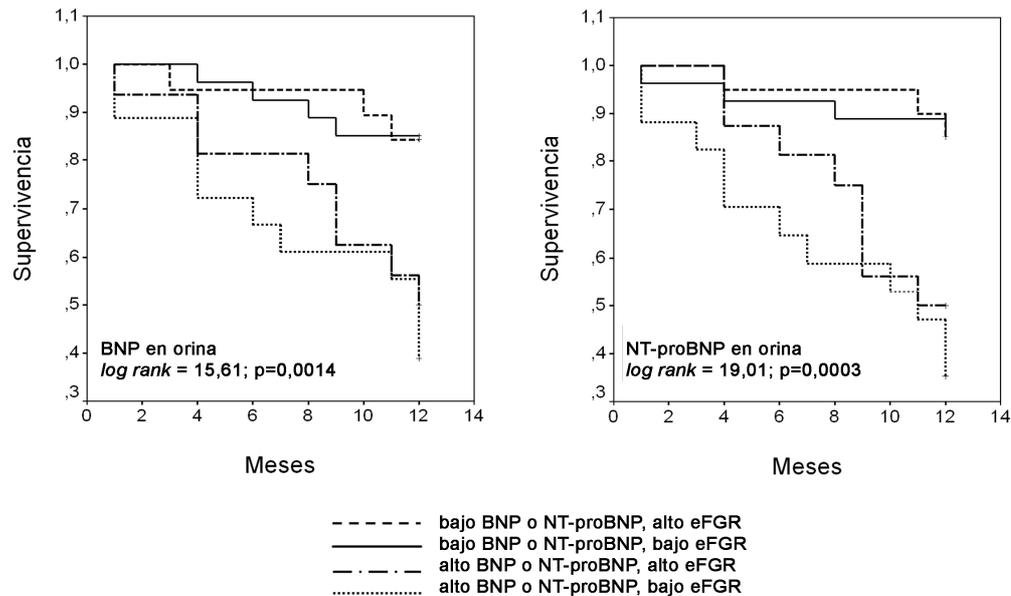


Figura 23. Curvas de supervivencia de *Kaplan Meier* para predecir el riesgo de sufrir eventos cardiacos (ingreso o mortalidad) al englobar los niveles de BNP (izquierda) o NT-proBNP en orina (derecha) junto con la función renal como eFGR. El estadístico empleado para la comparación de las curvas fue *log rank*.

Por último, los niveles de PN en orina predijeron los eventos cardiacos a 12 meses, en sujetos con eFGR $< o \geq$ de 60 mL/min (Tabla 16). En el grupo de pacientes con mala función renal un BNP mayor de 2,90 pg/mL tuvo un *hazard ratio* de 5,36 ($p=0,039$), y con NT-proBNP mayor de 95,5 pg/mL un *hazard ratio* de 5,92 ($p=0,010$). En los pacientes con mejor eFGR, los niveles de



BNP por encima de 2,72 pg/mL tuvieron un *hazard ratio* de 4,08 ($p=0,026$), y un NT-proBNP mayor de 87,2 pg/mL un *hazard ratio* de 4,44 ($p=0,015$).

Tabla 16. Relación entre el riesgo de eventos cardiacos con niveles de BNP y NT-proBNP a 12 meses, en pacientes con eFGR $< o \geq$ de 60 mL/min.

	<i>Hazard ratio (95% IC)</i>	<i>p valor</i>
Pacientes con eFGR < 60 mL/min		
Modelo con BNP:		
Edad	1,088 (0,979 – 1,209)	0,119
Género	1,213 (0,319 – 4,611)	0,777
Hipertensión	1,292 (0,309 – 5,410)	0,726
Diabetes	1,133 (0,331 – 3,882)	0,842
Obesidad	0,687 (0,119 – 3,955)	0,674
BNP en orina $> 2,90$ pg/mL	5,363 (1,086 – 26,489)	0,039
Modelo con NT-proBNP:		
Edad	1,083 (0,978 – 1,216)	0,121
Género	1,083 (0,306 – 3,833)	0,902
Hipertensión	1,527 (0,391 – 5,974)	0,543
Diabetes	1,141 (0,306 – 4,259)	0,844
Obesidad	0,888 (0,140 – 5,637)	0,900
NT-proBNP en orina $> 95,5$ pg/mL	5,924 (1,517 – 23,134)	0,010
Pacientes con eFGR ≥ 60 mL/min		
Model con BNP:		
Edad	1,026 (0,978 – 1,077)	0,290
Género	1,164 (0,207 – 6,551)	0,864
Hipertensión	2,630 (0,839 – 8,244)	0,097
Diabetes	1,093 (0,302 – 3,959)	0,892
Obesidad	0,820 (0,240 – 2,798)	0,751
BNP en orina $> 2,72$ pg/mL	4,082 (1,183 – 14,079)	0,026
Model con NT-proBNP:		
Edad	1,016 (0,968 – 1,067)	0,511
Género	1,516 (0,298 – 7,698)	0,616
Hipertensión	2,687 (0,857 – 8,425)	0,090
Diabetes	1,023 (0,303 – 3,452)	0,970
Obesidad	0,939 (0,305 – 2,890)	0,913
NT-proBNP en orina $> 87,2$ pg/mL	4,442 (1,333 – 14,802)	0,015

Puntos de corte de BNP y NT-proBNP extraídos de curvas ROC para el pronóstico de eventos cardiacos. BNP: péptido natriurético tipo B; eFGR = filtrado glomerular renal; NT-proBNP = fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B.



8. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE NT-proBNP EN SUERO Y ORINA EN PACIENTES ESTABLES CON INSUFICIENCIA CARDIACA, EN UN SEGUIMIENTO A DOS AÑOS

El grupo inicial de pacientes con el que comenzamos este proyecto de tesis doctoral se componía de 114 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca (72% varones, con una edad media de 64 ± 13 años). De estos 114 pacientes, 40 no se incluyeron en este subestudio por no cumplir los criterios de inclusión y estabilidad: 17 habían fallecido, 21 habían tenido un evento cardiaco y 2 no se pudieron localizar.

En total se incluyeron 74 pacientes estables diagnosticados de insuficiencia cardiaca (74% varones, con edad media de 65 ± 11 años). El 49% de los pacientes tenían miocardiopatía isquémica, el 33% miocardiopatía dilatada, el 14% miocardiopatía hipertensiva y el 4% enfermedad valvular. Todos los pacientes fueron seguidos hasta el final del estudio, a los 24 meses, con recogida de datos en 3 fases: basal, a los 12 meses (fase I) y a los 24 meses (fase II). La Tabla 17 muestra los valores de NT-proBNP en suero y orina y su cociente, las características clínicas y los parámetros de función ventricular en las 3 fases para los 74 pacientes estables. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la presión arterial sistólica, fracción de eyección y niveles de NT-proBNP en orina respecto a la fase basal ($p < 0,05$, $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). Las variables bioquímicas y hematológicas, la edad, el índice de masa corporal, los parámetros de función ventricular diastólica, los niveles de NT-proBNP en suero, la clase funcional NYHA y la prueba de esfuerzo, no mostraron diferencias significativas.

Cuando se analizó la dispersión de los niveles de NT-proBNP en cada fase (basal, fase I y fase II), se observó que pocos pacientes tuvieron una concentración de NT-proBNP $> \pm 1$ DS, en basal (27% en suero y 20% en orina), en fase I (27% en suero y 7% en orina), y en la fase II (28% en suero y 20% en orina). Los niveles de NT-proBNP en orina mostraron menos variabilidad entre nuestros pacientes con insuficiencia cardiaca que los niveles plasmáticos en las 3 fases (basal: $1,90 \pm 0,1$ vs. $2,85 \pm 0,43$; fase I: $1,95 \pm 0,09$ vs. $2,84 \pm 0,46$, fase II: $1,94 \pm 0,07$ vs. $2,83 \pm 0,41$, respectivamente).

**Tabla 17.** Características clínicas de nuestros pacientes con insuficiencia cardiaca (n=74) a lo largo de todo el estudio (basal, fase I =12 meses y fase II = 24 meses).

Variable	Basal	Fase I	Fase II
Edad (años)	65 ± 11	66 ± 11	67 ± 11
PAS (mm Hg)	128 ± 20	130 ± 22	125 ± 19*
Frecuencia cardiaca (lpm)	76 ± 14	73 ± 11	75 ± 12
Colesterol total (mg/dL)	194 ± 446	186 ± 31	183 ± 37
Na (mEq/L)	139 ± 3	140 ± 3	140 ± 3
K (mEq/L)	4,62 ± 0,51	4,71 ± 0,42	4,51 ± 0,51
eFGR (ml/min/1,73 m ²)	71 ± 22	74 ± 21	71 ± 21
Hematocrito (%)	42 ± 5	42 ± 5	42 ± 5
IMC (kg / m ²)	28 ± 5	28 ± 6	28 ± 4
Hipertensión (%)	50	54	57
Diabetes mellitus (%)	41	46	49
Fumar (%)	13	7	8
Clase funcional NYHA	2 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,6
Tratamiento (%):			
IECA	79	75	74
Diureticos	76	79	77
Bloqueadores beta	60	65	70
Antagonistas de la aldosterona	46	49	43
Digoxina	25	20	26
Calcioantagonistas	14	13	16
ARA II	10	11	15
Protocolo de Naughton modificado(s)	632 ± 36	611 ± 34	585 ± 31
FE (%)	38 ± 10	36 ± 11*	36 ± 9*
E/A	1,01 ± 0,62	1,02 ± 0,64	1,21 ± 0,82
TD (ms)	214 ± 71	199 ± 54	201 ± 69
NT-proBNP en suero (pg/mL)	1.237 ± 1.737	1.241 ± 1.748	1.043 ± 1.153
NT-proBNP en orina (pg/mL)	83 ± 23	92 ± 28†	89 ± 17†
Cociente suero/orina NT-proBNP	13 ± 15	11 ± 11	10 ± 9*

Los datos se expresan como media ± DS, o número de pacientes y porcentaje. ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; E/A: cociente entre la velocidad de llenado temprano y tardío en diástole del ventrículo izquierdo; FE: fracción de eyección; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; eFGR: índice del filtrado glomerular; IMC: índice de masa corporal; K: potasio; Na: sodio; NYHA: New York Heart Association; PAS: presión arterial sistólica; TD: tiempo de deceleración; Vp: velocidad de propagación del flujo mitral. Diferencias significativas respecto al fase basal, *p<0.05 y †p<0.01.

La Figura 24 muestra el valor medio de los niveles de NT-proBNP en suero y orina a lo largo de todo el estudio. Los niveles en orina fueron más bajos que los séricos (p<0,0001). Se encontraron cambios en los valores en orina, pero no en los niveles de NT-proBNP séricos.

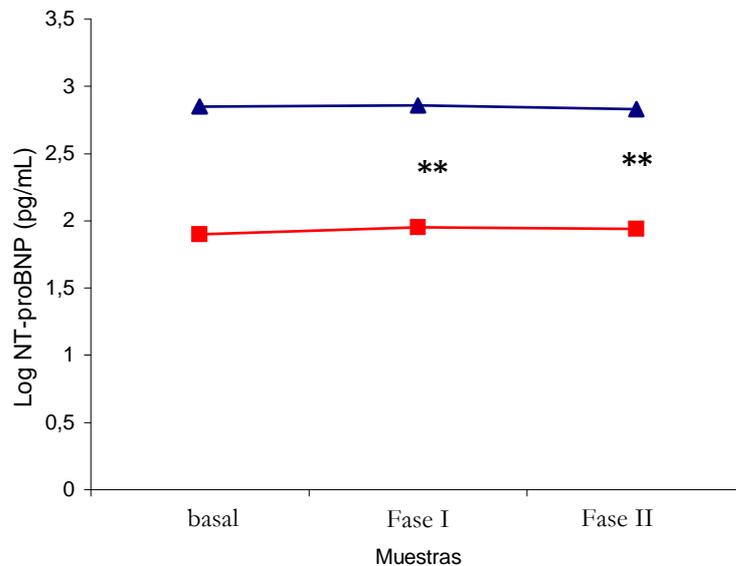


Figura 24. Logaritmo de los niveles séricos de NT-proBNP (azul) y en orina (rojo) durante 24 meses. Las medidas representan la media basal (1), en fase I: 12 meses, (2), y fase II: 24 meses (3). NT-proBNP: fragmento amino-terminal de proBNP. ** $p < 0,01$ respecto a la media basal.

La Figura 25 ilustra los gráficos Bland-Altman para analizar la concordancia de los niveles de NT-proBNP en suero en cada uno de los intervalos analizados (A: fase I – basal; B: fase II – fase I; y C: fase II – basal). En el intervalo A, 70 pacientes (94,6%) cayeron dentro del rango marcado por 1,96 veces la DS de la media. La media del porcentaje de cambio de la concordancia de los niveles del péptido natriurético fue $-0,40 \pm 11,4$, con un coeficiente de reproducibilidad (CR) de 22,4%. En el intervalo B, 69 pacientes (93,2%) cayeron dentro del rango de 1,96 la DS con una media del porcentaje de cambio de $-0,31 \pm 10,7$ y un CR de 21%. Finalmente, en el intervalo C, 68 pacientes (91,9%) cayeron dentro de 1,96 la DS de la media, con un porcentaje de cambio medio de $-0,86 \pm 12,7$ y un CR de 24,9%.

La Figura 26 muestra los cambios de NT-proBNP en orina en los intervalos A, B y C. El porcentaje de pacientes dentro del rango 1,96 veces la DS de la media fue ligeramente mayor que para los niveles séricos (94,6%, 96%

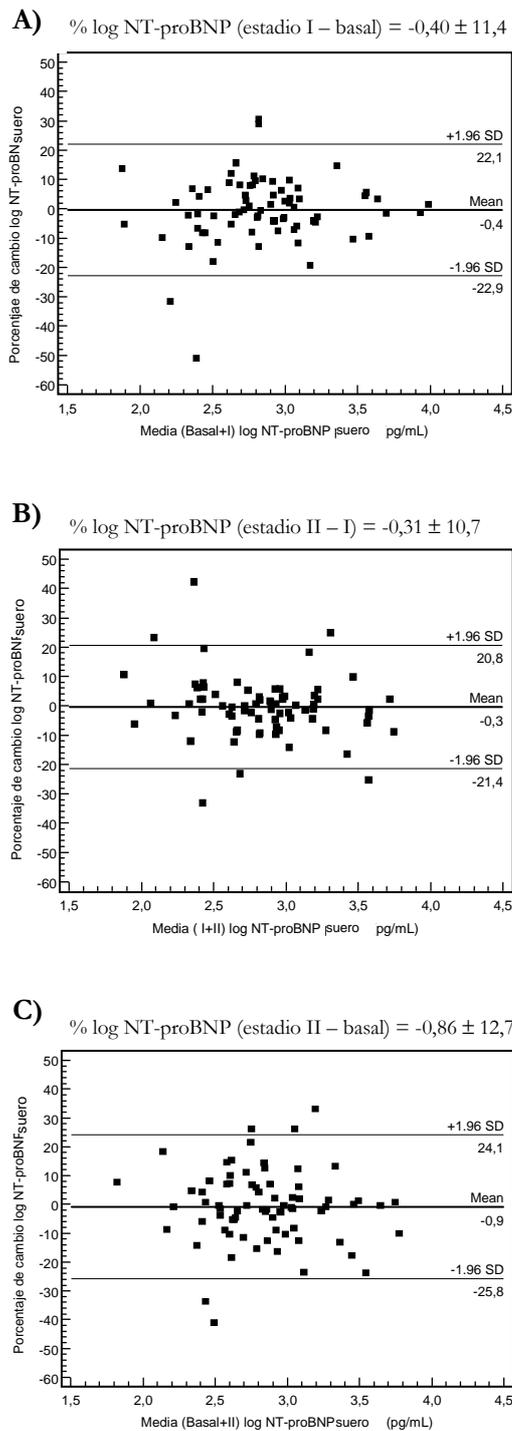
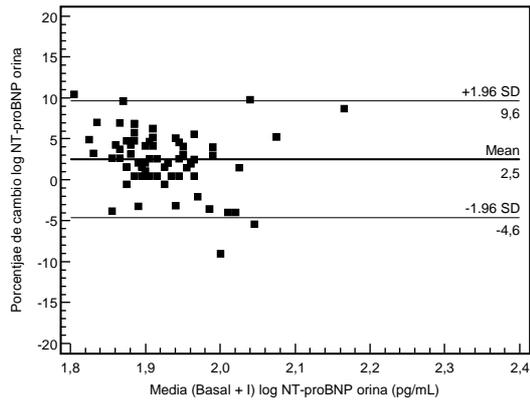


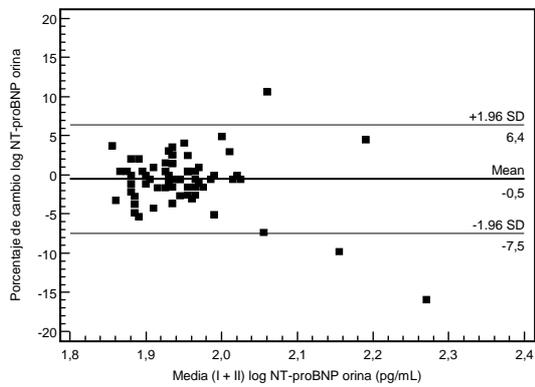
Figura 25. Gráficos Bland-Altman que muestran el grado de concordancia entre el porcentaje de cambio del logaritmo de NT-proBNP en suero frente a la media del logaritmo de NT-proBNP en suero a nivel basal + estadio I (dibujo A), estadio I + estadio II (dibujo B), y basal + estadio II (dibujo C). La línea sólida representa la media del porcentaje de cambio. Las líneas punteadas definen los límites de concordancia (media del porcentaje de cambio \times 1,96 DS). DS: desviación estándar; Estadio I: seguimiento 12 meses; Estadio II: seguimiento 24 meses; NT-proBNP: fragmento amino-terminal del péptido natriurético tipo B.



A) % log NT-proBNP (fase I – basal) = $2,52 \pm 3,61$



B) % log NT-proBNP (fase I – II) = $-0,55 \pm 3,49$



C) % log NT-proBNP (fase II – basal) = $2,18 \pm 4,78$

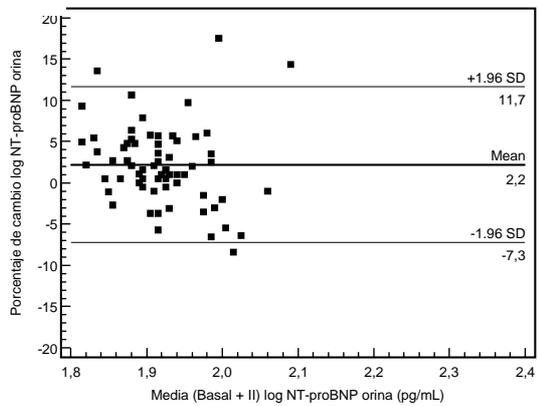


Figura 26. Gráficos Bland-Altman que muestran el grado de concordancia entre el porcentaje de cambio del logaritmo de NT-proBNP en orina frente a la media del logaritmo de NT-proBNP en orina a nivel basal + fase I (dibujo A), fase I + fase II (dibujo B), y basal + fase II (dibujo C). La línea sólida representa la media del porcentaje de cambio. Las líneas punteadas definen los límites de concordancia (media del porcentaje de cambio \times 1,96 DS). DS: desviación estándar; Fase I: seguimiento 12 meses; Fase II: seguimiento 24 meses; NT-proBNP: fragmento amino-terminal del péptido natriurético tipo B.



94,6%, respectivamente). Además, los valores medios de porcentaje de cambio fueron intervalo A: $2,52 \pm 3,61$ con un CR de 7,1%; intervalo B: $-0,55 \pm 3,49$ con un CR de 6,8%; e intervalo C: $2,18 \pm 4,78$ con un CR de 9,4%. Tanto para los niveles de NT-proBNP en suero y orina, los gráficos Bland-Altman no mostraron una distribución sesgada. De esta manera, se establece una alta reproducibilidad dentro de las diferentes medidas, sin sesgo analítico, en nuestro grupo de pacientes diagnosticados de IC clínica y funcionalmente estables. Esta reproducibilidad fue mejor en las muestras de NT-proBNP en orina que en suero, al tener unos coeficientes de reproducibilidad más bajos (CR = 1,96 x DS). También, se calculó la correlación entre los valores de NT-proBNP en orina y suero en las 3 fases (Fig. 27), obteniendo significación estadística ($p < 0,001$).

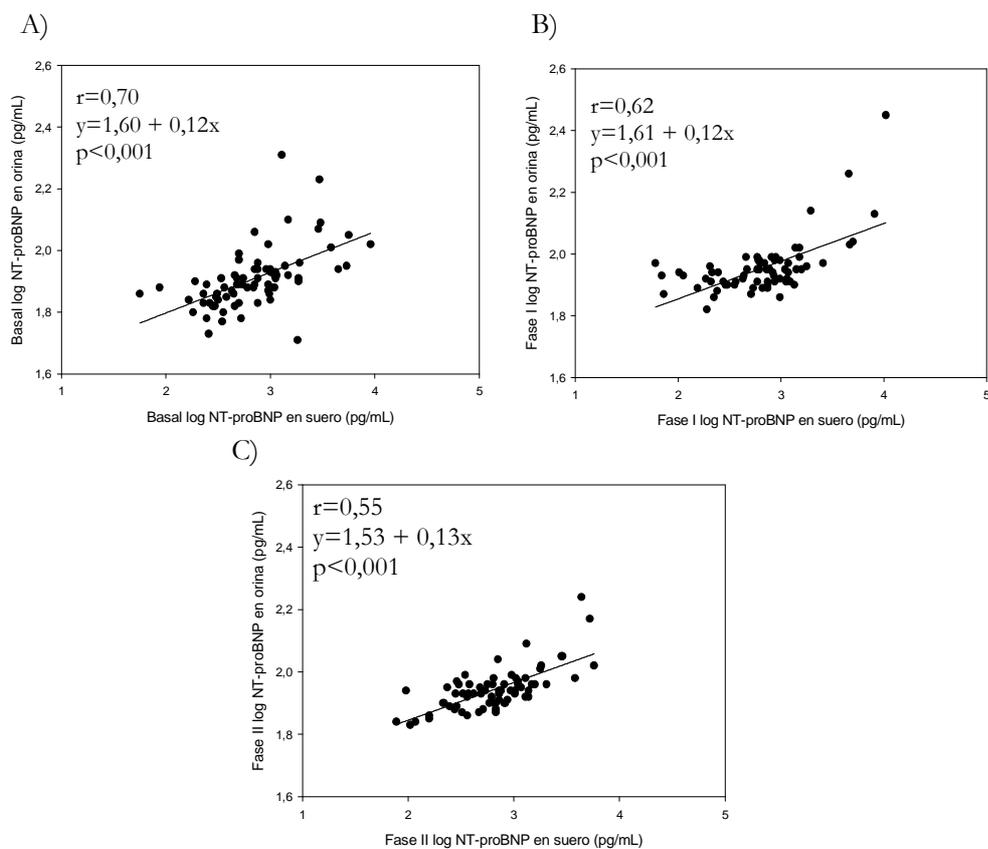


Figura 27. Correlación entre niveles de NT-proBNP en suero y orina a nivel basal (A), fase I: 12 meses (B) y fase II. 24 meses (C). NT-proBNP: fragmento amino-terminal péptido natriurético tipo-B.



Por último, cuando se analizó la correlación entre las distintas medidas de NT-proBNP, también se encontró una correlación estadísticamente significativa para el suero ($p < 0,001$) y para la orina ($p < 0,001$) (Fig. 28). Sin embargo, se obtuvo ligeramente un mayor coeficiente de correlación en las muestras séricas que urinarias de NT-proBNP: basal vs. fase I ($r = 0,773$ y $r = 0,522$), y fase I vs. fase II ($r = 0,771$ y $r = 0,604$), respectivamente (Fig. 28).

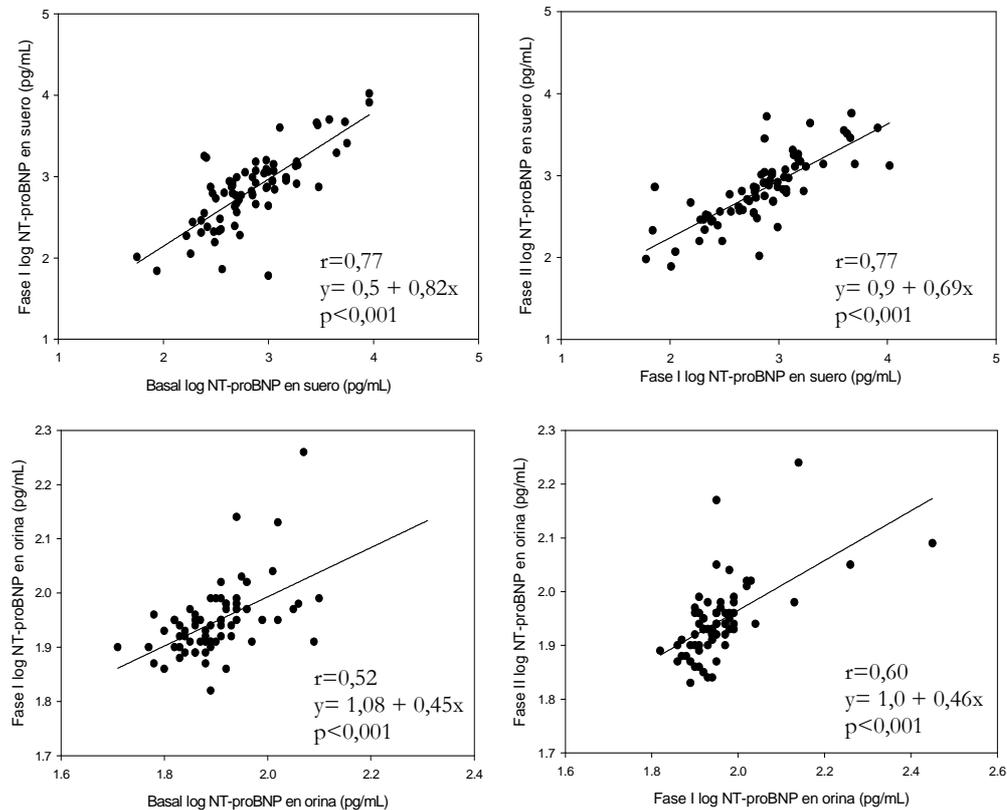


Figura 28. Correlación entre los niveles de NT-proBNP en suero y orina, en las fases basal y estadio I (A y B), y entre el fase I y fase II (C y D). Fase I: 12 meses; Fase II: 24 meses; NT-proBNP: fragmento amino-terminal del péptido natriurético tipo B.



9. NIVELES TISULARES DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN CORAZONES HUMANOS CON INSUFICIENCIA CARDIACA

Se analizaron 44 muestras de ventrículo izquierdo de pacientes sometidos a transplante cardiaco diagnosticados con insuficiencia cardiaca (IC) y de 5 sujetos sanos (donantes). La mayoría de los pacientes fueron varones (98%) con una edad media de 51 ± 9 años, con clase funcional NYHA de índice medio III - IV y diagnosticados previamente algunos de ellos con diabetes mellitus (34%), hipertensión (39%) y obesidad (25%). La tabla que muestra las características clínicas de estos pacientes según la etiología de la insuficiencia cardiaca se muestra en el apartado de material y métodos de esta tesis, sección biología molecular. El grupo de pacientes con miocardiopatía isquémica (MCI, n=28) mostró un aumento en la edad ($p < 0,001$), prevalencia de diabetes ($p < 0,0001$), y un descenso en los diámetros telesistólico y telediastólico del ventrículo izquierdo ($p < 0,0001$) al compararlos con el grupo de pacientes dilatados (MCD, n=16). Se encontraron también diferencias significativas para la masa del ventrículo izquierdo como un aumento en el grupo de sujetos con MCD ($p < 0,05$).

Las formas inmunoreactivas de PN en corazones humanos con IC se determinaron mediante su análisis por Western-blot. Los niveles de proBNP estuvieron 1,5 veces más aumentados que los de BNP y 15,4 veces más que NT-proBNP, en nuestro grupo de pacientes con IC ($p < 0,0001$); mientras que BNP estuvo 10,6 veces más elevado que NT-proBNP ($p < 0,0001$) en el mismo grupo de pacientes (Fig. 29). Además, en cada grupo etiológico, la expresión de proBNP fue de mayor intensidad: en los corazones con MCI, los niveles de proBNP fueron 1,5 y 13,3 veces más elevados que BNP y NT-proBNP, respectivamente. En la MCD, la expresión de proBNP aumentó 1,7 y 12,2 veces con respecto a BNP y NT-proBNP, respectivamente; y por último, en el grupo control (CNT) los niveles de proBNP fueron más altos que BNP (1,7 veces) y NT-proBNP (15,9 veces) a nivel tisular.

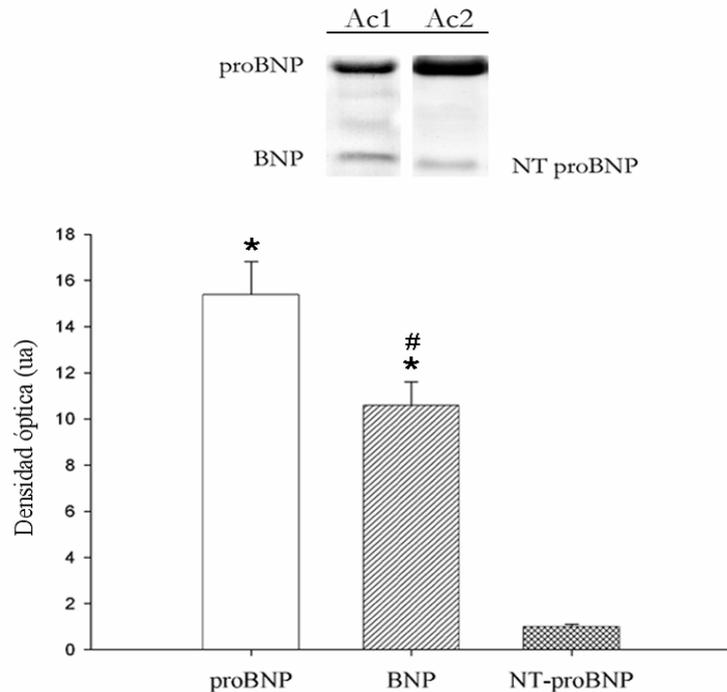


Figura 29. Análisis mediante Western-blot de péptidos natriuréticos en corazones humanos. Expresión de péptidos natriuréticos en tejido cardiaco con anti-human Ig G contra proBNP y BNP (Ac1), y anti-human Ig G contra proBNP y NT-proBNP (Ac2) (arriba figura). Normalización de los resultados de expresión de péptidos natriuréticos obtenidos mediante Western-blot en tejido cardiaco usando los anticuerpos Ac1 y Ac2, donde se observa una mayor expresión de proBNP que BNP o NT-proBNP. Los datos se expresan en unidades arbitrarias (ua) y representan la media \pm ESM de 4 experimentos independientes. NT-proBNP vs. BNP y proBNP (* $p < 0,0001$); BNP vs. proBNP (# $p < 0,0001$).

Estos resultados muestran que el nivel proteico de proBNP está aumentado en corazones con miocardiopatía isquémica y dilatada. Para analizar si este aumento en las muestras patológicas está presente a nivel transcripcional, se cuantificaron los niveles de ARNm de proBNP mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Como indica la Figura 30 existe un aumento significativo en la expresión de ARNm de este péptido en la MCI ($4,49 \pm 1,11$ veces) y en la MCD ($4,26 \pm 0,82$ veces) comparándola con la expresión en corazones control ($p < 0,05$).

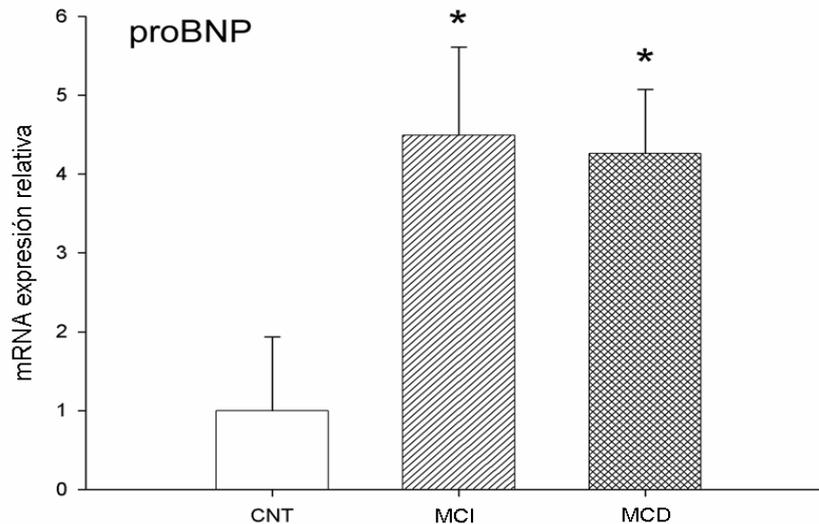


Figure 30. Expresión transcripcional de proBNP en corazones humanos. El ARN fue extraído de corazones con miocardiopatía isquémica (MCI) y dilatada (MCD) y sujetos donantes como grupo control (CNT) sometidos a PCR cuantitativa en tiempo real. Los valores de los controles se establecieron en 1, y la expresión relativa de ARNm representan las veces que están aumentado su expresión respecto al CNT. Cada columna representa la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs. CNT).

La Figura 31 muestra las correlaciones existentes entre los niveles de proBNP, BNP, y NT-proBNP en las 49 muestras incluidas en este estudio. Los niveles tisulares de proBNP se correlacionaron bien con BNP ($r=0,74$; $p < 0,0001$) y NT-proBNP ($r=0,53$; $p < 0,0001$). También encontramos una buena correlación entre los niveles de BNP y NT-proBNP en tejido cardiaco ($r=0,71$; $p < 0,0001$). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre los niveles proteicos de proBNP, BNP o NT-proBNP con la expresión de ARNm de proBNP.

Cuando analizamos la asociación de PN según la etiología de la IC y en el grupo CNT, obtuvimos correlaciones altamente significativas (Tabla 18). Además, la correlación de proBNP en tejido con BNP fue mayor que con NT-proBNP en el grupo de MCI, MCD y CNT. Finalmente, los coeficientes de correlación entre los péptidos natriuréticos fueron ligeramente mayores en el grupo de pacientes con MCD al compararlos con el grupo con MCI, excepto para la correlación entre proBNP y BNP ($r=0,60$ vs. $r=0,72$).

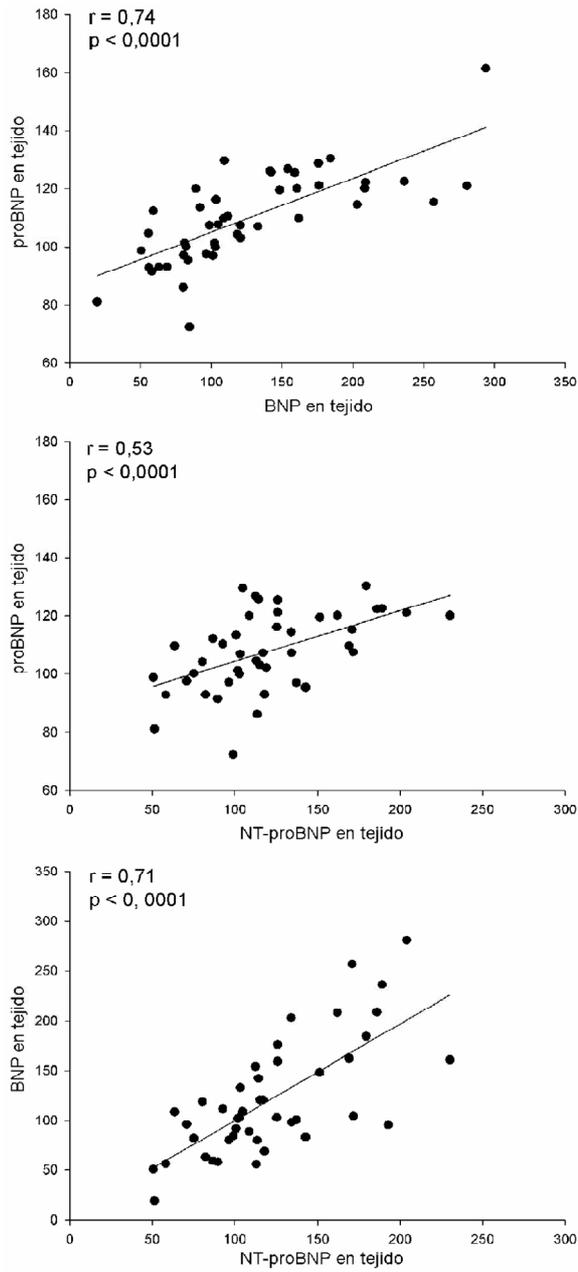


Figura 31. Correlación entre los niveles de proBNP, BNP y NT-proBNP en muestras de ventrículo izquierdo de 49 pacientes diagnosticados con insuficiencia cardiaca sometidos a transplante cardiaco.

**Tabla 18.** Correlaciones entre los niveles de péptidos natriuréticos calculados en corazones humanos con insuficiencia cardiaca y también en grupo control.

	CNT (n=5)	MCI (n=28)	MCD (n=16)	PAC (n=44)
proBNP vs. BNP	r=0,99 (p<0,001)	r=0,72 (p<0,0001)	r=0,60 (p=0,015)	r=0,78 (p<0,0001)
proBNP vs. NT-proBNP	r=0,90 (p=0,037)	r=0,43 (p=0,032)	r=0,58 (p=0,03)	r=0,51 (p<0,001)
BNP vs. NT-proBNP	r=0,90 (p=0,037)	r=0,58 (p=0,003)	r=0,84 (p<0,0001)	r=0,71 (p<0,0001)

BNP: péptido natriurético tipo B; CNT: control; MCD: miocardiopatía dilatada; MCI: miocardiopatía isquémica; NT-proBNP: fragmento N-terminal de BNP; PAC: pacientes.

Por otro lado, determinamos los niveles de NT-proBNP en suero en 16 de los pacientes sometidos a transplante cardiaco y analizamos las relaciones con los niveles titulares de las tres formas de PN. Se obtuvo que la concentración sérica de NT-proBNP se correlacionó con la niveles tisulares de proBNP ($r=0,23$), BNP ($r=0,41$) y NT-proBNP ($r=0,55$, $p<0,05$).

Los niveles de proBNP, BNP y NT-proBNP no se correlacionaron con la edad, en tejido cardiaco. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de PN según si los pacientes eran obesos o fumadores; sin embargo, los corazones de pacientes diabéticos e hipertensos mostraron un aumento en la expresión de PN. No se analizó la influencia del género, porque el 98% de nuestros pacientes eran varones. Se realizó una regresión lineal múltiple para analizar la influencia de diferentes parámetros ecocardiográficos y factores de riesgo cardiovascular sobre los niveles de PN (Tabla 19). El mejor modelo que se asoció con los niveles tisulares de proBNP incluyó la clase funcional NYHA ($p=0,006$), diabetes ($p=0,030$) y diámetro telediastólico ($p=0,018$) (hipertensión mostró una fuerte tendencia estadística, $p=0,067$), con una r^2 de 0,64. Para los niveles de BNP, fueron factores: diabetes ($p=0,036$) y clase funcional NYHA ($p=0,015$), con una r^2 de 0,52. El mismo modelo asociado con la expresión de NT-proBNP no incluyó ninguna de estas covariables.

Por último, cuando comparamos los niveles de PN entre pacientes con IC y corazones CNT, obtuvimos que los niveles de proBNP y NT-proBNP fueron más altos en el conjunto de muestras patológicas (111 ± 16 vs. 100 ± 5 ua, $p=0,006$; 124 ± 44 vs. 100 ± 12 ua, $p=0,011$) (Fig. 32);

**Tabla 19.** Regresión lineal múltiple para la detección de factores que influyen sobre los niveles tisulares de péptidos natriuréticos en corazones con insuficiencia cardíaca.

Variable	Coeficientes no estandarizados		
	Beta	ES	P valor
Modelo para proBNP:			
Edad	0,034	0,340	0,922
Clase funcional NYHA	29,859	9,127	0,006
Diabetes	18,447	7,651	0,030
Hipertensión	14,962	7,550	0,067
Obesidad	-3,724	13,162	0,781
DTS	-0,982	0,557	0,100
DTD	1,740	0,653	0,018
Modelo para BNP:			
Edad	0,683	1,675	0,690
Clase funcional NYHA	124,420	44,935	0,015
Diabetes	87,596	37,666	0,036
Hipertensión	62,406	37,168	0,115
Obesidad	1,824	64,801	0,978
DTS	0,981	2,744	0,726
DTD	0,004	3,214	0,999
Modelo para NT-proBNP:			
Edad	0,467	1,084	0,673
Clase funcional NYHA	57,310	33,760	0,113
Diabetes	29,511	25,087	0,261
Hipertensión	19,463	26,426	0,474
Obesidad	5,120	41,912	0,905
DTS	0,371	1,764	0,837
DTD	0,235	2,087	0,912

BNP: péptido natriurético tipo B; DTDVI: diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DTSVI: diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; NYHA: *New York Heart Association*.

la expresión de BNP también estuvo aumentada, pero no se alcanzó diferencia estadística (128 ± 64 vs. 100 ± 29 ua, $p=0,109$). Al comparar la cantidad de PN en tejido según la etiología de IC, obtuvimos que corazones con MCI tenían aumentados los niveles proteicos de proBNP (133 ± 44 vs. 100 ± 12 ua, $p=0,002$), BNP (146 ± 68 vs. 100 ± 29 ua, $p=0,024$), y NT-proBNP (133 ± 44 vs. 100 ± 12 ua, $p=0,002$) respecto al grupo CNT a nivel tisular. Sin embargo, los corazones con MCD no mostraron diferencias significativas en los valores de PN al compararlos con corazones sanos. Además, sólo los niveles de BNP en el grupo de pacientes diagnosticados con MCI estaban aumentados (46%, $p=0,008$) respecto al grupo de corazones con MCD.

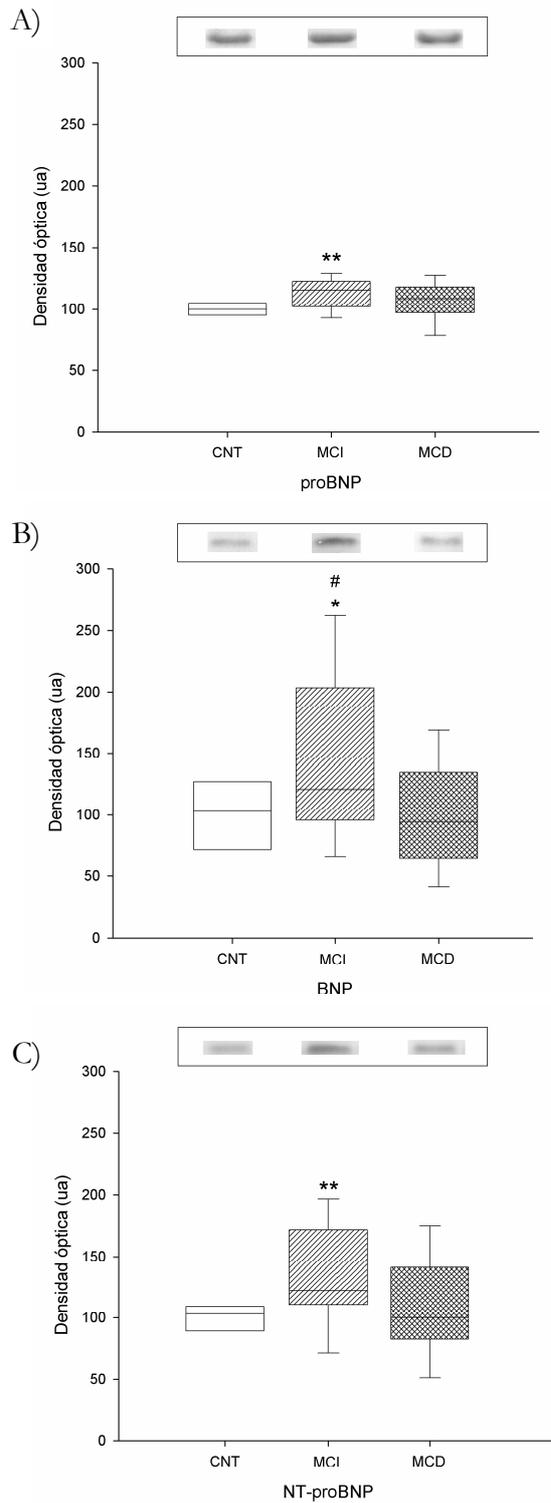


Figura 32. Influencia de la etiología de la insuficiencia cardíaca sobre la expresión de péptidos natriuréticos. Niveles de proBNP, BNP y NT-proBNP en 28 corazones con miocardiopatía isquémica (MCI), en 16 con miocardiopatía dilatada (MCD) y 5 muestras control (CNT). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con CNT; # $p < 0.01$ comparado con MCD. Las cajas representa la mediana (barra horizontal), el rango intercuartílico (límite superior e inferior de las cajas), y el percentil 5 y 95 (barras de error).





V. DISCUSIÓN

“Ha quedado enteramente confirmado por la razón y por medio de experimentos, que el pulso de los ventrículos obliga a la sangre a atravesar los pulmones y el corazón y la empuja y la lanza por todo el cuerpo. Que luego se insinúa por las venas y por las porosidades de la carne, y por las propias venas refluye de todos los puntos de la circunferencia hacia el centro, de las venas más delgadas a las mayores y de éstas a la vena cava, hasta llegar finalmente a la aurícula derecha del corazón. También que tanta es su cantidad y tanto su flujo de aquí para allá por las arterias y de allá para acá regresando por las venas, que no es posible que se derive de los alimentos, pues sobrepasa en abundancia a los ingeridos y a los que pudieran ser requeridos para la nutrición.”

Descripción de la circulación mayor
“Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus”
(Ensayo anatómico sobre el movimiento del corazón y la sangre en los animales)
(1628)
William Harvey (1578 - 1657)



La insuficiencia cardiaca (IC) está caracterizada por una marcada activación fisiológica de distintos sistemas de neurohormonas que circulan por el torrente sanguíneo. De hecho, esta activación se relaciona con la capacidad funcional, el grado de disfunción ventricular y también con la mortalidad.

El miocardio sintetiza una familia de péptidos, con propiedades natriuréticas, vasodilatadoras y antimiotogénicas, en respuesta a la sobrecarga de volumen y presión que produce un estrés sobre su pared, auricular y ventricular. Estos péptidos denominados natriuréticos, estructuralmente similares, pero genómicamente distintos (un gen diferente codifica la prohormona precursora de cada uno de ellos), contribuye a la homeostasis cardiovascular y al control de la tensión arterial. De esta forma, los niveles circulantes de éstos aumentan tanto en pacientes con hipertrofia ventricular izquierda, hipertensión arterial y pulmonar, disfunción ventricular sistólica o diastólica, infarto agudo de miocardio o IC, lo que les otorga un importante papel en la patofisiología de estas enfermedades. En este contexto, las concentraciones plasmáticas de algunos péptidos natriuréticos (BNP y NT-proBNP) pueden ayudar en la estratificación funcional de pacientes con IC, y en el proceso de diagnóstico y pronóstico de la disfunción ventricular e IC, pues actúan como factores independientes para establecer el riesgo cardiovascular. En concreto, BNP se sintetiza como una prohormona (proBNP) que se escinde dando lugar a la hormona biológicamente activa (BNP) y a un fragmento N-terminal (NT-proBNP).

1. RELACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1. FUNCIÓN DIASTÓLICA VENTRICULAR. VELOCIDAD MÁXIMA DE RELAJACIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-proBNP EN SUERO

En años recientes la utilización de la ecocardiografía y el estudio Doppler para el análisis de la función sistólica y diastólica ha ido en aumento.



La función diastólica se establece mediante el patrón de la velocidad de llenado mitral, y el índice más utilizado para definirla es el cociente E/A; sin embargo, este índice tiene limitaciones tales como amplios rangos para sujetos sanos dependiendo de la edad, y una distribución típica en “forma de U”, que incluye desde un patrón normal de relajación a uno pseudonormal o “retrasado” en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) y presión auricular izquierda elevada (García *et al.*, 1998). En consecuencia, existe la necesidad de establecer un nuevo índice ecocardiográfico más accesible y que interprete mejor la función diastólica.

La velocidad máxima de relajación (RVm) es conceptualmente un parámetro sencillo, que se define como la velocidad máxima del desplazamiento del plano aurículo-ventricular o anillo mitral hacia la base del corazón durante la fase de llenado temprano (Bojö *et al.*, 1998). En nuestro estudio se determinó, mediante registro eco-Doppler en modo M, la RVm que se obtiene fácilmente en la mayoría de los pacientes y no es dependiente de la función mecánica de la aurícula izquierda. En contraste, el cociente E/A es dependiente de la función sistólica de la aurícula izquierda, del gradiente de presión transmitral y de las propiedades diastólicas del ventrículo izquierdo durante la fase de llenado temprano y fase auricular. Estudios previos que incluyeron pacientes con infarto agudo de miocardio, sin hipertensión, mostraron que el cociente E/A tenía un solapamiento considerable con sujetos sanos, mientras este aspecto es menor para la RVm (Bojö *et al.*, 1998, Bojö *et al.*, 2000). Otros parámetros diastólicos tienen limitaciones similares: así, el tiempo de deceleración (TD) sigue un comportamiento no lineal cuando la función diastólica se deteriora, y desciende en pacientes con patrón restrictivo; y la velocidad de propagación del flujo mitral (Vp), que aunque es relativamente independiente de la precarga y lineal al grado de disfunción diastólica, se basa en el llenado mitral y por ello, no mide directamente la dinámica del miocardio ventricular (Thomas *et al.*, 1991). Por otro lado, el Doppler tisular desarrollado recientemente, puede grabar velocidades del miocardio, pero desgraciadamente su aplicabilidad no está disponible en todos los hospitales (Sohn *et al.*, 1997, Bojö *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas en el párrafo anterior sobre los distintos parámetros diastólicos, en este estudio hemos usado



grabaciones en modo M del anillo mitral como un índice de la función diastólica; y así hemos medido la velocidad máxima ascendente durante la diástole temprana como una expresión de la velocidad máxima de relajación (RVm) del ventrículo izquierdo.

El cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson en los pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) y una fracción de eyección (FE) $>40\%$ muestran una correlación directa y significativa entre la RVm, el DPAV, V_p y el cociente E/A; además, correlación inversa con la edad, y los niveles séricos de NT-proBNP. En el grupo de pacientes con IC y una FE $\leq 40\%$, la RVm mostró una correlación directa con el DPAV y la FE, con una correlación inversa significativa con los niveles de NT-proBNP. Estos hallazgos indican que la RVm se correlacionó mejor con los distintos parámetros de función (DPAV, RVm, V_p y E/A) y con los niveles de NT-proBNP en pacientes con FE $>40\%$, aunque mostró una buena correlación con la concentración del péptido en ambos grupos de pacientes (FE $>40\%$ y FE $\leq 40\%$). El mejor coeficiente de correlación obtenido entre RVm y parámetros de función fue de 0,589, indicando que RVm no podría ser empleada como único índice de medida de la función cardíaca en pacientes con IC. Sin embargo, la buena correlación obtenida entre RVm y los niveles de NT-proBNP en suero apoyan la realización de futuros estudios.

Para investigar como distintas variables (edad, índice de masa corporal, otros parámetros sistólicos y diastólicos, y la medicación) influyen sobre la relación entre la RVm y NT-proBNP, se realizó una regresión múltiple la cual mostró que la FE influía más que el cociente E/A en la relación entre NT-proBNP y RVm. Esta asociación también estuvo influenciada por la edad, en concordancia con estudios previos donde se observó que el patrón de contracción del ventrículo izquierdo cambiaba con la edad en sujetos sanos (Nilsson *et al.*, 2002). Cuando se incluyeron dentro del análisis las variables V_p , TD, IMC y medicación, no aportaron poder adicional al modelo, en el cual los niveles de NT-proBNP eran la variable dependiente. Cuando se realizó la regresión múltiple en el grupo de pacientes con FE $>40\%$ para analizar como las variables mencionadas anteriormente podían influir en la relación entre NT-



proBNP y RVm, obtuvimos que sólo la edad aportaba información adicional al modelo.

Por otro lado, se analizó los valores de RVm según la gravedad de la IC, para ver si este parámetro diastólico pudiese estar relacionado con el estado funcional de los pacientes incluidos en este proyecto. Se obtuvo un descenso significativo en las cifras de RVm en los pacientes con clase funcional NYHA II y NYHA III en comparación con el grupo en NYHA I.

En resumen, los hallazgos encontrados en este estudio apoyarían nuestra hipótesis de que la velocidad de relajación máxima del ventrículo izquierdo (RVm), parámetro diastólico, está relacionada con los niveles séricos de NT-proBNP y con el estado funcional de la insuficiencia cardiaca.

1.2. FUNCIÓN VENTRICULAR. VALORES DE LAS ÁREAS TELEDIASTÓLICA Y TELESISTÓLICA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO Y CONCENTRACIÓN DE NT-PROBNP EN SUERO

Una determinación precisa del volumen del ventrículo izquierdo es importante en el manejo clínico de pacientes con enfermedad cardiaca. La ecocardiografía es un buen método para estas determinaciones ya que es no invasiva, es transportable y permite un seguimiento de los pacientes. Los métodos ecocardiográficos bidimensionales requieren de la adquisición de imágenes del corazón mediante planos estandarizados. El volumen del ventrículo izquierdo y la fracción de eyección (FE) se calculan asumiendo que la forma del ventrículo está representada como figuras geométricas individuales (método área/longitud) o mediante su combinación (método de Simpson) (Schiller *et al.*, 1989); aunque estas asunciones geométricas podrían no ser correctas en ventrículos distorsionados. Sin embargo, la ecocardiografía tridimensional permite la cuantificación del volumen ventricular sin algoritmos ecocardiográficos (Siu *et al.*, 1993, Sugeng *et al.*, 2003), pero su aplicabilidad no está ampliamente difundida. Puesto que algunos de los algoritmos establecidos para el cálculo de los volúmenes ventriculares mediante ecocardiografía bidimensional podrían ser inadecuados, ya que los ventrículos desarrollan formas asimétricas, sobretodo en pacientes con enfermedades cardiacas, las áreas del ventrículo medidas mediante planimetría podrían ser una forma fácil y



accesible que reflejase los cambios en el tamaño y función del ventrículo izquierdo.

Por otro lado, la concentración de NT-proBNP es un potente marcador de las dimensiones del ventrículo izquierdo y de la función sistólica en pacientes con insuficiencia cardiaca, discriminando bien entre sujetos sanos y sujetos con disfunción sistólica o con aumento del volumen del ventrículo izquierdo (Groenning *et al.*, 2002, Rivera *et al.*, 2003b, Hildebrandt *et al.*, 2004). En este contexto hemos observado que las áreas del ventrículo izquierdo reflejan los niveles séricos de NT-proBNP en pacientes, al mostrar una buena correlación. De hecho, la concentración de NT-proBNP estuvo correlacionada significativamente con las áreas telediastólica y telesistólica del ventrículo izquierdo, y con la fracción de cambio del área del VI (FCA). Estas correlaciones mejoraron cuando se consideró la superficie corporal de los pacientes, obteniéndose los índices de las áreas telediastólica (IATD) y telesistólica (IATS).

Para investigar cómo las áreas ventriculares y sus índices derivados (normalizadas por la superficie corporal del paciente), la edad, el género, la velocidad de propagación del flujo transmitral (V_p) y el índice de masa corporal (IMC), influyen sobre los niveles de NT-proBNP en suero en la insuficiencia cardiaca (IC), se realizó una regresión lineal múltiple. El mejor modelo mostró a las variables FCA e IATS como factores que influyen sobre los niveles séricos de NT-proBNP, tras el ajuste estadístico por edad e IMC.

Con relación a las correlaciones entre las áreas y sus índices derivados, con la concentración de NT-proBNP en pacientes con miocardiopatía isquémica, sólo mostraron una correlación significativa con el péptido, IATS y FCA. En la miocardiopatía dilatada los niveles de NT-proBNP se correlacionaron con ambas áreas, sus índices derivados y la fracción de cambio. Estos hallazgos indican que el origen para la elevación de los niveles del *biomarcador*, objetivo de este proyecto de tesis doctoral, en la miocardiopatía isquémica es más compleja que en la etiología dilatada, y que otros factores a parte del área del ventrículo y sus volúmenes, están implicados en esta patología, en la producción de NT-proBNP.



Ha sido considerado que después de un infarto de miocardio, la producción de péptidos natriuréticos está regulada, en gran parte, por los mecanismos locales que suceden alrededor de la zona infartada (Sumida *et al.*, 1995). De esta manera, a pesar de que los valores del área ventricular y sus índices derivados son similares en nuestros pacientes, no es raro que su correlación con NT-proBNP no sea más fuerte en este grupo de pacientes que en los de miocardiopatía dilatada. Estudios previos han demostrado el papel de este péptido natriurético durante un síndrome coronario agudo (Omland *et al.*, 2002, Jernberg *et al.*, 2002). La elevación de los niveles séricos de NT-proBNP en pacientes con miocardiopatía isquémica está relacionada con la patofisiología de la enfermedad coronaria. Así, los valores medios más elevados y la mayor variabilidad de la concentración de NT-proBNP descrita en pacientes con infarto agudo de miocardio previo, al compararlos con otros grupos diagnóstico, podría estar relacionado con el tamaño del infarto y localizaciones diferentes, con el remodelado ventricular que sigue al infarto o con episodios recurrentes de isquemia (Seino *et al.*, 2004). También en este estudio se ha tenido en cuenta que un patrón de llenado restrictivo de la velocidad de flujo transmitral está asociado con mayores niveles de NT-proBNP, independientemente del aumento de los volúmenes del ventrículo izquierdo (Yu *et al.*, 1996, Rivera *et al.*, 2003); esta situación interferiría con la relación lineal entre NT-proBNP y las áreas ventriculares. Sin embargo, el patrón de llenado restrictivo es más frecuente entre pacientes con miocardiopatía hipertensiva (Bounhoure *et al.*, 2002), y en nuestra población sólo el 13% de los pacientes tenían este diagnóstico.

En resumen, los resultados obtenidos mediante el análisis de las áreas ventriculares son similares a los calculados previamente con los volúmenes. Por otro lado, la determinación de las áreas, obtenidas directamente mediante planimetría en ecocardiografía bidimensional, mejora la precisión y reproducibilidad respecto al cálculo de los volúmenes mediante asunciones geométricas; y, en consecuencia, la correlación con los péptidos natriuréticos es más reproducible. Además, cuando consideramos los dos grupos etiológicos más representativos en nuestros pacientes (miocardiopatía isquémica y dilatada), se encontró que la correlación de los niveles en suero de NT-



proBNP con las áreas ventriculares e índices derivados, fue mayor en el grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca de origen dilatado.

2. RELACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP CON *BIG* ENDOTELINA-1 Y ALDOSTERONA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Aunque existen trabajos que relacionan los valores de endotelina-1 con los péptidos natriuréticos y con la función ventricular en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) (Kinugawa *et al.*, 2003, Ry *et al.*, 2001), en este proyecto de tesis hemos decidido estudiar los valores de *big* endotelina-1 porque podrían reflejar mejor las acciones (vasoconstricción, proliferación celular ...) que desarrolla el complejo *big* ET-1/ET-1.

Está demostrado que *big* ET-1 tiene una vida media mayor que ET-1 y un aclaramiento más lento; la elevación en plasma de ET-1 en pacientes con IC se debe fundamentalmente a una elevación de las concentraciones de *big* ET-1, ya que ET-1, como todo péptido con alta actividad biológica, se aclara rápidamente y su acción paracrina no se refleja en su concentración sanguínea (Wei *et al.*, 1994). ET-1 es un potente estimulador de la síntesis y liberación de péptidos natriuréticos en los tejidos cardíacos (Winqvist *et al.*, 1989, Thibault *et al.*, 1994). Además, se ha sugerido que parte de la acción vasodilatadora de estos péptidos podría ser debida a una reducción en la producción basal de ET-1 (Levin 1995, Saijonmaa *et al.*, 1990) y se ha hipotetizado la presencia de un mecanismo de *feedback* entre ellos que contribuye a la regulación del tono vascular (Kohno *et al.*, 1992, Kohno *et al.*, 1991).

Puesto que la síntesis de la ET-1 está estrechamente relacionada con los niveles de la *big* ET-1 (Wei *et al.*, 1994), debería plasmarse este efecto de inhibición al correlacionar los valores de este precursor con los valores del NT-proBNP. Sin embargo, hemos obtenido un grado de correlación positivo significativo entre *big* ET-1 y el péptido natriurético tanto en pacientes con miocardiopatía dilatada como isquémica, lo que es consistente con estudios previos donde se correlaciona los niveles de ANP con los de *big* ET-1 (Pacher



et al., 1993, Pacher *et al.*, 1996). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de los cambios presión-volumen en los que están implicados ambos sistemas, y aunque las dos moléculas producen efectos opuestos sobre algunas variables hemodinámicas, los valores de NT-proBNP y *big* ET-1 son marcadores pronóstico en pacientes con IC (Pacher *et al.*, 1996, Masson *et al.*, 2006a, Masson *et al.*, 2006b).

Por otro lado, hemos observado una falta de relación inversa entre los niveles de NT-proBNP séricos y aldosterona, a pesar de que estudios previos muestren una reducción de la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona por el efecto de los péptidos natriuréticos (Levin *et al.*, 1998), pudiendo ser debido a una pérdida de los mecanismos de regulación fisiológicos en la insuficiencia cardiaca, como también muestran otros autores (Gosling *et al.*, 2005).

3. INFLUENCIA DE LA OBESIDAD SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE NT-proBNP EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardiaca (IC) es una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población de los países desarrollados, y la obesidad es un factor de alto riesgo para desarrollar insuficiencia cardiaca (Eckel 1997).

Los niveles de BNP en suero están influenciados por género y edad (Wang *et al.*, 2002, Redfield *et al.*, 2002), y recientemente, se ha demostrado también que la obesidad está asociada con un descenso significativo de los niveles de BNP en pacientes diagnosticados de IC, indicando una menor respuesta en obesos (Mehra *et al.*, 2004). Wang y colaboradores (2004) han mostrado que los sujetos obesos sin IC del estudio poblacional “*Framingham Heart Study*” tuvieron niveles séricos de BNP y NT-proANP más bajos que los sujetos no obesos.

Un aspecto novedoso de nuestro proyecto de tesis doctoral es la determinación y análisis de los niveles de NT-proBNP plasmáticos en sujetos



obesos diagnosticados con IC, donde hemos encontrado que los niveles de NT-proBNP están disminuidos significativamente en los pacientes obesos (63% respecto al grupo “no obesos”). Además, la obesidad es un factor pronóstico independiente de los niveles de NT-proBNP, estando asociada con un 17% de descenso de los niveles de esta molécula en obesos con IC. Estos hallazgos se encontraron tanto en pacientes con miocardiopatía dilatada como con miocardiopatía isquémica; ambos grupos, cuando son obesos, presentan un 65% de descenso en la concentración sérica de NT-proBNP.

Nuestros resultados han sido similares a los publicados por otros autores en una muestra poblacional aleatoria del “*Dallas Heart Study*” (Das *et al.*, 2005), y han sugerido que la masa muscular esquelética podría ser la responsable de la asociación entre un alto índice de masa corporal (IMC) y baja concentración de BNP y NT-proBNP. El grupo de Bayés-Genís (2007) ha obtenido en pacientes del estudio ICON (“*International Collaborative of NT-proBNP*”), con o sin insuficiencia cardíaca aguda, que los obesos o con sobrepeso tuvieron una menor concentración de NT-proBNP en suero. Sin embargo, la concentración de este *biomarcador* mantuvo su capacidad diagnóstica y pronóstica en todas las categorías de IMC.

El nexo de unión entre una baja concentración de péptidos natriuréticos (PN) y obesidad no está totalmente aclarado. Existen diferentes hipótesis que podrían explicar este hecho: (1) una mayor captación de estas moléculas por el tejido adiposo; (2) una menor síntesis y liberación de péptidos natriuréticos por los ventrículos cardíacos; y (3) una mayor degradación de estos péptidos que contribuyera a un aumento de su aclaramiento. Veamos a continuación con mayor detalle estos apartados:

1) Estudios previos sugieren que el aumento de la masa total del tejido adiposo en los sujetos obesos podría influir sobre la actividad de los péptidos natriuréticos, a través de una mayor expresión por las células adiposas del receptor tipo C (RPN-C), biológicamente inactivo, previniendo de esta manera la unión de los *biomarcadores* a las formas activas de los receptores (RPN-A y RPN-B) y aumentando su aclaramiento a nivel del tejido adiposo (Dessi-Fulgheri *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2004). Sin embargo, la relación entre NT-proBNP y NT-proANP con el IMC sugiere un mecanismo diferente, puesto



que estos péptidos no son aclarados por los receptores activos específicos (RPN-A y RPN-B) ni por el receptor de aclaramiento (RPN-C) (Vanderheyden *et al.*, 2004).

2) Recientemente, algunos autores han sugerido que la menor síntesis y liberación de PN desde los cardiomiocitos podría explicar la correlación entre un mayor IMC y una concentración baja de PN (Das *et al.*, 2005, Van Kimmenade *et al.*, 2006). El hallazgo de unos niveles menores de NT-proBNP en nuestro estudio apoyaría esta hipótesis, ya que este péptido, como ya hemos dicho, no es aclarado por su unión a los receptores de aclaramiento (RPN-C) (Vanderheyden *et al.*, 2004). Krauser y colaboradores (2005) también sugieren que los individuos obesos tienen una disminución en la liberación de NT-proBNP inducida por la obesidad. Así, este hecho sostiene que el mismo mecanismo podría ser aplicado a los niveles de BNP, porque ambos péptidos son escindidos por la corina de la misma molécula precursora (proBNP) (Vanderheyden *et al.*, 2004). Además, una evidencia reciente es que los péptidos natriuréticos promueven la lipólisis en humanos, mediado por la interacción de éstos con sus receptores activos (RPN-A y RPN-B) (Sengenés *et al.*, 2000, Dessi-Fulgheri *et al.*, 2003); indicando que la disminución de la concentración de PN podría conducir a una reducción de la lipólisis, contribuyendo a un estado de obesidad continuo. Por último, el estudio ICON (Bayés-Genís *et al.*, 2007) sugiere que unos niveles menores de NT-proBNP son debidos a una menor liberación desde los ventrículos, mientras que los valores de BNP están afectados por una menor liberación y un mayor aclaramiento.

3) En el estudio “Dallas Heart Study” (Das *et al.*, 2005) se ha postulado que una sustancia producida por el tejido muscular suprime tanto la síntesis como la liberación de BNP y NT-proBNP desde los cardiomiocitos. Sin embargo, Hunt y colaboradores (1997) y, también el grupo de Goetze (2006) han mostrado que no ocurre aclaración de NT-proBNP en los miembros inferiores, los cuales contienen gran cantidad de masa muscular. Por ello, la asociación entre NT-proBNP y la masa muscular podría estar causada por otros factores desconocidos en este momento. Un candidato podría ser las hormonas esteroideas que influyen de manera coordinada sobre la síntesis de PN y la composición corporal; los andrógenos que promueven el desarrollo de la masa muscular podrían suprimir la liberación de PN, mientras que los



estrógenos, los cuales están asociados con menor masa muscular, podrían aumentar los niveles de PN. Una hipótesis menos factible sería que la masa muscular secretase una sustancia que condujese a una degradación de BNP y NT-proBNP contribuyendo directamente al aclaramiento de estos péptidos.

Por último, el grupo de Schou y colaboradores (2007) establece una nueva hipótesis donde los efectos del índice de masa corporal y la edad sobre la concentración de NT-proBNP en suero estarían asociados con el filtrado glomerular renal en pacientes con insuficiencia cardíaca. De esta forma, la hiperfiltración glomerular, más que la obesidad por sí sola, podría dar concentraciones falsas de NT-proBNP en pacientes obesos con IC moderada.

Otros factores de riesgo cardiovascular, bien establecidos, son la hipertensión y la diabetes. Estudios previos muestran que la influencia de la obesidad sobre los niveles de PN en suero es independiente de la influencia de estos factores de riesgo en sujetos sanos (Wang *et al.*, 2004). Circunstancia que también ocurre en nuestra población, donde ninguno de estos factores, ni la medicación empleada, influyen sobre la asociación de la obesidad sobre los niveles de NT-proBNP.

Estos hallazgos afectan a la utilización de los niveles séricos de NT-proBNP como un factor diagnóstico en la insuficiencia cardíaca; sobretodo en los pacientes obesos, un grupo de alto riesgo cardiovascular, donde a veces es difícil establecer un diagnóstico mediante la exploración física o la capacidad funcional. El IMC debería ser tenido en cuenta en los diagnósticos poblacionales o en los servicios de urgencias a la hora de establecer puntos de corte para BNP y NT-proBNP, y así evitar un descenso en la sensibilidad de este test.

En cuanto a la aparente paradoja respecto a la relación entre la obesidad y el pronóstico cardiovascular, varios autores han encontrado una correlación inversa entre los índices de obesidad (IMC) y el pronóstico clínico en pacientes con IC (Anker *et al.*, 1997a, Anker *et al.*, 1997b, Horwich *et al.*, 2001). Por ello, la caquexia y el adelgazamiento podrían ser considerados predictores independientes de un aumento en la mortalidad en este síndrome. Además, se ha sugerido que una disminución de la activación del sistema neurohumoral podría ser un mecanismo de cardioprotección, un ejemplo



potencial sería la menor concentración de péptidos natriuréticos en suero en los sujetos obesos. Sin embargo, existen otros estudios que muestran que cuando en los análisis se introducen otras variables, por ejemplo la edad (Lavie & Milani 2003, Bayés-Genís *et al.*, 2007), la asociación entre estos índices y la mortalidad se ve atenuada, por lo que la aparente paradoja representa una asociación que probablemente no es causal en la insuficiencia cardiaca.

Por último, debido al efecto de la obesidad sobre los niveles séricos de NT-proBNP se podría cuestionar el papel de este marcador como factor pronóstico en la insuficiencia cardiaca. El IMC tendría que ser tenido en cuenta tanto al establecer puntos de corte como al utilizar porcentajes de cambio de los niveles de NT-proBNP, al ingreso o después del tratamiento de una crisis de IC. Además, debería ser necesario organizar un seguimiento a largo plazo de los pacientes obesos con IC para determinar el valor pronóstico en este grupo con alto riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

4. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE NT-proBNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Los péptidos natriuréticos son marcadores de la hipertrofia ventricular izquierda, de la disfunción ventricular y de la insuficiencia cardiaca (IC). Sin embargo, estudios anteriores, a este proyecto de tesis doctoral, sobre la presencia de péptidos natriuréticos en orina y su significado clínico son escasos (Togashi *et al.*, 1992, Heringlake *et al.*, 2004). Nuestro trabajo demuestra que: (1) los niveles de NT-proBNP son detectables en la orina de pacientes con insuficiencia cardiaca y en sujetos sanos; (2) son un factor diagnóstico de la insuficiencia cardiaca; y (3) son un factor pronóstico para eventos cardiovasculares.

Los niveles de NT-proBNP fueron más elevados en suero que en orina en el 94% de los pacientes, mientras que en el grupo control sólo ocurrió en el 10% de los sujetos. Este hallazgo es contrario a los resultados publicados anteriormente por el grupo de Ng y colaboradores (2004, 2005). La fuente de



producción de péptidos natriuréticos no está totalmente explicada, los miocitos cardiacos son su principal fuente, pero las células del túbulo renal también los producen. Por lo tanto, los niveles en orina podrían reflejar la síntesis a nivel local, dentro del riñón, de NT-proBNP y también la cantidad producida por el miocardio que ha sido filtrada en el glomérulo (Totsune *et al.*, 1996, Mistry *et al.*, 2001). También cabría esperar que los sujetos sanos tuviesen una circulación peritubular y una expresión de receptores de péptidos natriuréticos en los riñones diferente a la de pacientes con IC, dando lugar a una menor reabsorción tubular al torrente sanguíneo de este péptido, y a una menor concentración en sangre de NT-proBNP (Mistry *et al.*, 2001). Además, en los pacientes, los niveles de NT-proBNP en orina mostraron una buena relación con la concentración del péptido en suero, situación que no ocurrió en el grupo control. Quizás porque en estos sujetos el diferente metabolismo renal de NT-proBNP no permita que sean un buen reflejo de los niveles en suero.

La influencia de la edad, género, función ventricular sistólica y diastólica, creatinina sérica y obesidad sobre los niveles de NT-proBNP en suero está bien establecida (Redfield *et al.*, 2002, Mehra *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). Para investigar cómo afectan estas variables a los niveles de NT-proBNP en orina, se realizó una regresión lineal múltiple donde los niveles de NT-proBNP y creatinina sérica fueron factores independientes de los niveles del *biomarcador* en la orina de pacientes con insuficiencia cardiaca (IC). La dependencia con los niveles en suero de NT-proBNP y la creatinina sérica no es sorprendente, incluso al nivel de nuestros valores de creatinina ($1,2 \pm 0,7$ mg/dL), porque la excreción renal es una importante vía de aclaramiento de NT-proBNP (Goetze *et al.*, 2006, Palmer *et al.*, 2009). La obesidad no fue un predictor independiente de los niveles de NT-proBNP en orina, aunque los pacientes obesos con IC mostraron menores niveles urinarios de péptido natriurético. Este hecho podría ser debido a una mayor degradación renal de NT-proBNP, quizás por la acción de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP IV/CD26; EC 3.4.14.5), localizada en los riñones y con gran afinidad por los péptidos natriuréticos (Brandt *et al.*, 2006)

Estudios previos han mostrado la utilidad de los niveles de NT-proBNP en suero para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca (Seino *et al.*, 2004, McDonagh *et al.*, 2004) y disfunción ventricular (Bay *et al.*, 2003). Por



ello, no es extraño que la concentración de NT-proBNP en orina sea un potente predictor de insuficiencia cardiaca. El análisis del área bajo la curva (ABC) de este estudio sugiere que, bajo sus condiciones de diseño (un grupo de pacientes con diagnóstico confirmado de IC y un grupo control), el punto de corte de 74,23 pg/mL para NT-proBNP en orina discrimina entre pacientes y controles. Los niveles del péptido en suero mostraron un ABC ligeramente superior. Ambos tipos de muestras mostraron similares especificidad, sensibilidad y valores predictivo positivo y negativo, siendo efectivos en la exclusión del diagnóstico de insuficiencia cardiaca. Hay que mencionar que nuestros puntos de corte para los niveles de NT-proBNP en suero, fueron menores a los que presentan las Guías de la Sociedad Europea de Cardiología para el diagnóstico de IC. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los valores establecidos son para pacientes no tratados con síntomas posibles de IC, que no es el caso de nuestra población de estudio, con IC confirmada y bajo tratamiento médico (Dickstein *et al.*, 2008).

En cuanto a la caracterización funcional de los pacientes, la media de los niveles de NT-proBNP en orina fue significativamente elevada en clases funcionales más deterioradas (NYHA III); también se encontraron diferencias entre el grupo control y pacientes en clase funcional NYHA I, II y III.

En este trabajo hemos demostrado el valor pronóstico de la concentración de NT-proBNP en orina. Para ello, se realizó una regresión binaria logística que mostró si los valores del péptido eran capaces de predecir los eventos de origen cardiaco (ingresos o mortalidad) en un seguimiento a 12 meses. En el modelo se incluyeron variables como edad, clase funcional, obesidad, fracción de eyección y los niveles de NT-proBNP en orina. Estos últimos fueron un factor de riesgo mostrando una *odds-ratio* de 4,5 para la presencia de eventos de origen cardiaco. Además, el *biomarcador* obtuvo una buena ABC para la predicción de mortalidad cardiaca aislada en un seguimiento a 12 meses. También los niveles de NT-proBNP en orina y suero mostraron unas buenas ABC para la predicción de los eventos de origen cardiaco, obteniendo ambos tipos de muestras puntos de corte con buena sensibilidad y especificidad.



Para analizar los eventos cardíacos en los pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca según los niveles urinarios de NT-proBNP, se formaron dos grupos de acuerdo al punto de corte 92,61 pg/mL; extraído de la curva ROC, para predecir mortalidad con mejor sensibilidad, especificidad y valores predictivos. El porcentaje de eventos cardíacos fue mayor (52%) en el grupo de pacientes con niveles de NT-proBNP > 92,61 pg/mL en orina frente a los pacientes con valores por debajo del punto de corte (21%); de la misma forma el porcentaje de mortalidad cardíaca aumentó seis veces más en el grupo con NT-proBNP > 92,61 pg/mL (24% versus 4%).

Por último, las curvas de supervivencia Kaplan-Meier para ambos tipos de muestras de NT-proBNP, orina y suero, mostraron que predecían tanto la mortalidad aislada como los eventos de origen cardíaco a 12 meses. La concentración de NT-proBNP en orina mostró un mayor poder predictivo para los eventos que los niveles en suero, mientras que para la mortalidad cardiovascular la concentración en suero fue mejor predictor.

En resumen, hemos comprobado la utilidad diagnóstica y pronóstica de los niveles de NT-proBNP en orina en pacientes con un diagnóstico establecido de insuficiencia cardíaca, y por lo tanto se necesitan futuros trabajos que evalúen la utilidad de este sencillo test, no invasivo, en estudios poblacionales, en atención primaria y como posible guía a la respuesta de diversos tratamientos; así como establecer si existe un beneficio adicional en términos de coste-efectividad.

5. PAPEL DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES URINARIOS DE BNP: CARACTERIZACIÓN Y PRONÓSTICO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Los péptidos natriuréticos BNP y NT-proBNP son marcadores establecidos de la disfunción ventricular y la insuficiencia cardíaca (McDonagh *et al.*, 1998, Koglin *et al.*, 2001, Maisel *et al.*, 2002). Estudios previos sobre el papel diagnóstico y pronóstico de estos péptidos se han realizado en muestras plasmáticas. Sin embargo, la detección de los péptidos natriuréticos en orina es



limitada (Togashi *et al.*, 1992, Heringlake *et al.*, 2004). En este trabajo hemos realizado los siguientes objetivos: (a) se ha detectado y cuantificado los niveles de BNP en orina en pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) y sujetos control; (b) se ha analizado el poder de detección de insuficiencia cardiaca y, (c) se ha determinado el valor pronóstico para eventos de origen cardiaco (ingresos + mortalidad) y mortalidad aislada de la concentración de BNP en orina.

A pesar de las concentraciones bajas de BNP en orina, se han encontrado diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control, incluso al comparar los pacientes asintomáticos (clase funcional NYHA I) con los sujetos sanos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles urinarios de BNP al comparar las clases funcionales más deterioradas (NYHA II versus NYHA III).

Como hemos mencionado en apartados anteriores de este trabajo, la fuente de producción de los niveles de BNP en orina no está bien establecida, pudiendo ser la suma de la cantidad de BNP filtrado en los glomérulos (procedente del miocardio) y el sintetizado dentro del riñón (Totsune *et al.*, 1996, Mistry *et al.*, 2001). Por otro lado, los niveles de BNP son aclarados principalmente vía la unión a sus receptores de membrana (RPN-A y RPN-B), vía degradación enzimática por endopeptidasas neutras y, por endocitosis mediada por el receptor de aclaramiento tipo C (RPN-C) (Nakao *et al.*, 1992, Hall 2004, Vanderheyden *et al.*, 2004). Mientras que el mecanismo de aclaramiento renal, para algunos autores, tiene un papel menor (Nakao *et al.*, 1992, Daniels & Maisel 2007). Estos hechos llevarían a suponer que no existiera una correlación entre las concentraciones de BNP en orina y suero. Sin embargo, ambos tipos de muestras mostraron una buena correlación, aunque inferior a la que presentan los niveles de NT-proBNP en orina en el mismo grupo de pacientes. Este hecho podría ser debido a que, a pesar de que existe bibliografía reciente que apoya una excreción renal similar para BNP y NT-proBNP (Schou *et al.*, 2005, Gotéese *et al.*, 2006, Tsutamoto *et al.*, 2006), la molécula de BNP posee otras vías de aclaramiento diferentes (Hall 2004, Daniels & Maisel 2007).

En el grupo control no se encontró una correlación significativa entre la concentración de BNP en suero y orina, como se obtuvo en el apartado



anterior para los niveles urinarios de NT-proBNP, lo que indicaría que la circulación peritubular y expresión de receptores fuese diferente en el grupo control que en los pacientes con IC, dando lugar a una menor asociación entre la concentración en suero y orina de BNP en sujetos sanos (Mistry *et al.*, 2001, Emdin *et al.*, 2005).

Cuando se analizó el poder de detección de insuficiencia cardiaca (IC) mediante BNP en orina, se observó que es un buen factor diagnóstico de este síndrome. Sin embargo, al compararlo con los niveles de BNP en suero, se observa una menor área bajo la curva (ABC). Este hecho podría explicarse porque en estados de cronicidad elevada, como en la insuficiencia cardiaca, niveles elevados de péptidos natriuréticos (BNP) son aclarados principalmente por la unión a sus receptores de membrana (RPN-A y RPN-B), para realizar sus efectos fisiológicos y contrarrestar los efectos adversos producidos por otras hormonas (Nakao *et al.*, 1992, Hall 2004). Además, el sistema renal parece no ser la única vía de aclaramiento de los niveles de BNP en suero por lo que los niveles de BNP en orina no reflejan tan bien la gravedad de la IC, como los niveles urinarios de NT-proBNP (Daniels & Maisel 2007). Cabe mencionar que nuestros puntos de corte para el BNP sérico fueron menores a los que existen en la Guías de la Sociedad Europea de Cardiología del 2008 para el diagnóstico de IC, destacando que en este caso son valores para pacientes no tratados con posibles síntomas de IC (Dickstein *et al.*, 2008)

Por otro lado, se realizó una regresión lineal múltiple para analizar la influencia de diferentes variables sobre los niveles de BNP en orina, y se observó que los niveles de BNP en suero y la fracción de eyección fueron factores predictores de la concentración de esta molécula. La obesidad no fue un factor predictivo de BNP en orina en nuestro modelo, pero los niveles de BNP estuvieron disminuidos en el grupo de pacientes obesos, como previamente mostraron otros autores para sus niveles séricos (Mehra *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004) y como también indican nuestros resultados para NT-proBNP en suero. Las posibles causas han sido explicadas en el apartado anterior, como una menor síntesis de BNP desde el miocardio, un mayor aclaramiento vía receptor tipo C y, por un aumento en la degradación del BNP vía renal, por la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV/CD26; EC 3.4.14.5) (Brandt *et al.*, 2006).



Este estudio demuestra también el valor pronóstico de los niveles de BNP en orina. Trabajos anteriores han indicado que los niveles de BNP son factor pronóstico de muerte, de visitas a los servicios de urgencias, o ingresos por causas cardíacas, y que pueden ser utilizados para tomar decisiones en el manejo de los pacientes (Bettencourt *et al.*, 2002, Maisel *et al.*, 2004, Morrow *et al.*, 2005, Fonarow *et al.*, 2007). Los resultados que hemos obtenido para el BNP urinario muestran que predice los eventos cardiovasculares (ingresos o mortalidad) en un seguimiento a doce meses en sujetos estables con IC. También se observó un aumento en la prevalencia de los eventos y mortalidad de origen cardíaco a 12 meses en aquellos pacientes con los niveles más altos de BNP, y se obtuvo una buena ABC para predecir la mortalidad cardiovascular aislada.

En resumen, la determinación de los niveles de BNP en orina podría ser útil en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca (IC) en condiciones específicas, donde la recogida de las muestras sería más fácil y menos invasiva para los pacientes. Sin embargo, son necesarios más estudios que demuestren los cambios de la concentración de BNP en orina como marcador diagnóstico y pronóstico de este síndrome, y también como guía en la respuesta al tratamiento de estos pacientes. Además, es de interés, en nuestra opinión, evaluar la relación coste-efectividad de este nuevo método en el análisis de pacientes con sospecha de IC, pudiéndose utilizar la concentración de BNP en orina de manera rutinaria en el ámbito clínico.

6. DIAGNÓSTICO DE LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE BNP EN ORINA

Este estudio ha establecido la utilidad de los niveles de BNP en orina para la detección y predicción de la disfunción ventricular izquierda (DVI), establecida como fracción de eyección (FE) menor o igual al 40%, en un grupo de pacientes no ingresados y diagnosticados de insuficiencia cardíaca (IC).



La fuente de producción de los niveles de BNP en orina es incierta; sus niveles podrían reflejar tanto la filtración glomerular de la cantidad de este péptido producida por el miocardio, como la secreción de BNP a nivel del túbulo renal; por lo tanto, los niveles de BNP en orina serían la suma de ambas cantidades, el BNP filtrado en los glomérulos y el sintetizado dentro del riñón (Totsune *et al.*, 1996, Mistry *et al.*, 2001). La correlación que muestra la concentración de esta molécula con distintos parámetros de función ventricular sistólica y diastólica en este estudio, apoyan la hipótesis de que el BNP cuantificado en la orina estaría estrechamente relacionado con la presencia de disfunción ventricular en estos pacientes. Esta afirmación se basa en la idea de que el BNP producido por el miocardio es secretado como respuesta a unas condiciones de sobrecarga continuadas, que conducen a un aumento en el estrés de pared de los ventrículos, mecanismos específicos de la IC y de la disfunción del ventrículo izquierdo (Levin *et al.*, 1998).

Estudios previos muestran que la concentración de BNP en orina está relacionada con el volumen de carga y la función renal (Heringlake *et al.*, 2004). Sin embargo, al realizar un análisis mediante regresión múltiple que incluyó diferentes factores que influyen sobre los niveles de BNP en orina (edad, género, obesidad, filtrado glomerular renal, BNP en suero, parámetros de función sistólica y diastólica, así como la medicación), mostró que sólo los niveles en suero del péptido, los índices de volumen telesistólico y telediastólico, y la fracción de eyección estaban asociados como factores independientes, mientras que el filtrado glomerular renal (eFGR), marcador de la función renal, no influyó sobre los niveles de BNP en orina. Este hallazgo está en concordancia con el hecho de que el aclaramiento de las formas activas (BNP) de los péptidos natriuréticos envuelve tres mecanismos principales: 1) la unión a sus receptores de membrana (RPN-A y RPN-B); 2) la degradación enzimática mediada por endopeptidasas neutras y, 3) endocitosis seguida de una degradación lisosomal a nivel celular, mediada por el receptor de aclaramiento tipo C (RPN-C) (Nakao *et al.*, 1992, Hall 2004, Vanderheyden *et al.*, 2004). Por lo tanto, el aclaramiento renal podría jugar un papel menos importante para los niveles de BNP (Nakao *et al.*, 1992, Daniels & Maisel 2007). Sin embargo, la determinación de BNP en orina apoya el hecho de que cierta cantidad de esta molécula es aclarada renalmente. Además, se debe tener



en cuenta que nuestro grupo de pacientes tuvo predominantemente un eFGR normal, por lo que podría ser posible que en aquellos pacientes con un mayor grado de disfunción renal, el aclaramiento a través del riñón influyese más sobre la concentración de BNP en orina.

Por otro lado, es conocida la influencia de la edad, género y obesidad sobre los niveles séricos de BNP y NT-proBNP en pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca o sujetos sanos (Redfield *et al.*, 2002, Mehra *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). En este estudio ninguna de esas variables estuvieron correlacionadas significativamente con la concentración de BNP en orina, sólo los niveles del péptido en suero, la fracción de eyección, la velocidad de propagación mitral y los índices de los volúmenes telesistólico y telediastólico del ventrículo izquierdo fueron factores predictivos, como hemos visto anteriormente. En consecuencia, no haría falta considerar rangos de edad o género, dado que estas variables no son factores que influyan sobre nuestros niveles urinarios de BNP, dando mayor rango diagnóstico al uso de la concentración de BNP en orina para sujetos con FE $\leq 40\%$, que al valor sérico. Resultados similares hemos obtenido en apartados anteriores de esta tesis donde estudiamos la influencia de estas variables sobre los niveles de NT-proBNP en orina. Además, la medicación administrada podría influir sobre los niveles de BNP en orina, sin embargo, los distintos tratamientos empleados (diuréticos, bloqueadores beta, IECAS, ARA II) tampoco fueron factores predictivos.

Diversos trabajos han mostrado el poder diagnóstico y pronóstico de los niveles séricos de BNP en la insuficiencia cardíaca y disfunción ventricular izquierda (DVI) (McDonagh *et al.*, 1998, Maisel *et al.*, 2001, Maisel *et al.*, 2002). Hemos mostrado anteriormente que los niveles en orina son efectivos en el diagnóstico y pronóstico de insuficiencia cardíaca, pero todavía no se ha analizado el papel de la concentración de BNP para la detección de DVI. En este estudio, los niveles urinarios de este péptido natriurético son un marcador diagnóstico importante para una FE $\leq 40\%$, mostrando una buena área bajo la curva (ABC) para un punto de corte de 2,30 pg/mL, con un alto valor predictivo positivo (92%). La curva "Receiver Operating Characteristic" (ROC) para los niveles de BNP en suero es ligeramente inferior, quizás debido a que siempre existe cierta cantidad de BNP en la sangre, mientras que para ser



detectado en orina se necesita que los niveles séricos sean elevados, como ocurre en la insuficiencia cardiaca (de ahí su alta especificidad). Nuestras curvas ROC podrían depender de la gravedad funcional de los pacientes, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las clases funcionales (NYHA) obtenidas en nuestros dos grupos de pacientes (por encima o por debajo de una FE de 40%).

Resultados previos de nuestro trabajo junto con los de otros autores muestran que los niveles en orina de NT-proBNP son un fuerte factor excluyente de IC o DVI, con un mayor valor predictivo negativo que el encontrado en nuestro análisis (Ng *et al.*, 2004, Ng *et al.*, 2005); pero se debe tener en cuenta que el poder diagnóstico de BNP está relacionado con la prevalencia de la DVI. En estudios con una baja prevalencia de DVI, los niveles de BNP tuvieron un buen valor predictivo negativo (“exclusión”) (McDonagh *et al.*, 1998, Vasan *et al.*, 2002, Ng *et al.*, 2004, Ng *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando la prevalencia de la DVI aumenta, el valor predictivo positivo (“detección”) mejora a expensas de empeorar el valor predictivo negativo (Maisel *et al.*, 2001, 2002). Nuestro grupo de pacientes tuvo una prevalencia de la enfermedad de 66% comparada con un valor menor de 10% en otros trabajos, esto explicaría que el valor predictivo positivo de BNP en orina para la detección de FE \leq 40% fuese elevado.

Por último, la concentración de BNP en orina tiene valor para predecir una FE \leq 40%, en un análisis de regresión binaria logística. Este hecho da una gran importancia al papel de este péptido natriurético en el diagnóstico y predicción de la disfunción ventricular izquierda.

Estos hallazgos apoyan el uso de la determinación de BNP en orina, muestra más sencilla de obtener, en estudios con amplio número de pacientes, en la unidad de urgencias, en atención primaria o en pacientes que no pueden desplazarse al hospital. También serían necesarios estudios sobre el coste-efectividad de esta determinación urinaria de BNP y conocer la influencia de la terapia aplicada sobre los niveles de este péptido en esta patología.



7. IMPACTO DE LA FUNCIÓN RENAL SOBRE EL VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE INSUFICIENCIA CARDIACA DE BNP Y NT-proBNP EN ORINA

En este apartado de la tesis doctoral hemos investigado, en primer lugar la asociación entre la función renal, como filtrado glomerular renal (eFGR) y la concentración urinaria de BNP y NT-proBNP en un grupo de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca (IC). La disfunción renal estuvo definida como un eFGR < 60 mL/min basándonos en los criterios establecidos por la *National Kidney Foundation* (2008). Después, analizamos la influencia de la disfunción renal sobre el papel diagnóstico de IC y pronóstico de eventos cardiacos de ambos péptidos natriuréticos en orina a los 12 meses.

Nuestros resultados determinan primero, una relación exponencial inversa entre la cantidad sérica de NT-proBNP o BNP filtrada y su porcentaje en orina en pacientes con IC. Se obtuvieron unos coeficientes de correlación similares para BNP y NT-proBNP en los grupos de pacientes con eFGR < 0 \geq de 60 mL/min. Segundo, la precisión de los péptidos para el diagnóstico de IC fue similar en ambas categorías de función renal, aunque los niveles de NT-proBNP tuvieron un papel diagnóstico superior a los de BNP. Tercero, ambos marcadores fueron predictores de eventos cardiacos a los 12 meses, en pacientes con IC independientemente del eFGR.

Trabajos anteriores han establecido que los niveles séricos de BNP y NT-proBNP dependen de la función renal, a causa del metabolismo y excreción de estos péptidos; porque sus concentraciones medias aumentan progresivamente con la disfunción renal, y existe una correlación inversa con eFGR. Estos hechos se han observado en pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias con disnea (McCullough et al., 2003, Anwaruddin *et al.*, 2006, Defilippi *et al.*, 2007), y en pacientes con IC crónica o congestiva (Tsutamoto *et al.*, 2006, Van Kimmenade *et al.*, 2006, Lamb *et al.*, 2006). En nuestro análisis, la determinación de las concentraciones de péptidos natriuréticos en orina en pacientes con IC no mostró diferencias significativas en los niveles de NT-proBNP o BNP según el eFGR.



Estos resultados podrían ser debidos a que la molécula de NT-proBNP es más dependiente de la función renal que la de BNP, puesto que los mecanismos de eliminación de estos péptidos son diferentes, BNP es eliminado principalmente por las endopeptidasas neutras y receptores específicos. Estas diferencias sugieren que alteraciones en la función renal podrían influir en mayor grado sobre los niveles de NT-proBNP que sobre los de BNP. Sin embargo, datos recientes han mostrado que la excreción renal de BNP y NT-proBNP es comparable en el riñón de sujetos sanos y pacientes con hipertensión (Schou *et al.*, 2005, Tsutamoto *et al.* 2006, Goetze *et al.* 2006).

Los resultados de esta tesis muestran una correlación inversa entre la cantidad sérica de NT-proBNP o BNP filtrada y el porcentaje de estos péptidos en orina, es decir, a pesar de la alta cantidad filtrada de ambos péptidos su concentración en orina es baja. Este hecho indica que el metabolismo tubular en el riñón juega un papel importante en la excreción de NT-proBNP o BNP más que el filtrado glomerular solo. El mecanismo específico todavía es desconocido, pero podrían estar implicados cambios en la reabsorción tubular y procesos de proteólisis locales (Palmer *et al.*, 2009). Linssen y colaboradores (2009) han mostrado recientemente un análisis de la excreción de NT-proBNP en IC; nosotros hemos analizado este aspecto también para el BNP, comparándolo con NT-proBNP. Después, además hemos investigado la influencia de la función renal, como eFGR, en el papel clínico de NT-proBNP y BNP en la IC.

Al investigar el valor diagnóstico de los niveles urinarios de BNP y NT-proBNP para IC, obtuvimos que el eFGR no influyó sobre el poder diagnóstico de ambos péptidos, ya que las curvas ROC y los puntos de corte óptimos fueron similares entre ambas categorías de función renal. Además, las áreas bajo la curva para NT-proBNP fueron mejores que las de BNP en el diagnóstico de este síndrome tanto en pacientes con bajo o alto eFGR. Este hallazgo es consistente con nuestros resultados previos (apartados 5 y 6) donde los niveles de NT-proBNP en orina tuvieron mayor poder diagnóstico que los niveles urinarios de BNP. Este hecho está en contraste con lo publicado recientemente por el grupo de Michielsen (2008), donde se muestra un pobre poder diagnóstico para la concentración de NT-proBNP en orina, pero este



trabajo se realizó en un grupo de pacientes con clase funcional avanzada (NYHA III – IV) y disfunción renal severa.

Las concentraciones de BNP y NT-proBNP en orina muestran un papel predictivo en la IC independientemente de la función renal. Ambos *biomarcadores* tuvieron áreas bajo la curva significativas para predecir eventos cardiacos (ingreso o mortalidad) según el eFGR fuese $<$ o \geq de 60 mL/min. Además, obtuvimos que los pacientes con los niveles más altos de BNP y NT-proBNP en orina tuvieron mayor riesgo de sufrir eventos cardiacos, independientemente del valor de su eFGR.

Por último, cuando se realizó una regresión de Cox para predecir los eventos cardiacos ajustando por edad, género, hipertensión, diabetes y obesidad, ambos péptidos natriuréticos fueron predictores independientes tanto en pacientes con mejor o peor función renal. Además, la concentración de NT-proBNP tuvo un mayor *hazard ratio* que la de BNP. Este resultado, desde un punto de vista patofisiológico, podría ser debido a que los niveles de la molécula de NT-proBNP tienen una vida media mayor que los de BNP pudiendo estar más amplificados por la variedad de patologías cardiovasculares que se dan en este síndrome, aumentando así su poder pronóstico.

En resumen, el papel diagnóstico y predictivo de los niveles de BNP y NT-proBNP en orina parece no estar influenciado por la función renal en este grupo de pacientes diagnosticados con IC. Se necesitan estudios futuros que establezcan los mecanismos implicados en la excreción de los péptidos natriuréticos en orina.

8. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE NT-proBNP EN SUERO Y ORINA EN PACIENTES ESTABLES CON INSUFICIENCIA CARDIACA, EN UN SEGUIMIENTO A DOS AÑOS

La concentración de NT-proBNP en suero y orina es un marcador útil de la disfunción ventricular izquierda, tiene valor diagnóstico y pronóstico de la



insuficiencia cardiaca (IC), y puede ser utilizado como guía a la respuesta de diversos tratamientos en este síndrome (Steele *et al.*, 1997, Mudambo *et al.*, 1997, Talwar *et al.*, 1999, Swedberg *et al.*, 2005, Ng *et al.*, 2004), en base a su alto valor predictivo negativo. Estudios previos han evaluado la variación biológica de los niveles en suero de NT-proBNP y BNP tanto en sujetos sanos como en pacientes con IC a lo largo de un intervalo corto de tiempo (variabilidad dentro de un mismo día y de semana a semana) (Melzi d'Eril *et al.*, 2003, Bruins *et al.*, 2004). Recientemente, Bruins y colaboradores (2004) han encontrado una mayor variabilidad en los niveles plasmáticos de BNP que de NT-proBNP, debido a su patrón de liberación pulsátil y su rápido recambio metabólico en pacientes con IC (Clerico & Emdin 2004).

En este trabajo, se ha investigado simultáneamente la variación biológica de la concentración de NT-proBNP en suero y orina en un seguimiento a 24 meses de pacientes estables diagnosticados de IC, los cuales estaban recibiendo tratamiento farmacológico estándar. La posible influencia derivada de la ingesta de fluidos, del ejercicio y del ciclo circadiano (Guo & Stein 2003, Heringlake *et al.*, 2004, Richards & Troughton 2004, Ng *et al.*, 2005) ha sido minimizada con la utilización de la primera orina de la mañana y con la obtención de las muestras sanguíneas en el mismo intervalo de tiempo (08:00 – 10:00). Además, creemos que los datos obtenidos de nuestros pacientes bajo tratamiento son más útiles clínicamente para evaluar la variación de las muestras séricas y urinarias de NT-proBNP que los obtenidos de pacientes asintomáticos no tratados médicamente.

En nuestro grupo de pacientes diagnosticados de IC, clínica y funcionalmente estables, no hubo eventos clínicos ni diferencias estadísticamente significativas en la clase funcional o función ventricular. Aunque se observó una pequeña variación en la fracción de eyección (FE) entre la fase basal y la fase I (a los 12 meses) o fase II (a los 24 meses), la cual podría ser atribuida a la metodología empleada para su cálculo (Sievers *et al.*, 2005). En cuanto a los niveles de NT-proBNP en suero y orina, los resultados obtenidos indican que ambos tipos de muestras se mantienen estables a lo largo del seguimiento. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas para la determinación de NT-proBNP en orina entre la fase I y la fase II comparadas con la fase basal, mientras que la concentración sérica se mantuvo



sin cambios significativos. Como consecuencia, el cociente entre los niveles del péptido natriurético en suero y orina también mostró cambios significativos en la fase II respecto a la fase basal.

Otro aspecto a considerar sobre la estabilidad del péptido natriurético es que los niveles de NT-proBNP en suero y orina estaban altamente correlacionados entre sí en las tres fases (basal, 12 meses y 24 meses). Como hemos visto en los apartados anteriores de esta tesis (5 y 6), los niveles de NT-proBNP en orina son un reflejo de los niveles séricos, y este hallazgo se ve confirmado en las tres fases analizadas. Además, se ha obtenido una buena correlación a lo largo de todo este estudio para las diferentes medidas en suero y para las medidas del *biomarcador* en orina, obteniendo los coeficientes de correlación ligeramente más altos para los niveles en suero. Estos hallazgos ponen de manifiesto la alta estabilidad encontrada tanto para las muestras de NT-proBNP en suero como en orina.

Por otro lado, trabajos anteriores han mostrado que la variación biológica estimada (dentro del mismo día o de semana en semana) para los péptidos natriuréticos es aproximadamente del 30% (Melzi d'Eril *et al.*, 2003, Wu & Smith 2004). Sin embargo, el porcentaje de cambio que muestran los gráficos Bland-Altman en nuestro grupo de pacientes con IC (a los que se tomaron las muestras en una franja horaria específica) a lo largo de todo el estudio (24 meses) no alcanzó un valor de desviación estándar mayor de 13% para las muestras séricas y de 5% para las urinarias. Sólo un grupo reducido de pacientes mostraron un porcentaje de cambio superior a estos valores en las diferentes fases de tiempo, tanto en suero como en orina. Esta diferencia en los resultados podría deberse a que los niveles de NT-proBNP están estrechamente relacionados con mecanismos patofisiológicos específicos y estas variaciones reflejarían cambios sutiles en la activación de los sistemas neurohormonal e inmunológico, ya que no hubo cambios en los parámetros hemodinámicos o de función ventricular. Además, el método de determinación de NT-proBNP mediante inmunoensayo muestra una ligera variabilidad que debe ser tomada en cuenta en el análisis de nuestros resultados (Clerico & Emdin 2004, Clerico *et al.*, 2005).



Una consecuencia práctica importante de este estudio es el establecimiento de un porcentaje de cambio para NT-proBNP, a partir del cual se puede monitorizar el progreso de estos pacientes. Así, sugerimos que todas las medidas de la variación de NT-proBNP, con un índice de reproducibilidad por encima del 22% en las muestras plasmáticas y del 7% para las urinarias, podrían ser consideradas que tienen valor clínico, en un seguimiento a 12 meses; tanto las muestras de NT-proBNP en suero como en orina mostraron un mayor índice de reproducibilidad en un seguimiento a 24 meses, del 25% y del 9%, respectivamente. Aumentos mayores a estos deben ser evaluados por los clínicos, porque el sistema de péptidos natriuréticos tiene una estrecha asociación con la actividad de la red neuroendocrina y esta variabilidad podría indicar la presencia de cambios de importancia clínica.

9. NIVELES TISULARES DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN CORAZONES HUMANOS CON INSUFICIENCIA CARDIACA

Este trabajo muestra nuevos aspectos en la expresión de los péptidos natriuréticos (PN) en corazones humanos con insuficiencia cardiaca (IC). Primero, se ha determinado la expresión de proBNP, BNP y NT-proBNP mediante técnicas western-blot, y se ha concluido que la molécula de proBNP está 1,5 y 15,4 veces más expresada que BNP y NT-proBNP en nuestros corazones. Además, la expresión de ARNm de proBNP estuvo aumentada 4 veces en corazones patológicos respecto al grupo control. Segundo, los niveles tisulares de proBNP tienen un alto grado de correlación tanto con BNP como con NT-proBNP. Tercero, se ha encontrado que los PN están aumentados en corazones patológicos comparados con el grupo control (CNT), y que los valores más elevados de PN se encontraron en los corazones con miocardiopatía isquémica (MCI).

Numerosos estudios han establecido que los niveles de BNP y NT-proBNP en plasma son herramientas útiles en el diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardiaca aguda o crónica (*Koglin et al.*, 2001, *Lainchbury et al.*, 2003,



Maisel *et al.*, 2004, van Kimmenade *et al.*, 2006). Sin embargo, diversos trabajos sugieren que los ensayos de BNP y NT-proBNP podrían estar influenciados por formas alternativas en plasma que se derivan de la molécula de proBNP (Apple *et al.*, 2005, Liang *et al.*, 2007, Luckenbill *et al.*, 2008). Entre ellas la forma intacta de proBNP, con valor diagnóstico y pronóstico tanto en sujetos sanos como en pacientes diagnosticados de IC (Lam *et al.*, 2007, Waldo *et al.*, 2008, Hammerer –Lercher *et al.*, 2008). En este análisis, nuestros datos también demuestran la presencia de estas tres formas de PN en el tejido de corazones humanos diagnosticados de IC, y una mayor expresión de proBNP comparándola con BNP y NT-proBNP. Además, este aumento en el nivel proteico de péptidos natriuréticos también ocurre a nivel transcripcional, con una mayor expresión de ARNm de proBNP en pacientes con miocardiopatía isquémica y dilatada comparados con los corazones control.

La síntesis y secreción de PN en los cardiomiocitos actualmente se encuentra en debate. En concreto dónde y cuándo la molécula de proBNP es escindida, ya que se han encontrado pequeñas cantidades de la molécula intacta en suero, y las dos formas derivadas (BNP y NT-proBNP) se han determinado en extractos celulares (Hunt *et al.*, 1997). Se cree que proBNP es escindido por una serina endoproteasa llamada corina que está localizada en la membrana celular (con un dominio transmembrana), dando lugar a la formación de la molécula bioactiva BNP y la no activa NT-proBNP (Hooper *et al.*, 2000). Este hecho sugiere que proBNP es escindido principalmente dentro o en la superficie de la membrana celular antes de su liberación en plasma. Este mecanismo podría explicar nuestros resultados, como la identificación de las tres formas moleculares y una mayor expresión de proBNP comparados con BNP y NT-proBNP a nivel del cardiomiocito.

Anteriores estudios han establecido la correlación entre las tres formas de péptidos natriuréticos en suero en sujetos sanos y pacientes con IC (Lam *et al.*, 2007, Waldo *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que los niveles tisulares de proBNP están altamente asociados con los niveles de BNP y NT-proBNP, siendo el coeficiente de correlación más elevado para BNP que para NT-proBNP, tanto en el conjunto de todas las muestras como en cada miocardiopatía por separado. Este hallazgo podría ser debido a una liberación más rápida dentro de la circulación sanguínea de la forma inactiva NT-proBNP



que de BNP, y también porque cierta cantidad de BNP podría acoplarse a los receptores específicos de membrana de la célula cardiaca (Pandey KN 2005), siendo detectados en nuestro análisis y manteniendo una mayor asociación con la expresión de proBNP. Este hecho podría explicar una mayor señal de expresión de BNP comparado con NT-proBNP en el tejido de corazones diagnosticados con IC. Además, los coeficientes de correlación más elevados entre los péptidos natriuréticos se encontraron en el grupo control, a pesar de un menor número de sujetos, quizás porque estas muestras no estaban influenciadas por una activación de los sistemas neurohormonales e inmunológicos como ocurre en la MCI y la MCD. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre los niveles proteicos de péptidos natriuréticos y la expresión de ARNm de proBNP en nuestros pacientes.

La regulación transcripcional y traduccional son un conjunto de procesos que regulan como un gen determinado da lugar a una proteína. Numerosos factores influyen sobre la expresión proteica como el ARN “*splicing*”, la degradación de ARN, las modificaciones post-traduccionales, la localización y degradación proteica, entre otros. Está descrito ampliamente en la literatura que determinar la relación directa entre los niveles de ARNm y expresión proteica es complicada, y diferentes estudios han dado lugar a diversos resultados. De hecho, la proteómica en levaduras ha mostrado que es insuficiente para predecir la expresión proteica a partir de los niveles de ARNm, excepto para aquellas proteínas más abundantes (Gygi *et al.*, 1999). Estos datos confirman que otros mecanismos están implicados en la regulación de la expresión de proBNP en la insuficiencia cardiaca tanto de origen isquémico como dilatado, por ejemplo la O-glicosilación que suprime la correcta escisión del gen de proBNP dentro de los cardiomiocitos (Mair 2009).

Por otro lado, cuando se analiza la influencia de diferentes factores de riesgo y parámetros de función ventricular sobre cada PN, se obtuvo que la expresión de proBNP está más asociada con estas variables (diabetes, clase funcional y DTD) que BNP (diabetes y clase funcional) y NT-proBNP (ninguna variable). Este hecho podría ser debido a que esta prohormona sería un mejor reflejo del estrés de pared al que está sometido el cardiomiocito en la IC que las otras formas de PN. Además, no encontramos diferencias significativas en la expresión de las tres formas de PN al comparar los



pacientes obesos y no obesos. Este hecho nos podría llevar a descartar una de las vías que explicaría la disminución de la concentración de BNP y NT-proBNP planteada en apartados anteriores de esta tesis doctoral: una menor síntesis de estas moléculas por el miocardio de pacientes obesos diagnosticados con insuficiencia cardiaca.

Finalmente, este trabajo de tesis muestra que corazones humanos con miocardiopatía isquémica tenían una expresión de PN mayor que los corazones con miocardiopatía dilatada y corazones control, mientras que los corazones dilatados no alcanzaron aumento significativo frente al grupo control. La diferencia en los niveles de PN según pacientes con MCI o MCD es opuesto a lo publicado anteriormente para las muestras plasmáticas (no hay diferencias según la etiología de la IC), aunque el grupo de Miller (2007) muestra que los niveles de BNP en suero son más elevados en la MCI que en la MCD. Este hallazgo podría estar relacionado con un mayor grado de daño miocárdico y una mayor complejidad de interacciones entre los sistemas inmunológico y neuroendocrino, que estimulan la síntesis y liberación de PN (Leskinen *et al.*, 1997, Ma *et al.*, 2004, Emdin *et al.*, 2004), en la miocardiopatía isquémica que en la dilatada. Además, los corazones dilatados mostraron un aumento significativo en la expresión de ARNm de proBNP, como ocurre en los corazones isquémicos, pero esto no se refleja a nivel proteico. Este hecho estaría asociado con un mayor número de mecanismos de regulación post-transcripcionales y post-traduccionales en los corazones con etiología dilatada que isquémica.

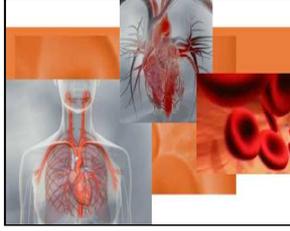
Además, las muestras de los corazones isquémicos fueron obtenidas de las regiones periinfarto (áreas de transición entre tejido isquémico y miocardio viable) donde la expresión de PN es mayor que en el resto de ventrículo izquierdo (Cameron *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando los PN se determinan en la sangre, se detecta y cuantifica el total de estas moléculas liberadas por el conjunto del corazón, compensando las diferencias observadas cuando los PN son determinados en un área específica del músculo cardíaco. El hecho de que no se encuentren diferencias significativas entre pacientes con MCD y sujetos control podría ser debido a un menor remodelado estructural en el área específica del miocardio de estos pacientes, asociado con una menor liberación de PN. Por ello, quizás sería necesario determinar la síntesis de estas moléculas



en todas las áreas del corazón para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre grupo CNT y pacientes con MCD.

Por otro lado, el “tiempo de enfermedad” (enfermedad desde el diagnóstico de insuficiencia cardiaca hasta el trasplante cardiaco) podría influir en una mayor síntesis de estas moléculas. Estudios de tipo fisiológico han mostrado que la mayor regulación de BNP se hace durante la expresión génica, con la mayoría de BNP sintetizado por “pulsos” de activación desde estímulos fisiológicos y aumentado de manera rápida sus niveles cuando la secreción ocurre (Yassue *et al.*, 1994, Nakagawa *et al.*, 1995). Como consecuencia un tiempo de desarrollo de la enfermedad breve podría ser considerado como un “estadio agudo” de este síndrome, dando lugar a una alta expresión de péptidos natriuréticos por los cardiomiocitos. Este hecho apoyaría nuestros resultados, donde corazones con MCI tuvieron un tiempo de enfermedad más corto que corazones con MCD los cuales tuvieron niveles de PN más bajos.

En resumen, los datos presentados demuestran una mayor expresión de proBNP que BNP o NT-proBNP en el tejido de corazones humanos diagnosticados con IC, y sugieren que la síntesis de péptidos natriuréticos estaría influenciada por la etiología de este síndrome.



VI. CONCLUSIONES

“... Secado el pulmón de una rana ... y con la ayuda de nuestra lente (de aumento) más perfecta, el ojo ha encontrado... vasos unidos juntos en modo de anillo. Y es tal el trayecto errante de estos vasos, que proceden de la vena de este lado y de la arteria en el otro lado, que los vasos no mantienen ya una dirección recta, sino que parecen formar una red de conexiones de los dos vasos. Está claro para los sentidos que la sangre fluye a lo largo de vasos tortuosos y no fluye dentro de los espacios, sino que siempre está contenida dentro de túbulos (capilares)”

*Descripción de la circulación capilar
“Duae epistolae de pulmonibus” (Dos cartas sobre los pulmones) (1661)
Marcello Malpighi (1628-1694)*



1. Los niveles séricos del fragmento amino-terminal del péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) se correlacionan con la velocidad máxima de relajación, siendo mejores los coeficientes de correlación en aquellos pacientes con fracción de eyección superior al 40%. Se confirma así, la relación entre los valores de NT-proBNP en suero con la función diastólica en pacientes con insuficiencia cardíaca.
2. Los niveles de NT-proBNP en suero muestran una buena correlación con las áreas del ventrículo izquierdo en telesístole y telediástole, y con la fracción de cambio del área del ventrículo izquierdo en la insuficiencia cardíaca; la correlación fue mayor en los pacientes de etiología dilatada. Este hecho muestra la asociación entre los cambios en tamaño y función del ventrículo izquierdo y los valores de NT-proBNP en la insuficiencia cardíaca.
3. Los valores séricos de NT-proBNP muestran una buena correlación con la concentración plasmática de *big* endotelina-1 (*big* ET-1) en un grupo de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca; estableciendo una relación entre ambos sistemas neurohormonales dentro de este síndrome.
4. Los pacientes obesos con insuficiencia cardíaca (miocardiopatía isquémica y dilatada) tienen menores niveles de NT-proBNP en suero (un descenso del 60%) al compararlos con los pacientes no obesos. El índice de masa corporal (IMC) debe ser tenido en cuenta al utilizar la concentración de NT-proBNP en plasma para el diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardíaca, estableciendo los puntos de corte, para esta molécula, más bajos para pacientes obesos.
5. La detección en orina de NT-proBNP y BNP representa un nuevo marcador para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca (puntos de corte: 74 pg/mL y 2,2 pg/mL, respectivamente), pronóstico de muerte y eventos cardiovasculares (puntos de corte: 93 pg/mL y 3,2 pg/mL, respectivamente), y para la caracterización del estado funcional de pacientes diagnosticados con este síndrome. Este hecho enfatiza la posibilidad de usar un test relativamente simple y no invasivo en la atención primaria o en ciertas condiciones donde la obtención de muestras sanguíneas pueda ser problemática.
6. Los niveles urinarios de péptido natriurético tipo B (BNP) están correlacionados con parámetros de función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo; y son efectivos, con un alto valor predictivo positivo (92%) en la detección de disfunción ventricular sistólica (punto de corte: 2,3 pg/mL).



7. El filtrado glomerular renal no sería el principal determinante de la concentración de NT-proBNP y BNP en orina; a pesar de la alta concentración de péptidos natriuréticos filtrados en el glomérulo, los niveles de NT-proBNP y BNP detectados en orina son bajos en la insuficiencia cardíaca. Además, un alto o bajo filtrado glomerular renal no influye sobre el papel clínico de NT-proBNP y BNP en la detección y pronóstico de eventos cardíacos en este síndrome.
8. Los niveles de NT-proBNP en suero y orina muestran una buena estabilidad durante un periodo de 24 meses en pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca. Variaciones que excedan en un 22% para la muestras séricas y un 7% para la urinarias en un seguimiento a 12 meses, y que excedan un 25% y 9%, respectivamente, para un seguimiento a 24 meses, podrían indicar cambios fisiopatológicos de interés clínico y diagnóstico. Las concentraciones de NT-proBNP en suero y orina podrían ser una herramienta útil para la monitorización de la evolución de estos pacientes.
9. En el tejido cardíaco de pacientes sometidos a trasplante existe un mayor nivel proteico de proBNP que de BNP y NT-proBNP, con una alta expresión del ARNm de proBNP. Los niveles de proBNP, BNP y NT-proBNP muestran, entre ellos, un buen grado de correlación a nivel tisular. Además, la expresión de estos péptidos está influenciada por la etiología de la insuficiencia cardíaca: los valores más elevados de péptidos natriuréticos se encontraron en los corazones con miocardiopatía isquémica.





VII. REFERENCIAS

“Su tamaño era tan extraordinario que se aproximaba mucho al de un corazón de buey... la cavidad de su ventrículo derecho y de su aurícula derecha era excesivamente grande... Examinando la extraordinaria dilatación de la vena pulmonar vi que, la embocadura del ventrículo izquierdo parecía muy pequeña y que era de figura oval oblonga; e investigando la causa de un hecho tan sorprendente descubrí que las válvulas “triglossinae” de este ventrículo estaban verdaderamente osificadas y comprendí que a medida que se habían endurecido se habían espesado y acortado bastante para poder estrechar mucho su embocadura”

Descripción de la estenosis mitral

*“Traité nouveau de la structure et des causes du mouvement naturel du coeur” (Tratado noveno de la estructura y de las causas del movimiento del corazón) (1715)
Raymond Vieussens (1637-1715)*

“Pero hay un desorden del pecho caracterizado por síntomas muy peculiares, importante por el tipo de peligro que conlleva y no excesivamente raro, que merece ser mencionado de forma más detenida. Su asiento, y la sensación de “strangling” (abogo o estrangulamiento) y de ansiedad con que se acompaña, hace que no sea impropio llamarle “angina pectoris”. Quienes la padecen, son afectados mientras caminan (especialmente si lo hacen cuesta arriba y tras la comida) de un dolor y una sensación desagradable en el pecho, como si fuesen a morir si aumentase o siguiese; pero que desaparece en el momento en que ellos se paran.

Si continúa un año o más, no cesará tan instantáneamente cuando ellos la detengan, y aparecerá no solo cuando estén caminando, sino incluso cuando estén acostados, especialmente si lo están del lado izquierdo”.

*Descripción de la angina de pecho (1768)
William Heberden (1710-1801)*



- A**la-Kopsala M, Magga J, Peuhkurinen K, Leipälä J, Ruskoaho H, Leppäluoto J, Vuolteenaho O. Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A- and B-type natriuretic peptides. *Clin Chem* 2004; 50:1576-88.
- Al-Mesimani BM, Fahoum SK, Shamia MG. NT-proBNP in monitoring treatment of patients with congestive heart failure. *Clin Lab* 2007; 53:35-9.
- Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP, Glazer RD, Tognoni G, Cohn JN, Val-HeFT Investigators. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003; 107:1278-83.
- Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 1997b; 349:1050-53. Erratum in *Lancet* 1997; 349:1258.
- Anker SD, Swan JW, Volterrani M, Chua TP, Clark AL, Poole-Wilson PA, Coats AJ. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997a; 18:259-69.
- Apple FS, Panteghini M, Ravkilde J, Mair J, Wu AH, Tate J, Pagani F, Christenson RH, Jaffe AS; Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC. Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays. *Clin Chem* 2005; 51:486-93.
- Anwaruddin S, Lloyd-Jones DM, Baggish A, Chen A, Krauser D, Tung R, Chae C, Januzzi JL Jr. Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement: results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:91-7.
- Azpilicueta J, García-Fernández MA. Doppler cardiaco: principios e instrumentación. In: García-Fernández MA editor. *Principios y práctica del Doppler cardiaco*. Madrid: Interamericana McGraw-Hill 1995. pag. 1-21.
- B**angdiwala SI, Weiner DH, Bourassa MG, Friesinger GC, Ghali JK, Yusuf S. Studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). Registry: rationale, design, methods and description of baseline characteristics. *Am J Cardiol* 1992; 70:347-53.



- Baran D, Horn EM, Hryniewicz K, Katz SD. Effects of beta-blockers on neurohormonal activation in patients with congestive heart failure. *Drugs* 2000; 60:997-1016.
- Bardaji A, Martínez-Vea A. Enfermedad renal crónica y corazón. Un continuo evolutivo. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61(Suppl 2):41-51.
- Bardaji A, Barrabés JA, Sanchis J, Sánchez PL. Ischemic heart disease: update. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61 (Suppl 1):37-47.
- Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides* 1996; 17:645-51.
- Bay M, Kirk V, Parker Y, Hassager C, Nielsen H, Krogsgaard K, Trawinski J, Boesgaard S, Aldershvile J. NT-proBNP: a new diagnostic screening tool to differentiate between patients with normal and reduced left ventricular systolic function. *Heart* 2003; 89:150-54.
- Bayés-Genís A, Lloyd-Jones DM, van Kimmenade RR, Lainchbury JG, Richards AM, Ordoñez-Llanos J, Santaló M, Pinto YM, Januzzi JL Jr. Effect of body mass index on diagnostic and prognostic usefulness of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with acute dyspnea. *Arch Intern Med* 2007; 167:400-7.
- Bayés-Genís A, Santaló-Bel M, Zapico-Muñiz E, López L, Cotes C, Bellido J, Leta R, Casan P, Ordoñez-Llanos J. N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the emergency diagnosis and in-hospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:301-8.
- Bentzen H, Peersen RS, Nyhad O, Pedersen EB. Effect of exercise on natriuretic peptides in plasma and urine in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2004; 93:121-30.
- Bettencourt P, Ferreira S, Azevedo A, Ferreira A. Preliminary data on the potential usefulness of B-type natriuretic peptide levels in predicting outcome after hospital discharge in patients with heart failure. *Am J Med* 2002; 113:215-9.
- Bettencourt P, Frioies F, Azevedo A, Dias P, Pimenta J, Rocha-Goncalves F, Ferreira A. Prognostic information provided by serial measurements of brain natriuretic peptide in heart failure. *Int J Cardiol* 2004; 93:45-8.
- Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 1995; 269:R245-R251.



- Bland JM, Altman DG. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307-10.
- Bloch KD, Scott JA, Zisfein JB, Fallan JT, Margolies MN, Seidman CE, Matsueda GR, Homcy CJ, Graham RM, Seidman JG. Biosynthesis and secretion of proatrial natriuretic factor by cultured rat cardiocytes. *Science* 1985; 230:1168-71.
- Bohm M, La Rosee K, Schwinger RH, Erdmann E. Evidence for reduction of norepinephrine uptake sites in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:146-53.
- Boix-Martínez R, Almazán-Isla J, Medrano-Albero MJ. Mortalidad por insuficiencia cardiaca en España 1997-1998. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:219-26.
- Bojö L, Wandt B, Ahlin NG. Reduced left ventricular relaxation velocity after acute myocardial infarction *Clin Physiol* 1998; 18:195-201.
- Bojö L, Wandt B, Haaga S. How should we assess diastolic function in hypertension? *Scand Cardiovasc J* 2000; 34:377-83.
- Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M, Coats AJ, Anker SD, Gatzoulis MA. Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2002; 106:92-9.
- Bongartz LG, Cramer MJ, Dans PA, Joles JA, Braam B. The severe cardiorenal syndrome: "Guyton revisited". *Eur Heart J* 2005; 26:11-7.
- Bounhoure JP, Massabuau P, Galinier M, Jordan C, Laurent JP, Marco J. Heart failure with preserved left ventricular function: clinical, echocardiographic, and clinical course features. Prognostic factors. *Bull Acad Natl Med* 2002, 186:1003-13.
- Brandenburg RO, Chazov E, Cherian G. Report of the WHO/ISFC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44:672-3.
- Brandt I, Lambeir AM, Ketelslegers JM, Vanderheyden M, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clin Chem* 2006; 52:82-7.
- Bruins S, Fokkema MR, Römer JWP, Dejongste MJL, Van der Dijs FPL, Van den Ouweland JMW, Muskiet FAJ. High intraindividual variation of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. *Clin Chem* 2004, 50:2052-58.



- Burrell LM, Lambert HJ, Baylis PH. Effect of atrial natriuretic peptide on thirst and arginine vasopressin release in humans. *Am J Physiol* 1991; 260:R475-R479.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; 34: 597-601.
- C**ameron V, Ellmers L. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* 2003; 144:2191-94.
- Carr SJ, Bavanandan S, Fentum B, Ng L. Prognostic potential of brain natriuretic peptide (BNP) in predialysis chronic kidney disease patients. *Clin Sci* 2005; 109:75-82.
- Casco VH, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Masters RG, Stevenson MM, de Bold AJ. Natriuretic peptides system gene expression in human coronary arteries. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:799-809.
- Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM, Yandle TG, Protter A, Kosoglou T. Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol* 1996; 271:R373-80.
- Charles CJ, Espiner EA, Richards AM. Cardiovascular actions of ANF: contributions of renal, neurohumoral, and hemodynamic factors in sheep. *Am J Physiol* 1993; 264:R533-38.
- Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *Am J Cardiol* 2005; 95:8B-13B.
- Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, Douglas PS, Faxon DP, Gillam LD, Kimball TR, Kussmaul WG, Pearlman AS, Philbrick JT, Rakowski H, Thys DM. ACC/AHA guidelines for the clinical application of echocardiography: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on Clinical Application of Echocardiography). Developed in collaboration with the American Society of Echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:862-79.
- Chen HH, Burnett JC Jr. The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:406-16.
- Chen YF, Durand J, Claycomb WC. Hypoxia stimulates atrial natriuretic peptide gene expression in cultured atrial cardiocytes. *Hypertension* 1997; 29:75-82.



- Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, Clopton P, Maisel A. A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:386-91.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, and the National High blood Pressure Education Program Coordinating Committee on prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA* 2003; 289:2560-71.
- Christoffersen C, Goetze JP, Barteis ED, Larsen MO, Ribel U, Rehfeld JF, Rolin B, Nielsen LB. Chamber-dependent expression of brain natriuretic peptide and its mRNA in normal and diabetic pig heart. *Hypertension* 2002; 40:54-60.
- Cleland JGF, Gemmes I, Khand A, Boddy A. Is the prognosis of heart failure improving? *Eur J Heart Fail* 1999; 1:229-41.
- Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of the cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem* 2004; 50:33-50.
- Clerico A, Prontera C, Emdin M, Passino C, Storti S, Poletti R, Zyw L, Zucchelli GC. Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of plasma B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP. *Clin Chem* 2005; 51:445-7.
- Clerico A, Zucchelli GC, Pio A, Passino C, Emdin M. Clinical relevance of biological variation: the lesson of brain natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP assay. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:366-78.
- Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16:31-41.
- Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M, et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325:303-10.
- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 311:819-23.
- Collinson PO, Barnes DC, Gaze DC, Galasko G, Lahiri A, Senior R. Analytical performance of the N terminal pro B type natriuretic peptide (NT-proBNP) assay on the Elecsys 1010 and 2010 analysers. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:365-8.



- Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD, Wagoner LE, Givertz MM, Liang CS, Neibaur M, Haught WH, LeJemtel TH. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343:246-53.
- Cortina A, Reguero J, Segovia E, Rodríguez Lambert JL, Cortina P, Arias JC, Vara J, Torre F. Prevalence of heart failure in Asturias (a region in the north of Spain). *Am J Cardiol* 2001; 87:1417-9.
- Courtois M, Ludbrook PA. Intraventricular pressure transients during relaxation and filling. In: Gaasch WH, LeWinter MM, editors. *Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Heart Failure*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1994. pag. 150–66.
- Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart Fail* 1997; 18:208-225.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backy PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417:822-28.
- Cuppoletti A, Roig E, Perez-Villa F, Marin JL, Orus J, Vallejos I, Rivera A, Botta C. Value of NT-proBNP determinations in the follow-up of heart transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37:4033-5.
- D**aniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:2357-68.
- Das SR, Drazner MH, Dries DL, Vega GL, Stanek HG, Abdullah SM, Canham RM, Chung AK, Leonard D, Wians FH Jr, de Lemos JA. Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides. Results from the Dallas Heart Study. *Circulation* 2005; 112:2163-68.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Verce AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 1981; 28:89-94.
- de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten A. The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79:705-14.



- de la Serna F. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca. En *Insuficiencia cardíaca crónica*. Editado por Federación Argentina de Cardiología 2004; pag: 1-9.
- De Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362:316-22.
- De Lemos JA, Morrow DA. Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application? *Circulation* 2002; 106:2868-70.
- DeFilippi CR, Fink JC, Nass CM, Chen H, Christenson R. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide for predicting coronary disease and left ventricular hypertrophy in asymptomatic CKD not requiring dialysis. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 35-44.
- deFilippi CR, Seliger SL, Maynard S, Christenson RH. Impact of renal disease on natriuretic peptide testing for diagnosing decompensated heart failure and predicting mortality. *Clin Chem* 2007; 53:1511-9.
- DeLong E, DeLong D, Clarke-Pearson D. comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44:837-45.
- Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Rappelli A. Role of the natriuretic peptide system in lipogenesis/lipolysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003; 13:244-9.
- Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Rappelli A. The natriuretic peptide system in obesity-related hypertension: new pathophysiological aspects. *J Nephrol* 1998; 11:296-299.
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57:450-8.
- Dieplinger B, Gegenhuber A, Haltmayer M, Mueller T. Evaluation of novel biomarkers for the diagnosis of acute destabilized heart failure in shortness-of-breath patients. *Heart*. 2009; 95:1508-13.
- Dillingham MA, Anderson RJ. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* 1986; 231:1572-3.
- Dorak M. RealTime PCR. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> (accessed March June 9, 2009)



- E**ckel RH. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1997; 96:3248-50.
- Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 1988; 62:191-5.
- Eicken A, Fratz S, Gutfried C, Balling G, Schwaiger M, Lange R, Busch R, Hess J, Stern H. Hearts late after fontan operation have normal mass, normal volume, and reduced systolic function: a magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1061-5.
- Elkayam U, Akhter MW, Singh H, Khan S, Usman A. Comparison of effects on left ventricular filling pressure of intravenous nesiritide and high-dose nitroglycerin in patients with decompensated heart failure. *Am J Cardiol* 2004; 93:237-40.
- Emdin M, Clerico A, Clemenza F, Galvani M, Latini R, Masson S, Mulè P, Panteghini M, Valle R, Zaninotto M, Ganau A, Mariotti R, Volpe M, Aspromonte N, Cacciatore G, Cappelletti P, L'Abbate A, Miglio F, Ottani F, Pagani F, Passino C, Plebani M, Sarzani R, Zucchelli G. Italian Association of Hospital Cardiologists; Italian Society of Cardiology; Italian Federation of Cardiology; Italian Society of clinical chemistry and Molecular Biology; Italian Society of Laboratory Medicine; Italian Society of Emergency Medicine. Recommendations for the clinical use of cardiac natriuretic peptides. *Ital Heart J* 2005; 6:430-46.
- Emdin M, Passino C, Prontera C, Iervasi A, Ripoli A, Masini S, Zucchelli GC, Clerico A. Cardiac natriuretic hormones, neuro-hormones, thyroid hormones and cytokines in normal subjects and patients with heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:627-36.
- F**eldman DS, Ikonomidis JS, Uber WE, Van Bakel AB, Pereira NL, Crumbley AJ 3rd, Tann SM. Human B-Natriuretic peptide improves haemodynamics and renal function in heart transplant patient immediately after surgery. *J Card Fail* 2004; 10:292-6.
- Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnomi A, Ceconi C, Curello S, Visioli O. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19:B2-B11.



- Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257:387-89.
- Fisher C, Berry C, Blue L, Morton JJ, McMurray J. N-terminal pro B type natriuretic peptide, but not the new putative cardiac hormone relaxin, predicts prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart* 2003; 89:879-81.
- Fonarrow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M. Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1943-50.
- Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:758-64.
- G**arcía MJ, Ares MA, Asher C, Rodriguez L, Vandervoort P, Thomas JD. An index of early left ventricular filling that combined with pulsed Doppler peak E velocity may estimate capillary wedge pressure. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:448-454.
- García MJ, Thomas JD, Klein AL. New Doppler echocardiographic applications for the study of diastolic function. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:865-75.
- Gardner RS, Chong KS, Morotn JJ, McDonagh TA. A change in N-terminal pro-brain natriuretic peptide is predictive of outcome in patients with advanced heart failure. *Eur J Heart Fail* 2007; 9:266-71.
- Gardner RS, Chong KS, Murday AJ, Morton JJ, McDonagh TA. N-terminal brain natriuretic peptide is predictive of death after cardiac transplantation. *Heart* 2006; 92:121-3.
- Gardner RS, Chong KS, O'Meara E, Jardine A, Ford I, McDonagh TA. Renal dysfunction, as measured by the modification of diet in renal disease equations, and outcome in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2007; 28:3027-33.
- Gardner RS, Özalp F, Murday AJ, Robb SD, McDonagh TA. N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2003; 24:1735-43.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1720-30.
- Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E. Clinical aspects of heart failure: High-output heart failure; pulmonary edema. In *Heart Disease*, Edited by



- Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Peter Libby. WB Saunders Co. Philadelphia, 2001.
- Goetze JP, Friis-Hansen L, Rehfeld JF, Nisson B, Svendsen JH. Atrial secretion of B-type natriuretic peptide. *Eur Heart J* 2006; 27:1648-50.
- Goetze JP, Jensen G, Moller S, Bendtsen F, Rehfeld JH, Henriksen JH. BNP and N-terminal proBNP are both extracted in the normal kidney. *Eur J Clin Invest* 2006; 36:8-15.
- Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem* 2004; 50:1503-10.
- Goy MF, Oliver PM, Purdy KE, Knowles JW, Fox JE, Mohler PJ, Oian X, Smithies O, Maeda N. Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *Biochem J* 2001; 358:379-87.
- Groenning BA, Raymond I, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Pedersen F. Diagnostic and prognostic evaluation of left ventricular systolic heart failure by plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations in a large sample of the general population. *Heart* 2004; 90:297-303.
- Groenning BA, Nilsson JC, Sondergaard L, Pedersen F, Trawinski J, Baumann M, Larsson HB, Hildebrandt PR. Detection of left ventricular enlargement and impaired systolic function with plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations. *Am Heart J* 2002; 143:923-9.
- Gu J, D'Andrea M, Seethapathy M. Atrial natriuretic peptide and its messenger ribonucleic acid in overloaded and overload-released ventricles of rat. *Endocrinology* 1989; 125:2066-74.
- Guindo J. Insuficiencia cardiaca. En *Apuntes de Cardiología*. Editores: López L, Guindo J. J & C Ediciones Médicas S. L. Barcelona, 2004. pag: 145-64.
- H**all C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:257-60.
- Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, Masuda I, Nakanishi K, Yoshimasa T, Hashimoto Y, Yamaguchi M, Hori R, Yassue H, Nakao K. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 92:1558-64.



- Hammerer-Lercher A, Halfinger B, Sarg B, Mair J, Puschendorf B, Griesmacher A, Guzman NA, Lindner HH. Analysis of circulating forms of proBNP and NT-proBNP in patients with severe heart failure. *Clin Chem* 2008; 54:858-65.
- Harada M, Saito Y, Kuwahara K, Ogawa E, Ishikawa M, Nakagawa O, Miyamoto Y, Kamitani S, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Masuda I, Itoh H, Nakao K. Interaction of myocytes and nonmyocytes is necessary for mechanical stretch to induce ANP/BNP production in cardiomyocyte culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31:S357-59.
- Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987; 326:697-8.
- Harrison A, Morrison LK, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Dao Q, Hlavin P, Maisel AS. B-type natriuretic peptide predicts future cardiac events in patients presenting to the emergency department with dyspnea. *Ann Emerg Med* 2002; 39:131-8.
- Hartmann F, Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Anker SD, Amann-Zalan I, Hoersch S, Katus HA. Prognostic impact of plasma N-terminal pro-BNP natriuretic peptide in severe chronic congestive heart failure. A substudy of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Trial. *Circulation* 2004; 110:1780-6.
- Hasegawa K, Fujiwara H, Doyama K, Mukoyama M, Nakao K, Fujiwara T, Imura H, Kawai C. Ventricular expression of atrial and brain natriuretic peptides in dilated cardiomyopathy. An immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens using specific monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1993; 142:107-16.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6:986-94.
- Henry JP, Pearce JW. The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. *J Physiol* 1956; 131:572-85.
- Henry WL, DeMaria A, Gramiak R, King DL, Kisslo JA, Popp RL, Sahn DJ, Schiller NB, Tajik A, Teichholz LE, Weyman AE. Report of the American Society of Echocardiography Committee on Nomenclature and Standards in Two-dimensional Echocardiography. *Circulation* 1980; 62:212-7.
- Heringlake M, Heide C, Bahlmann L, Eichler W, Pagel H, Schmucker P, Wergeland R, Armbruster FP, Klaus S. Effects of tilting and volume



loading on plasma levels and urinary excretion of relaxin, NT-proANP, and NT-proBNP in male volunteers. *J Appl Physiol* 2004; 97:173–9.

- Hervás I, Arnau MA, Almenar L, Pérez-Pastor JL, Chirivella M, Osca J, Bello P, Osa A, Martí JF, Vera F, Mateo A. Ventricular natriuretic peptide (BNP) in heart transplantation: BNP correlation with endomyocardial biopsy, laboratory and hemodynamic measures. *Lab Invest* 2004; 84:138-45.
- Hildebrandt P, Boesen M, Olsen M, Wachtell K, Groenning B. N-terminal pro-brain natriuretic peptide in arterial hypertension – a marker for left ventricular dimensions and prognosis. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:313-7.
- Hillege HL, Girbes AR, de Kam PJ, Boomsma F, de Zeeuw D, Charlesworth A, Hampton JR, van Veldhuisen DJ. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000; 102:203-10.
- Hirose S, Hagiwara H, Takei Y. Comparative molecular biology of natriuretic peptide receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 1-8.
- Ho KK, Anderson KM, Kannel W, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993a; 88:107-15.
- Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993b; 22:6-13.
- Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R, Ahluwalia A. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2004; 110:1231-35.
- Hooper JD, Scarman AL, Clarke BE, Normyle JF, Antalis TM. Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. *Eur J Biochem* 2000;267:6931-7.
- Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:789-795.
- Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Borenstein J. Anemia is associated with worse symptoms, greater impairment in functional capacity and a significant increase in mortality in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1780-86.



- Hunt PJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM, Yandle TG. Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3871-6.
- Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1428-35.
- Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol* 1997; 47:287-96.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. ACC/AHA 2005 Guidelines update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult. *Circulation* 2005; 20:154-215.
- Igaki T, Itoh H, Suga S, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, Mukoyama M, Sugawara A, Yoshimasa T, Tanaka I, Nakao K. C-type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans. *Kidney Int* 1996; 49:S144-S147.
- Ilercil A, O'Grady MJ, Roman MJ, Paranicas M, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Howard BV, Devereux RB. Reference values for echocardiographic measurements in urban and rural populations of differing ethnicity: the strong heart study. *J Am Soc Echocardiogr* 2001; 14:601-11.
- Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990; 86:1690-7.
- Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, Tung R, Cameron R, Nagurny JT, Chae CU, Lloyd-Jones DM, Brown DF, Foran-Melanson S, Sluss PM, Lee-Lewandrowski E, Lewandrowski KB. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol* 2005; 95:948-54.
- Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayés-Genís A, Ordonez-Llanos J, Santaloi-Bel M, Pinto YM, Richards M. NT-proBNP testing for diagnosis and short-prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* 2006; 27:330-7.



- Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro-brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:437-45.
- Jessup M, Brozena S. Heart Failure. *N Engl J Med* 2003; 348:2007-18.
- K**annel WB, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA, Feinleib M. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. *N Engl J Med* 1972; 287:781-7.
- Katz AM. Heart Failure. The hemodynamic defense reaction. In *Pathophysiology, Molecular Biology and Clinical Management*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000; pag: 109-152.
- Kinugawa T, Kato M, Ogino K, Osaki S, Igawa O, Hisatome I, Shigemasa C. Plasma endothelin-1 levels and clinical correlates in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2003; 9:318-24.
- Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. *Exp Med Surg* 1956; 14:99-112.
- Kishimoto I, Nakao K, Suga S, Hosoda K, Yoshimasa T, Itoh H, Imura H. Downregulation of C-receptor by natriuretic peptides via ANP-B receptor in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265:H1373-9.
- Kjaer A, Appel J, Hildebrandt P, Petersen CL. Basal and exercise-induced neuroendocrine activation in patients with heart failure and in normal subjects. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:29-39.
- Klein AL, Burstow DJ, Tajik AJ, Zachariah PK, Bailey KR, Seward JB. Effects of age on left ventricular dimensions and filling dynamics in 117 normal persons. *Mayo Clin Proc* 1994; 69:212-24.
- Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagan JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, Maeda N. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 2001; 107:975-84
- Koglin J, Pehlivanli S, Schwaiblmair M, Vogeser M, Cremer P, vonScheidt W. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1934-41.
- Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Murakawa K, Yasumari K, Kurihara N, Takeda T. Atrial and brain natriuretic peptide: secretion during exercise in patients with essential hypertension and modulation by acute



- angiotensin-converting enzyme inhibition. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19:193-200.
- Kohno M, Yasumari K, Yokokawa K, Murakawa K, Horio T, Takeda T. Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991; 87:1999-2000.
- Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86:1081-8.
- Kollias TJ. Diastolic dysfunction and heart failure: *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:79.
- Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 2001; 51:429-41.
- Krauser DG, Lloyd-Jones DM, Chae CU, Cameron R, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen A, Tung R, Januzzi JL Jr. Effect of body mass index on natriuretic peptide levels in patients with acute congestive heart failure: a proBNP Investigation of Dyspnoea in the Emergency Department (PRIDE) substudy. *Am Heart J* 2005; 149:744-50.
- Lainchbury JG, Campbell E, Frampton CM, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM. Brain natriuretic peptide and N-terminal brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure in patients with acute shortness of breath. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:728-35.
- Lam CS, Burnett JC Jr, Costello-Boerrigter L, Rodeheffer RJ, Redfield MM. Alternate circulating pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide forms in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1193-202.
- Lamb EJ, Vickery S, Price CP. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide to diagnose congestive heart failure in patients with impaired kidney function. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1060-1.
- Lang CC, Choy AM, Turner K, Tobin R, Coutie W, Struthers AD. The effect of intravenous saline loading on plasma levels of brain natriuretic peptide in man. *J Hypertens* 1993; 11:737-41.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MJ, Stewart WJ. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the



Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440-1463.

- Langenickel T, Pagel I, Hohmel K, Dietz R, Willenbrock R. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1500-6.
- Langub MC Jr, Dolgas CM, Watson RE Jr, Herman JP. The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1995; 7:305-9.
- Latini R, Masson S, Anand I, Judd D, Maggioni AP, Chiang YT, Bevilacqua M, Salio M, Cardano P, Dunselman PH, Holwerda NJ, Tognoni G, Cohn JN; Valsartan Heart Failure Trial Investigators. Effects of valsartan on circulating brain natriuretic peptide and norepinephrine in symptomatic chronic heart failure: the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2002; 106:2454-8.
- Lavie CJ, Milani RV. Obesity and cardiovascular disease: the Hippocrates paradox? *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:677-79.
- Leskinen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Combined inhibition of endothelin and angiotensin II receptors blocks volume load-induced cardiac hormone release. *Circ Res* 1997; 80:114-23.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130:461-70.
- Levin ER, Frank HJ. Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am J Physiol* 1991; 261:R453-7.
- Levin ER, Gardner DG, Samson W. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339:321-28.
- Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333:356-62.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323:236-41.



- Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MK, Ho KK, Murabito JM, Vasani RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347:1397-402.
- Liang F, O'Rear J, Schellenberger U, Tai L, Lasecki M, Schreiner GF, Apple FS, Maisel AS, Pollitt NS, Protter AA. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1071-8.
- Light DB, Schwiebert EM, Karlson KH, Stanton BA. Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells. *Science* 1989; 243:383-5.
- Linssen GC, Damman K, Hillege HL, Navis G, van Veldhuisen DJ, Voors AA. Urinary N-terminal prohormone brain natriuretic peptide excretion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2009; 120:35-41.
- López-Farré A, Casado S. Heart failure, redox alterations and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 38:1400-5.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AR, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
- Lubien E, De Maria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Gardetto N, Wanner E, Maisel AS. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002; 105:595-601.
- Luckenbill KN, Christenson RH, Jaffe AS, Mair J, Ordonez-Llanos J, Pagani F, Tate J, Wu AH, Ler R, Apple FS. Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem* 2008; 54:619-21.
- Ma** KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:505-13.
- Maekawa K, Sudoh T, Furusawa M, Minamino N, Kangawa K, Ohkubo H, Nakanishi S, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157:410-6.



- Mair J, Friedl W, Thomas S, Puschendorf B. Natriuretic peptides in assessment of left-ventricular dysfunction. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:132-42.
- Mair J. Clinical significance of pro-b-type natriuretic peptide glycosylation and processing. *Clin Chem* 2009; 3:394-7.
- Maisel A, Hollander JE, Guss D, McCullough P, Nowak R, Green G, Saltzberg M, Ellison SR, Bhalla MA, Bhalla V, Clopton P, Jesse R. Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial investigators. Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT). A multicenter study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1328-33.
- Maisel AS, Koon J, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Gardetto N, Morrissey R, Garcia A, Chiu A, De Maria A. Utility of B-natriuretic peptide as a rapid, point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 2001; 141:367-74.
- Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AHB, Clopton P, Steg PG, Weistheim A, Wold Knudsen C, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA for the Breathing not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347:161-7.
- Mantymaa P, Vuolteenaho O, Marttila M, Ruskoaho H. Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro. *Endocrinology* 1993; 133:1470-3.
- Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986; 324:473-6.
- Martínez-Dolz L, Almenar L, Moro J, Agüero J, Hervás I, Rueda J, Rivera M, Arnau MA, Mateo A, Salvador A. Prognostic value of brain natriuretic peptide in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26:986-91.
- Martínez-Dolz L, Almenar L, Hervás I, Moro J, Agüero J, Sánchez-Lázaro I, Mateo A, Salvador A. Prognostic relationship between two serial determinations of B-type natriuretic peptide and medium-long-term events in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:735-40.



- Martinez-Rumayor A, Richards AM, Burnett JC, Januzzi JL Jr. Biology of the natriuretic peptide. *Am J Cardiol* 2008; 101:3A-8A.
- Marumoto K, Hamada M, Hiwada K. Increased secretion of atrial and brain natriuretic peptides during acute myocardial ischaemia induced by dynamic exercise in patients with angina pectoris. *Clin Sci (Lond)* 1995; 88:551-6.
- Massie BM, Shah NB. The heart failure epidemic: magnitude of the problem and potential mitigating approaches. *Curr Opinion Cardiol* 1996; 11:221-6.
- Masson S, Latini R, Anand IS, Barlera S, Judd D, Salio M, Perticone F, Perini G, Tognoni G, Cohn JN; Val-HeFT investigators. The prognostic value of big endothelin-1 in more than 2,300 patients with heart failure enrolled in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *J Card Fail* 2006a; 12:375-80.
- Masson S, Latini R, Anand IS, Vago T, Angelici L, Barlera S, Missov ED, Clerico A, Tognoni G, Cohn JN; Val-HeFT Investigators. Direct comparison of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in a large population of patients with chronic and symptomatic heart failure: the Valsartan Heart Failure (Val-HeFT) data. *Clin Chem* 2006b; 52:1528-38.
- Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:7403-8.
- McCullough PA, Duc P, Omland T, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Storrow AB, Abraham WT, Lamba S, Wu AH, Perez A, Clopton P, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Maisel AS, from Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:571-9.
- McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, Luchner A, Hildebrandt P, Dargie HJ. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:269-73.
- McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison C, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, Dargie HJ. Biochemical detection of left ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998; 351:9-13



- McMurray J, Swedberg K, Hogg K. Heart failure with preserved left ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:317-27.
- Mehra MR, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Harris BC, Frohlich ED. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1590-5.
- Mehra MR, Uber PA, Potluri S, Ventura HO, Scott RL, Park MH. Usefulness of an elevated B-type natriuretic peptide to predict allograft failure, cardiac allograft vasculopathy, and survival after heart transplantation. *Am J Cardiol* 2004; 94:454-9.
- Melzi d'Eril GV, Tagnochetti T, Nauti A, Klersy C, Papalia A, Vadacca G, Moratti R, Merlini G. Biological variation of n-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy individuals. *Clin Chem* 2003; 49:1554-55.
- Michielsen EC, Bakker JA, Kimmenade RR, Pinto YM, Dieijen-Visser MP. The diagnostic value of serum and urinary NT-proBNP for heart failure. *Ann Clin Biochem* 2008; 45:389-94.
- Mistry SK, Hawksworth GM, Struthers AD, McLay JS. Differential expression and synthesis of natriuretic peptides determines natriuretic peptide receptor expression in primary cultures of human proximal tubular cells. *J Hypertens* 2001; 19:255-62.
- Moe GW, Howlett J, Januzzi JL, Zowall H, Canadian Multicenter Improved Management of Patients With Congestive Heart Failure (IMPROV-CHF) Study Investigators. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing improves the management of patients with suspected acute heart failure: primary results of the Canadian prospective randomized multicenter IMPROVE-CHF study. *Circulation* 2007; 115:31103-10.
- Moertl D, Berger R, Struck J, Gleiss A, Hammer A, Morgenthaler NG, Bergmann A, Huelsmann M, Pacher R. Comparison of midregional pro-atrial and B-type natriuretic peptides in chronic heart failure: influencing factors, detection of left ventricular systolic dysfunction, and prediction of death. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1783-90.
- Morrow DA, de Lemos JA, Blazing MA, Sabatine MS, Murphy SA, Jarolim P, White HD, Fox KA, Califf RM, Braunwald E; A to Z Investigators. Prognostic value of serial B-type natriuretic peptide testing during follow-up of patients with unstable coronary artery disease. *JAMA* 2005; 294:2886-71.
- Mueller C, Laule-Kilian K, Frana B, Rodriguez D, Scholer A, Schindler C, Perruchoud AP. Use of B-type natriuretic peptide in the management



- of acute dyspnea in patients with pulmonary disease. *Am Heart J* 2006a; 151:471-7.
- Mueller C, Laule-Kilian K, Frana B, Rodriguez D, Scholer A, Schindler C, Perruchoud AP. Use of B-type natriuretic peptide in the management of acute dyspnea in patients with pulmonary disease. *Am Heart J* 2006a; 151:471-7.
- Mueller C, Laule-Kilian K, Schindler C, Klima T, Frana B, Rodriguez D, Scholer A, Christ M, Perruchoud AP. Cost-effectiveness of B-type natriuretic peptide testing in patients with acute dyspnea. *Arch Intern Med* 2006b; 166:1081-7.
- Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasure H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide as novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991; 87:1402-12.
- Murdoch DR, McDonagh TA, Byrne J, Blue L, Farmer R, Morton JJ, Dargie HJ. Titration of vasodilator therapy in chronic heart failure according to plasma brain natriuretic concentration: randomized comparison of the neuroendocrine effects of tailors versus empirical therapy. *Am Heart J* 1999; 138:1126-32.
- Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 1992; 10:1111-4.
- Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995; 96:1280-7.
- National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm (accessed March 10, 2008)
- Ng LL, Geeranavar S, Jennings SC, Loke I, O'Brien RJ. Diagnosis of heart failure using urinary natriuretic peptides. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106:129-33.



- Ng LL, Loke IW, Davies JE, Geeranavar S, Khunti K, Stone MA, Chin DT, Squire IB. Community screening for left ventricular dysfunction using plasma and urinary natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1043-50.
- Nicolau N, Butur G, Laky D. Electronmicroscopic observations regarding the presence of natriuretic granules in the ventricle of patients with cardiopathies. *Rom J Morphol Embryol* 1997; 43:119-37.
- Nidorf SM, Picard MH, Triulzi MO, Thomas JD, Newell J, King ME, Weyman AE. New perspectives in the assessment of cardiac chamber dimensions during development and adulthood. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:983-8.
- Nielsen OW, McDonagh TA, Robb SD, Dargie HJ. Retrospective analysis of the cost-effectiveness of using plasma brain natriuretic peptide in screening for left ventricular systolic dysfunction in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:113-20.
- Nielsen OW, McDonagh TA, Robb SD, Dargie HJ. Retrospective analysis of the cost-effectiveness of using plasma brain natriuretic peptide in screening for left ventricular systolic dysfunction in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:113-20.
- Nilsson B, Bojö L, Wandt B. Influence of body size and age on maximal diastolic velocity of mitral annulus motion. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15:29-35.
- O**mland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Hertlitz J, Hartford M, Caidahl K. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106:2913-8.
- Osca J, Quesada A, Arnau MA, Osa A, Hervas I, Almenar L, Palencia M, Mateo A, Algarra F. Brain natriuretic peptide. Diagnostic value in heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:7-15.
- P**acher R, Bergler-Klein J, Globits S, Teufelsbauer H, Schuller M, Krauter A, Ogris E, Rödler S, Wutte M, Hartter E. Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1993; 71:1293-9.
- Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, Maurer G. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive



- hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:633-41.
- Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:248-54.
- Palmer SC, Endre ZH, Richards AM, Yandle TG. Characterization of NT-proBNP in human urine. *Clin Chem* 2009; 55:1126-34.
- Pandey KN, Oliver PM, Maeda N, Smithies O. Hypertension associated with decreased testosterone levels in natriuretic peptide receptor-A gene-knockout and gene-duplicated mutant mouse models. *Endocrinology* 1999; 140:5112-9.
- Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 2005; 26:901-32.
- Panteghini M, Clerico A. Understanding the clinical biochemistry of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: the prerequisite for its optimal clinical use. *Clin Lab* 2004; 50:325-31.
- Pascual-Figal DA, Domingo M, Casas T, Gich I, Ordoñez-Llanos J, Martínez P, Cinca J, Valdés M, Januzzi JL, Bayés-Genís A. Usefulness of clinical and NT-proBNP monitoring for prognostic guidance in destabilized heart failure outpatients. *Eur Heart J* 2008; 10:594-600.
- Pearson AC, Gudipati C, Nagelhout D, Sear J, Cohen JD, Labovitz AJ. Echocardiographic evaluation of cardiac structure and function in elderly subjects with isolated systolic hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:422-30.
- Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA, Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N Engl J Med* 1991; 324:295-301.
- Persson H, Lonn E, Edner M, Baruch L, Lang CC, Morton JJ, Östergren J, McKelvie RS. Diastolic dysfunction in heart failure with preserved systolic function: need for objective evidence. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:687-94.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: e45.
- Pfaffl MW. Quantification Strategies in Real-Time PCR. En: *A-Z of Quantitative PCR*. Editor: Bustin SA. International University Line. La Jolla, 2004. pag: 87-120.



- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodelling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81:1161-72.
- Pimenta JM, Almeida R, Araújo JP, Azevedo A, Frioies F, Rocha-concalves F, Ferreira a, Bettencourt P. Amino terminal B-type natriuretic peptide, renal function, and prognosis in acute heart failure: a hospital cohort study. *J Card Fail* 2007; 13:275-80.
- Poulos JE, Gower WR, Fontanet HL, Kalmus GW, Vesely DL. Cirrhosis with ascites. Increased atrial natriuretic peptide messenger RNA expression in rat ventricle. *Gastroenterology* 1995; 108:1496-503.
- Pousset F, Masson F, Chavirovskia O, Isnard R, Carayon A, Golmard JL, Lechat P, Thomas D, Komajda M. Plasma adrenomedullin, a new independent predictor of prognosis in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2000; 21:1009-14.
- Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligg U, Hasenfuss G. Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 1999; 43:323-31.
- Q**uiñones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA; Doppler Quantification Task force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. 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; 15:167-84.
- R**ademarker MT, Charles CJ, Kosoglau T, Protter AA, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Clearance receptors and endopeptidase: equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure. *Am J Physiol* 1997; 273:H2372-H2379.
- Rakowski H, Appleton C, Chan KL, Dumesnil JG, Honos G, Jue J, Koilpillai C, Lepage S, Martin RP, Mercier LA, O'Kelly B, Prieur T, Sanfilippo A, Sasson Z, Alvarez N, Pruitt R, Thompson C, Tomlinson C. Canadian consensus recommendations for the measurement and reporting of diastolic dysfunction by echocardiography: from the Investigators of Consensus on Diastolic Dysfunction by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 1996; 9:736-60.



- Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:976-82.
- Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide to detect pre clinical ventricular systolic or diastolic dysfunction: a community-based study. *Circulation* 2004; 109:3176-81.
- Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Cameron AV, Yandle TG. Dendroaspis natriuretic peptide: endogenous or dubious? *Lancet* 2002; 359:5-6.
- Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Troughton RW, Yandle TG. BNP in hormone-guided treatment of heart failure. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:151-5.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report on the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841-42.
- Rickham PP. Human experimental. Code of ethics of the world medical association. Declaration of Helsinki. *Br Med J* 1964; 2:177.
- Riddervold F, Smiseth OA, Hall C, Groves G, Risoe C. Rate-induced increase in plasma atrial natriuretic factor can occur independently of changes in atrial wall stretch. *Am J Physiol* 1991; 260:H1953-58.
- Rivera M, Cortés R, Mora V, Miró V, Cosín J, Jordán A, García de Burgos F, Salvador A, Sogorb F, Marín F, Climent V, Bertomeu V, Frutos A, Taléns R, Payá R, Pérez-Boscá JL, Diago JL; Grupo de Estudio de la Disfunción Ventricular Izquierda de la Comunidad Valenciana. NT-proBNP y desplazamiento del plano aurículo-ventricular. Relación e implicaciones diagnósticas. *Rev Esp Cardiol* 2003a; 56:1043-9.
- Rivera M, Miró V, Payá R, Salvador A, Sogorb F, García de Burgos F. Restrictive mitral flow velocity patterns predict changes in function indexes and N-terminal pro-brain natriuretic peptide plasma levels in general population. *Eur J Heart Fail* 2003b; 2:P141.
- Rivera M, Taléns-Visconti R, Salvador A, Bertomeu V, Miró V, García de Burgos F, Climent V, Cortés R, Payá R, Pérez-Boscá JL, Mainar L, Jordán A, Sogorb F, Cosín J, Mora V, Diago JL, Marín F. NT-proBNP



- levels and hypertension. Their importance in the diagnosis of heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57:396-402.
- Rodríguez E, Garcia AM, Foyo E, Amato D, Paniagua R. Role of thyroid hormones on the synthesis and release of atrial natriuretic peptide in rats with acute renal failure. *Nephron Exp Nephrol* 2003; 95:24-9.
- Rodríguez-Artalejo F, Banegas-Banegas JR, Guallar-Castillón P. Epidemiology of heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57:163-70.
- Rodríguez-Artalejo F, Guallar-Castillón P, Banegas-Banegas JR, del Rey-Calero J. Trends in hospitalization and mortality for heart failure in Spain 1980-1993. *Eur Heart J* 1997; 18:1771-9.
- Ry SD, Andreassi MG, Clerico A, Biagini A, Giannessi D. Endothelin-1, endothelin-1 receptors and cardiac natriuretic peptides in failing human heart. *Life Sci* 2001; 68:2715-30.
- Saijonmaa O, Ristimäki A, Fyhrquist F. Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173:514-20.
- Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest* 1989; 83:298-305.
- Sakata Y, Yamamoto K, Masuyama T, Mano T, Nishikawa N, Kuzuya T, Miwa T, Hori M. Ventricular production of natriuretic peptides and ventricular structural remodeling in hypertensive heart failure. *J Hypertens* 2001; 19: 905-9.
- Samson WK. Recent advances in ANF research. *Trends Endocrinol Metab* 1992; 3:86-90.
- Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, Kanda T, Sakamaki T, Tanaka S, Nagai R, Abe S, Takeuchi T. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoproteases furin. *J Biol Chem* 1997; 272:20545-54.
- Schaegger H, VonJagow G. Tricine-Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; 166:368-79.



- Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, Silverman NH, Tajik AJ. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2:358-67.
- Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. *JAMA* 1996; 275:1507-13.
- Schou M, Dalsgaard MK, Clemmesen O, Dawson EA, Yoshiga CC, Nielsen HB, Gustafsson f, Hildebrandt PR, Secher NH. Kidneys extract BNP and NT-proBNP in healthy young men. *J Appl Physiol* 2005; 99:1676-80.
- Schou M, Gustafsson F, Kistorp CN, Corell P, Kjaer A, Hildebrandt PR. Effects of Body Mass Index and Age on N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Are Associated with Glomerular Filtration Rate in Chronic Heart Failure Patients *Clin Chem* 2007; 53:1928–35.
- Schultz HD, Gardner DG, Deschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC. Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* 1988; 155:R6-13.
- Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of “urodilatin”, a new peptide of the cardiodilatin – (ANP) – family, extracted from human prohormone. *Am J Physiol* 1992; 263:F503-9.
- Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A novel new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; 267:13928-32.
- Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, Tolstaya AA, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Postnikov AB, Serebryanaya DV, Apple FS, Murakami MM, Katrukha AG. Immunodetection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood. *Clin Chem* 2008; 54:866-73.
- Seidman CE, Bloch KD, Klein KA, Smith JA, Seidman JG. Nucleotide sequences at the human and mouse atrial natriuretic factor genes. *Science* 1984; 226:1206-9.
- Seino y, Ogawa A, Yamashita T, Fukushima M, Ogata K, Fukumoto H, Takano T. Application of NT-proBNP and BNP measurements in cardiac care. A more discerning marker for the detection and evaluation of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:295-300.



- Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, Seferian KR, Karpova NS, Bloschitsyna MN, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Serebryanaya DV, Katrukha AG. Processing of pro-brain natriurético peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem* 2009; 55:489-98.
- Sengenés C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J* 2000; 14:1345-51.
- Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system. *Clin Chim Acta* 2001; 305:181-6.
- Shimizu H, Masuta K, Asada H, Sugita K, Sairenji T. Characterization of molecular forms of probrain natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta* 2003; 334:233-9.
- Siu SC, Rivera JM, Guerrero JL, Handschumacher MD, Lethor JP, Weyman AE, Levine RA, Picard MH. Three-dimensional echocardiography. In vivo validation for left ventricular volume and function. *Circulation* 1993; 88:1715-23.
- Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol* 2000; 167:239-46.
- Sohn DW, Chai IH, Lee DJ, Kim HC, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS, Seo JD, Lee YW. Assessment of mitral annulus velocity by Doppler tissue imaging in the evaluation of left ventricular diastolic function. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:474-80.
- Solang L, Malmberg K, Ryden L. Diabetes mellitus and congestive heart failure. Further knowledge needed. *Eur Heart J* 1999; 20:789-95.
- Stanton E, Hansen M, Wijeyesundera HC, Kupchak P, May C, Rouleau JL, PRAISE-2 study investigators. A direct comparison of the natriuretic peptides and their relationship to survival in chronic heart failure of a presumed non-ischaemic origin. *Eur J Heart Fail* 2005; 7:557-65.
- Stingo AJ, Clavell AL, Aarhus LL, Burnett JC. Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1992; 262:H308-H312.
- Stockand JD, Sansom SC. Regulation of filtration rate by glomerular mesangial cells in health and diabetic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:971-81.



- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332:78-81.
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of the natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 168:863-70.
- Sugeng L, Weinert L, Thiele K, Lang RM. Real-time three-dimensional echocardiography using a novel matrix array transducer. *Echocardiography* 2003, 20:623-35.
- Sultán M, Osso J. ¿Síndrome cardiorenal o renocardiaco? Un desafío médico Parte I. *Insuf Cardíaca* 2006; 3:131-5
- Sumida H, Yasue H, Yoshimura M, Okumura K, Ogawa H, Kugiyama K, Malsuyama K, Kikuta K, Morita E, Nakao K. Comparison of secretion patterns between A-type and B-type natriuretic peptide in patients with old myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1105-10.
- Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodelling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101:2981-8.
- Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Levy S, Linde C, Lopez-Sendon JL, Nieminem MS, Pierard L, Remme WJ. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26:1115-40.
- T**akahashi T, Allen PD, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricle. *Circ Res* 1992, 71:9-17.
- Takatsuji H, Mikami T, Urasawa K, Teranishi J, Onozuka H, Takagi C, Makita Y, Matsuo H, Kusuoka H, Kitabatake A. A new approach for evaluation of left ventricular diastolic function: spatial and temporal analysis of left ventricular filling flow propagation by color M-mode Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:365-71.
- Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:4239-44



- Tavazzi L. Towards a more precise definition of heart failure aetiology. *Eur Heart J* 2001; 22:192-95.
- Tawaragi Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175:645-51.
- Teerlink JR, Goldhaber SZ, Pfeffer MA. An overview of contemporary etiologies of congestive heart failure. *Am Heart J* 1991; 121:1852-53.
- The CONSENSUS trial study group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Group. *N Engl J Med* 1987; 316:1429-35.
- The Criteria Committee of the New York Heart Association. Diseases of the Heart and Blood Vessels: Nomenclature and Criteria for Diagnosis. 6th ed. Boston, Mass: Little Brown; 1964.
- The RESOLVD Investigators. Effects of metoprolol CR in patients with ischemic and dilated cardiomyopathy. The Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction Pilot Study. *Circulation* 2000; 101:378-84.
- The Studies of Left Ventricular Dysfunction Investigators (SOLVD). Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325:293-302.
- Thibault G, Doubell AF, García R, Lariviere R, Schiffrin EL. Endothelin-stimulated secretion of natriuretic peptides by rat atrial myocytes is mediated by endothelin A receptors. *Circ Res* 1994; 74:460-70.
- Thomas JD, Vandervoort PM, Greenberg NL, Ares MA, Adams MS. Application of color Doppler M-mode echocardiography in the assessment of ventricular diastolic function: analysis of the spatiotemporal velocity distribution. In: Ingels NB Jr, Daughters GT, Baan J, Covell JW, Reneman RS, Yin F C-P, editors. *Systolic and Diastolic Function of the Heart*. Amsterdam: IOS Press. 1996; pag. 101-18.
- Thomas JD, Weyman AE. Echocardiographic Doppler evaluation of left ventricular diastolic function. Physics and physiology. *Circulation* 1991; 84:977-990.
- Togashi K, Fujita S, Kawakami M. Presence of brain natriuretic peptide in urine. *Clin Chem* 1992; 38:322-3.



- Totsune K, Takahashi K, Satoh F, Sone M, Ohneda M, Satoh C, Murakami O, Mouri T. Urinary immunoreactive brain natriuretic peptide in patients with renal disease. *Regul Pept* 1996; 63:141-7.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350.
- Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355:1126-30.
- Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, Martin M, Fogarty A, Morehead A, Yandle TG, Richards AM, Starling RC, Young JB, Thomas JD, Klein AL. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:416-22.
- Troughton RW, Richards AM. Outpatients monitoring and treatment of chronic heart failure by amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement. *Am J Cardiol* 2008; 101:72A-75A.
- Tschöpe C, Kasner M, Westermann D, Gaub R, Poller WC, Schultheiss HP. The role of NT-proBNP in the diagnosis of isolated diastolic dysfunction: correlation with echocardiographic and invasive measurements. *Eur Heart J* 2005; 26:2277-84.
- Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC Jr. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 2002; 91:1127-34.
- Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Fukai D, Maeda Y, Ohnishi M, Mabuchi N, Kinoshita M. Digitalis increases brain natriuretic peptide in patients with severe congestive heart failure. *Am Heart J* 1997; 134:910-6.
- Tsutamoto T, Wada A, Sakai A, Ishikawa C, Tanaka T, Hayashi M, Fujii M, Yamamoto T, Dohke T, Ohnishi M, Takashima H, Kinoshita M, Horie M. Relationship between renal function and plasma brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:582-6.
- Valli N, Gobinet A, Bordenave L. Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology. *J Lab Clin Med* 1999; 134:437-44.



- Van Biesen W, De Bacquer D, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *Eur Heart J* 2007; 28:478-83
- Van Kimmenade RR, van Dielen F, Bakker J, Nijhuis J, Crijns H, Buurman W, van Diejen-Visser M, Greve JW, Pinto Y. Is brain natriuretic peptide production decreased in obese subjects? *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:886-7.
- Van Kimmenade RR, Pinto YM, Bayés-Genís A, Lainchbury JG, Richards AM, Januzzi JL Jr. Usefulness of intermediate amino-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations for diagnosis and prognosis of acute heart failure. *Am J Cardiol* 2006; 98:386-90.
- van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Baggish AL, Lainchbury JG, Bayes-Genis A, Richards AM, Pinto YM. Amino-terminal pro-brain natriuretic Peptide, renal function, and outcomes in acute heart failure: redefining the cardiorenal interaction? *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1621-7.
- Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:261-8.
- Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:1048-56.
- Vasan RS, Benjamin EJ, Larson MG, Leip EP, Wang TJ, Wilson Pw, Levy D. Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham Heart Study. *JAMA* 2002; 288:1252-9.
- Vesely DL. Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F167-77.
- Waldo SW, Beede J, Isakson S, Villard-Saussine S, Farré J, Clopton P, Fitzgerald RL, Maisel AS. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1874-82.
- Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002; 296: 557-559.
- Walther T, Klostermann K, Hering-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Stepan H. Fibrosis rather than blood pressure determines cardiac BNP expression in mice. *Regul Pept* 2003; 116:95-100.



- Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA, Vasani RS. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004b; 350:655-63.
- Wang TJ, Larson MG, Levy D, Leip EP, Benjamin EJ, Wilson PW, Sutherland P, Omland T, Vasani RS. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am J Cardiol* 2002; 90:254-8.
- Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasani RS. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004a; 109:594-600.
- Webber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345:1689-97.
- Wei CM, Kao PC, Lin JT, Heublein DM, Schaff HV, Burnett JC. Circulating beta-atrial natriuretic factor in congestive heart failure in humans. *Circulation* 1993; 88:298-305.
- Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC Jr. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89:1580-6.
- Wijeyaratne CN, Moutt PJA. The effect of α human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:343-6.
- Willenheimer R, Cline C, Erhardt L, Israelsson B. Left ventricular atrioventricular plane displacement: An echocardiographic technique for rapid assessment of prognosis in heart failure. *Heart* 1997; 78:230-6.
- Willenheimer R, Israelsson B, Cline C, Rydberg E, Broms K, Erhardt L. Left atrioventricular plane displacement is related to both systolic and diastolic left ventricular performance in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1999, 20:612-8.
- Willenheimer R. Assessment of left ventricular dysfunction and remodeling by determination of atrioventricular plane displacement and simplified echocardiography. *Scand Cardiovasc J Suppl* 1998; 48:1-31.
- Winqvist RJ, Scott AL, Vlasuk GP. Enhanced release of atrial natriuretic factor by endothelin in atria from hypertensive rats. *Hypertension* 1989; 14:111-4.
- World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva, Switzerland: World Health Organization. WHO Technical Report Series. pag. 894.



- Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. *Clin Chem* 2004; 50:867-73.
- Wu AH, Smith A. Biological variation of the natriuretic peptides and their role in monitoring patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:355-58.
- Y**amamoto K, Burnett JC Jr, Bermudez EA, Jougasaki M, Bailey KR, Redfield MM. Clinical criteria and biochemical markers for the detection of systolic dysfunction. *J Card Fail* 2000; 6:194-200.
- Yamamoto T, Kimura T, Ota K, Shoji M, Inoue M, Sato K, Ohta M, Yoshinaga K. Central effects of endothelin-1 on vasopressin release, blood pressure, and renal solute excretion. *Am J Physiol* 1992; 262:E856-62.
- Yang RH, Jin HK, Wyss JM, Chen YF, Oparil S. Pressor effect of blocking atrial natriuretic peptide in nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 1992; 19:198-205.
- Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994; 90:195-203.
- Yoshizawa A, Yoshikawa T, Nakamura I, Satoh T, Moritani K, Suzuki M, Baba A, Tawanaga S, Mitamura H, Ogawa S. Brain natriuretic peptide response is heterogeneous during beta-blocker therapy for congestive heart failure. *J Card Fail* 2004; 10:310-5.
- Yu CM, Sanerson E, Shum IO, Chan S, Yeung LY, Hung YT, Cockram CS, Woo KS. diastolic dysfunction and natriuretic peptides in systolic heart failure. Higher ANP and BNP levels are associated with the restrictive filling pattern. *Eur Heart J* 1996; 17:1694-702.
- Z**eidel ML, Kikeri D, Silva P, Burrows M, Brenner BM. Atrial natriuretic peptides inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. *J Clin Invest* 1988; 82:1067-74.
- Zeidel ML. Regulation of collecting duct Na⁺ reabsorption by ANP 31-67. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22:121-4.



PUBLICACIONES

PUBLICACIONES QUE HAN ORIGINADO LA TESIS DOCTORAL

1. Rivera M, **Cortés R**, Portolés M, Valero R, Sancho-Tello MJ, Martínez-Dolz L Sevilla B, Taléns-Visconti R, Jordán A, Miró V, Perez-Boscá JL, Marín F, Climent V, García de Burgos F, Payá R, Sogorb F, Bertomeu V, Salvador A. “Relación de los niveles plasmáticos de *big* endotelina-1 con NT-proBNP y la función ventricular de pacientes con insuficiencia cardiaca”. *Rev Esp Cardiol*. 2005; 58:278-84.
2. Rivera M, **Cortés R**, Salvador A, Bertomeu V, García de Burgos F, Payá R, Portolés M, Talens-Visconti R, Martínez-Dolz L, Valero R, Sevilla B, Climent V. “Obese subjects with heart failure have lower N-terminal pro-brain natriuretic peptide plasma levels irrespective of etiology”. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7:1168-70.
3. Talens-Visconti R, Rivera M, Sancho-Tello MJ; García de Burgos F, Martínez-Dolz L, Sevilla B, Climent V, **Cortés R**, Salvador A, Sogorb F, Miró V, Valero R, Pérez-Boscá JL, Bertomeu V, Portolés M, Payá R. “Left ventricular cavity area reflects N-terminal probrain natriuretic peptide plasma levels in heart failure”. *Eur J Echocardiogr*. 2006; 7:45-52.
4. Taléns-Visconti R, Rivera M, Climent V, Valero R, Martínez-Dolz L, Sancho-Tello MJ, **Cortés R**, Miró V, Sevilla B, Pérez-Boscá JL, Bertomeu V, Salvador A, Jordán A, Marín F, Sogorb F. “Maximum longitudinal relaxation velocity of the left ventricle. Its clinical value and relationship with NT-proBNP plasma levels in heart failure”. *Echocardiography* 2006; 23:295-302.
5. **Cortés R**, Portolés M, Salvador A, Bertomeu A, García de Burgos F, Martínez-Dolz L, Roselló-Lletí E, Climent V, Jordán A, Payá R, Sogorb F, Rivera M. “Diagnostic and prognostic value of urine NT-proBNP levels in heart failure patients”. *Eur J Heart Fail* 2006; 8:621-7.
6. Roselló-Lletí E, Rivera M, Miró V, Mora V, **Cortés R**, Lauwers C, Valero R, Sevilla B, Sogorb F, Morillas P, García de Burgos F, Portolés M. “NT-proBNP en orina. Su relación con los parámetros de función ventricular en la insuficiencia cardiaca”. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60:510-6.
7. **Cortés R**, Rivera M, Salvador A, Bertomeu V, García de Burgos F, Roselló-Lletí E, Portolés M, Payá R, Martínez-Dolz L, Climent V. “Variability of NT-proBNP plasma and urine levels in stable heart failure patients. A two years follow-up”. *Heart* 2007; 93:957-62.

8. **Cortés R**, Rivera M, Salvador A, García de Burgos F, Bertomeu V, Roselló-Lletí E, Martínez-Dolz L, Payá R, Almenar L, Portolés M. “Urinary B-type natriuretic peptide levels in the diagnosis and prognosis of heart failure”. *J Card Fail* 2007; 13:549-55.
9. **Cortés R**, Rivera M, Martínez-Dolz L, Roselló-Lletí E, Sancho-Tello MJ, Sevilla B, Portolés M, Cosín J. Niveles urinarios de péptido natriurético tipo B (BNP) y disfunción ventricular sistólica en pacientes con insuficiencia cardiaca. *Rev Clin Esp* 2009; 209:43-50.

