

Tesis doctoral

Marcadores inflamatorios y de disfunción endotelial en la insuficiencia cardíaca

Doctorando

Ignacio José Sánchez Lázaro

Co-directores de la tesis

Prof. Dr. Luis Almenar Bonet

Prof. Dr. Antoni Bayés Genís

Julio de 2013



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Medicina

© Ignacio José Sánchez Lázaro
ISBN-10: 84-616-5375-0
ISBN-13: 978-84-616-5375-1

Queda rigurosamente prohibido sin la autorización escrita del titular del copyright, bajo las sanciones que establece la ley, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, incluidos la reprografía y el tratamiento informática, así como la distribución de ejemplares de este trabajo mediante el alquiler o préstamo público.

Los doctores D. Luis Almenar Bonet y D. Antoni Bayés Genís, como directores de tesis, certifican que D. Ignacio José Sánchez Lázaro ha realizado la tesis doctoral titulada “Marcadores inflamatorios y de disfunción endotelial en la insuficiencia cardíaca”.

La presente tesis doctoral se ha realizado bajo la modalidad de compendio por publicaciones según la aclaración número CO1 de l’Escola de Postgrau y la normativa del RD 778/98.

En virtud de lo anterior y según la normativa vigente de la Universitat Autònoma de Barcelona, el doctorando presenta este proyecto de tesis para optar al grado de doctor en medicina.

Directores:

Luis Almenar Bonet

Antoni Bayés Genís

Doctorando:

Ignacio José Sánchez Lázaro



Índice

Agradecimientos	7
Acrónimos	9
Presentación y comentario preliminar	11
Aprobación de la UAB	13
Aprobación del CEIC Hospital La Fe	17
Prefacio	21
Introducción	23
Importancia de la insuficiencia cardíaca	23
Inflamación e insuficiencia cardíaca	30
Coagulación e insuficiencia cardíaca	33
Disfunción endotelial e insuficiencia cardíaca	35
Justificación y objetivos	39
Métodos y Resultados: Artículos	43
Primero	43
Segundo	53
Tercero	62
Complementario	71
Discusión conjunta	79
Limitaciones	87
Conclusiones	89
Anexos	91
Bibliografía	97



Agradecimientos

El diccionario de la Real Academia de la Lengua Española define el término Doctor como "persona que ha recibido el último y preeminente grado académico que confiere una universidad u otro establecimiento autorizado para ello". Es por esto que cuando hablamos de una tesis doctoral, hacemos referencia al esfuerzo y dedicación que ha supuesto para el doctorando, la consecución de dicho mérito.

Ciertamente la realización de una tesis doctoral no es tarea fácil y requiere de un empeño y sacrificios especiales por parte de quien la realiza, aunque no es por ello menos cierto que un trabajo de esta naturaleza no es fruto de una sola persona. Con esto último no quiero poner en tela de juicio el trabajo de tantos y tantos doctores, sino simplemente reconocer que en un trabajo de esta envergadura intervienen, de forma inexorable, un número variable de personas.

Si en cualquier tesis doctoral es necesaria la colaboración de terceras personas, más lo es si cabe en una de investigación clínica y básica como la que a continuación les presento. Es por ello que deseo que mis primeras líneas de esta tesis doctoral sean para todas aquellas personas que de una u otra manera, con más o menos importancia, me han facilitado la realización de este trabajo en cualquiera de sus partes y etapas, y espero no olvidarme de ninguna.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a todos los pacientes que, voluntariamente y sin compensación alguna, se prestaron a las diferentes pruebas que implicaba la participación en esta línea de investigación.

Este trabajo no habría sido posible sin la extracción de las muestras sanguíneas en las que se determinaban los diferentes biomarcadores. Por ello quiero darle las gracias a todas las enfermeras del Servicio de Cardiología, quienes jamás me pusieron un problema ni una mala cara cuando aparecía corriendo tras ellas con gritos similares al de "el 601 me ha firmado y hay que sacarle más tubos de sangre".

A todo el personal del Centro de Investigación quienes colaboraron en el procesado y análisis de las muestras aunque en muchas de las ocasiones no estuviera íntimamente relacionado con su labor investigadora.

A mis compañeros del Servicio de Cardiología, y en especial al Dr. Martínez Dolz, a todos ellos, quienes de una u otra manera me facilitaron mi actividad diaria investigadora. No quiero olvidar en este apartado a Mónica, mi compañera y amiga diaria que además de hacerme la labor de despacho más amena, ha sido parte fundamental en la edición de esta tesis.

A Edelmiro, Virtudes y Vicenta, quienes desde recién iniciada mi residencia confiaron en mí para la realización de esta línea de investigación. Ellos nunca se cansaron de explicarme una y otra vez cómo determinar y analizar los diferentes marcadores analizados, así como de colaborar y corregir en la elaboración de los manuscritos que componen esta tesis doctoral.

Mi agradecimiento al Dr. Bayés, por su disponibilidad y colaboración en todo momento.

A Luis, quien además de confiar en mí para dirigir esta línea de investigación ha seguido confiando en mí y me ha permitido formarme en el campo de la insuficiencia cardíaca y trasplante en general, y en el campo de la investigación en particular. Gracias, Luis.

A mis hermanos Jaime e Inés, porque siempre han estado ahí en los momentos más difíciles y porque gran parte de mí se lo debo a ellos.

A mi padre, porque sin él jamás habría llegado a ser la persona que soy y mucho menos el Médico en el que me he convertido.

A mi madre, por darme la VIDA en el sentido más amplio de la palabra. Ella siempre quiso lo mejor para mí y puso todo su esfuerzo en que lo consiguiera, y estoy seguro que desde lo más alto, lo sigue deseando y luchando por ello.

Finalmente mis últimas palabras de agradecimiento son para mi hija Marina y para mi mujer Cristina. Marina, has llegado hace poco y ya has conseguido que no pueda vivir sin ti. Cristina, gracias por haber renunciado a tantas cosas para que yo cumpliera mis sueños, por quererme tanto, por perdonarme tanto. Sin ti jamás habría podido realizar este proyecto, y creo que jamás podré devolverte todo lo que me has dado. Gracias.

Acrónimos

AS	Ácido siálico
CEC	Células endoteliales circulantes
DE	Disfunción endotelial
EF	Estadio funcional
eSel	E-selectina
FP	Fibrinógeno proteico
FvW	Factor von Willebrand
IC	Insuficiencia cardíaca
ICFSP	Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada
ICS	Insuficiencia cardíaca con función sistólica deprimida
IL	Interleuquinas
IL-6	Interleuquina 6
MI	Marcadores inflamatorios
PCR	Proteína C reactiva
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento vásculo endotelial



Presentación y comentario preliminar

La presente tesis doctoral se ha realizado bajo la modalidad de compendio por publicaciones según la aclaración número CO1 de l'Escola de Postgrau por la que los estudiantes que pertenecen a la normativa del RD 778/98 o anteriores pueden utilizar artículos para su tesis doctoral que hayan sido publicados con posterioridad al inicio de su programa de doctorado y antes de la inscripción de su tesis doctoral, como es el caso del presente doctorando.

Esta tesis doctoral es el fruto de una línea de trabajo que aúna investigación clínica y básica y que fue iniciada en 2006, fruto de la colaboración del Servicio de Cardiología y del Centro de Investigación, ambos departamentos pertenecientes al Hospital Universitario La Fe de Valencia. Como consecuencia del trabajo y colaboración de los dos Servicios, de sus integrantes, y en especial del presente doctorando, la línea de investigación en la que se enmarca esta tesis doctoral ha generado nueve artículos en revistas internacionales, dos en revistas nacionales, nueve comunicaciones a congresos internacionales, doce comunicaciones a congresos nacionales y ha recibido financiación en tres convocatorias públicas y dos privadas.

La Universitat Autònoma de Barcelona brinda la oportunidad de presentar la tesis doctoral como compendio de publicaciones científicas sobre una misma línea de investigación, en revistas con un determinado factor de impacto. Esta posibilidad estimula la investigación, premia el trabajo científico que suscite interés en la comunidad científica y facilita la elaboración de tesis doctorales a investigadores con resultados notables. Todos estos fueron los motivos por los que desde un principio me decanté por realizar mi tesis doctoral en la Universitat Autònoma de Barcelona.

Así, el núcleo fundamental de esta tesis doctoral son tres de los artículos publicados durante estos años, y su estructura y formato está centrada en la justificación, presentación y discusión de estas publicaciones.

Aprobación de la tesis en el modo compendio por publicaciones



Exp. ED

Sr. Ignacio José Sánchez Lázaro
Av. Ausiàs March, 2, esc. 2, porta 15
46111 Rocafort

Vista la instància presentada per en/na Ignacio José Sánchez Lázaro de sol·licitud de presentació de tesi doctoral com a compendi de publicacions,

De conformitat amb el que disposa la Normativa acadèmica de la UAB aplicable als estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol (text refós aprovat per l'Acord de Consell de Govern de 2 de març de 2011),

Atès que a les publicacions hi ha de constar la UAB mitjançant la filiació del director o del doctorand,

RESOLC

Acceptar la presentació de la tesi doctoral de Ignacio José Sánchez Lázaro com a compendi de publicacions amb els articles següents:

- Sánchez, I.J.; Almenar, L. [et al.] "Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class". A: *International Journal of Cardiology* (2008; 129: 388-393).
- Vila, V.; Martínez, V. [et al.] "Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients". A: *International Journal of Cardiology* (2007).
- Martínez, V.; Sánchez, I. "Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction". A: *Dis Markers* (2011; 31:75-82).
- Sánchez, I.J.; Almenar, L. [et al.] "Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure?". A: *Heart International* (2011).

/
/
/
/

Contra aquesta resolució, que no esgota la via administrativa, les persones interessades poden interposar recurs d'alçada davant la Rectora Magnífica de la UAB, en el termini d'un mes, a comptar des del dia següent a la recepció d'aquesta notificació o, si s'escau, des del dia següent de la seva publicació, de conformitat amb el que preveu l'article 115 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, modificada per la Llei 4/1999, de 13 de gener, i l'article 76 de la Llei 26/2010, de 3 d'agost, de Règim Jurídic i de Procediment de les Administracions Públiques de Catalunya de la Generalitat de Catalunya.

La publicació següent podrà formar part de la tesi com a annex o part no fonamental, tot i que els treballs fets en aquesta publicació es poden comentar en la discussió de resultats.

- Vila, V.; Martínez, V. [et al.] "Effect of oral anticoagulant therapy on thrombospondin-1 and von Willebrand factor in patients with stable heart failure". A: *Thrombosis Research* (2007).

La Comissió d'Estudis de Postgrau,
Per delegació



Jaume FARRÉS VICÉN
Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 13 de juny de 2012

Contra aquesta resolució, que no esgota la via administrativa, les persones interessades poden interposar recurs d'alçada davant la Rectora Magnífica de la UAB, en el termini d'un mes, a comptar des del dia següent a la recepció d'aquesta notificació o, si s'escau, des del dia següent de la seva publicació, de conformitat amb el que preveu l'article 115 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, modificada per la Llei 4/1999, de 13 de gener, i l'article 76 de la Llei 26/2010, de 3 d'agost, de Règim Jurídic i de Procediment de les Administracions Públiques de Catalunya de la Generalitat de Catalunya.

Edifici U - Campus de la UAB - 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) - Barcelona. Spain
Tel.: 34 93 581 30 10 - Fax: 34 93 581 34 76
ep.doctorat@uab.es - www.uab.es/postgrau

**Aprobación del proyecto de tesis por parte del Comité
Ético e Investigación Biomédica del Hospital
Universitario La Fe**

2007/0194



AGÈNCIA
VALENCIANA
DE SALUT

HOSPITAL UNIVERSITARIO



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha 20 de diciembre de 2007, el Proyecto de Investigación titulado "**Marcadores inflamatorios en la insuficiencia cardiaca aguda**", y se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, en consecuencia este Comité acuerda emitir **informe favorable** supeditado a :

Indicar quien es el titular del registro

de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario La Fe por el **Dr. Almenar de Cardiología** como Investigador Principal.

Fdo: S. Rodríguez
Secretario del CEIB



FUNDACION PARA LA INVESTIGACION
HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE DE VALENCIA
FECHA: 16-1-08
SALIDA N.º 24

2007/0194
Fundación para la Investigación
Hospital La Fe

Dr. Almenar
Servicio de Cardiología

Asunto: Autorización Inicio Estudio.

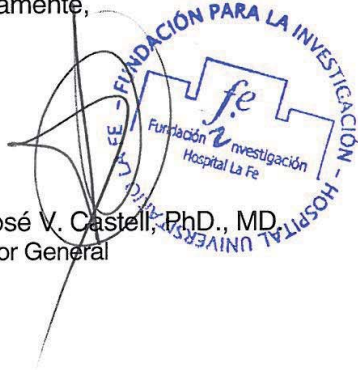
Valencia, 14 de Enero de 2008

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente**.

A la vista de los dictámenes emitidos, el Proyecto de Investigación titulado: "MARCADORES INFLAMATORIOS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA AGUDA.", puede llevarse a cabo, con el condicionante expreso de remitir la información solicitada por el /los Comités dentro de los próximos días.

Atentamente,

Dr. José V. Castell, PhD., MD
Director General



Fundación para la Investigación Hospital La Fe.

Avda. Campanar, 21. Escuela de Enfermería, 6ª planta, Despacho 619. 46009 Valencia.

Tel.: (+34) 96 1973313 – (+34) 961973328; Fax: +34 96 349 4416

E-mail: fundacion_lafe@gva.es

Prefacio

En el campo de la Medicina en general, y de la Cardiología en particular, la insuficiencia cardíaca (IC) supone uno de los temas más interesantes a día de hoy. Este interés viene dado principalmente por el aumento de la incidencia y de la prevalencia de esta enfermedad, además de por su mal pronóstico a medio y largo plazo.

El gran volumen de pacientes que sufren esta enfermedad y los gastos que de ello se derivan, ha motivado la búsqueda de nuevos tratamientos y terapias en este campo, con la consiguiente aparición de nuevos fármacos y dispositivos desarrollados en los últimos años. Pese a estos avances, el pronóstico global de los pacientes con IC ha mejorado muy poco, y sólo en determinados subgrupos de pacientes.

Muchos ensayos clínicos prometedores en IC en sus fases iniciales han fallado posteriormente cuando han intentado demostrar beneficios clínicos. Junto con la presión de la industria por la consecución rápida de réditos económicos, una de las posibles causas que se postulan para explicar estos fracasos terapéuticos sea que seguimos desconociendo parte de la fisiopatología de la propia IC, por lo que es necesario seguir profundizando en la misma.

Casi la mitad de los pacientes con IC, aquellos con IC con función sistólica preservada, no se han beneficiado de los avances producidos en los últimos años, y a día de hoy, su tratamiento y pronóstico sigue siendo el mismo que el de hace años, puesto que no se ha aprobado ningún fármaco ni terapia específica para este tipo de IC.

Desde las primeras evidencias, allá por la década de 1950, de que en la IC existía un estado inflamatorio notable hasta la actualidad, se ha avanzado notablemente en este campo. Uno de los pasos más importantes ha sido el reconocer que la inflamación no es consecuencia de la IC, sino que está implicada en el desarrollo, mantenimiento y evolución de la misma. A raíz de este descubrimiento creció el interés por la búsqueda de marcadores inflamatorios (MI) implicados en la IC, ya que podrían servir para conocer mejor la fisiopatología de la enfermedad, su evolución, ayudar en la estratificación pronóstica e incluso servir como dianas terapéuticas en un futuro.

El estudio de las alteraciones que se producen en la coagulación y la disfunción endotelial (DE) en la IC se ha desarrollado de forma paralela, aunque de manera más tardía, al de la inflamación. Actualmente es reconocida la implicación de ambos procesos en la fisiopatología de esta enfermedad y su potencial utilidad clínica.

Por consiguiente, un mayor conocimiento en el campo de la inflamación, de la coagulación y de la DE en la IC supondría ahondar en la fisiopatología de la misma y tal vez, en un futuro, ayudaría en el manejo y tratamiento de los pacientes que la padecen.

Son estos campos, la inflamación, la coagulación y la disfunción endotelial en el seno de la insuficiencia cardíaca, los objetivos de estudio esta tesis doctoral.

Introducción

Importancia de la insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca (IC) es actualmente uno de los principales problemas de salud pública. El constante aumento en su incidencia y prevalencia junto con las características de esta enfermedad, resultan en unos gastos económicos y humanos muy altos para la sociedad (Tabla 1) [1-3].

Tabla 1

Costes directos proyectados de la ECV para el período 2010-2030 en EEUU
(en miles de millones de dólares)

Año	Todas las ECV	HTA	CI	IC	ACV	HTA como Factor de riesgo
2010	272,5	69,9	35,7	24,7	28,3	130,7
2015	358	91,4	49,8	32,4	38	170,4
2020	470,3	119,1	61,4	42,9	51,3	222,5
2025	621,6	155	81,1	57,5	70	293,6
2030	818,1	200,3	106,4	77,7	95,6	389

ECV: enfermedad cardiovascular; HTA: hipertensión arterial; CI: cardiopatía isquémica; IC: insuficiencia cardíaca; ACV: accidente cerebro-vascular.

Tomada de Heidenreich et al. *Circulation*. 2011;123:933-944.

La IC supone la vía final común de numerosas patologías cardíacas, entre las que se encuentran la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica, la sobrecarga de volumen y otras cardiopatías congénitas o adquiridas [4, 5]. La mejora en el tratamiento de todas estas patologías, en especial de la hipertensiva y de la isquémica, junto al aumento de la esperanza de vida, justifica que tanto la incidencia como la prevalencia de la IC hayan aumentado en los últimos años y todavía lo vaya a hacer más en los próximos (Tabla 2) [3, 6-8].

Tabla 2**Proyección de prevalencia de ECV (%) para el período 2010-2030 en EEUU**

Año	Todas las ECV	HTA	CI	IC	ACV
2010	36,9	33,9	8	2,8	3,2
2015	37,8	34,8	8,3	3	3,4
2020	38,7	35,7	8,6	3,1	3,6
2025	39,7	36,5	8,9	3,3	3,8
2030	40,5	37,3	9,3	3,5	4

ECV: enfermedad cardiovascular; HTA: hipertensión arterial; CI: cardiopatía isquémica; ACV: accidente cerebro-vascular.
Tomada de Heidenreich et al. *Circulation*. 2011;123:933-944.

Según datos del estudio Price [9], la prevalencia de la IC en nuestro país se sitúa en el 6,8% de la población general, con cifras muy similares para ambos sexos y con un aumento de la misma a medida que se estudian estratos de población más añosos. Así, la prevalencia de la IC por grupos de edad se sitúa en el 1,3% entre la población de 45 a 55 años, del 5,5% entre los que tienen 55 y 64 años, del 8% entre 65 y 74 años y del 16% en los pacientes de más de 75 años [10, 11].

Estas cifras tan elevadas no son exclusivas de España, sino que todos los países de nuestro entorno sufren de manera similar la epidemia que supone la IC (Figura 1) [12, 13].

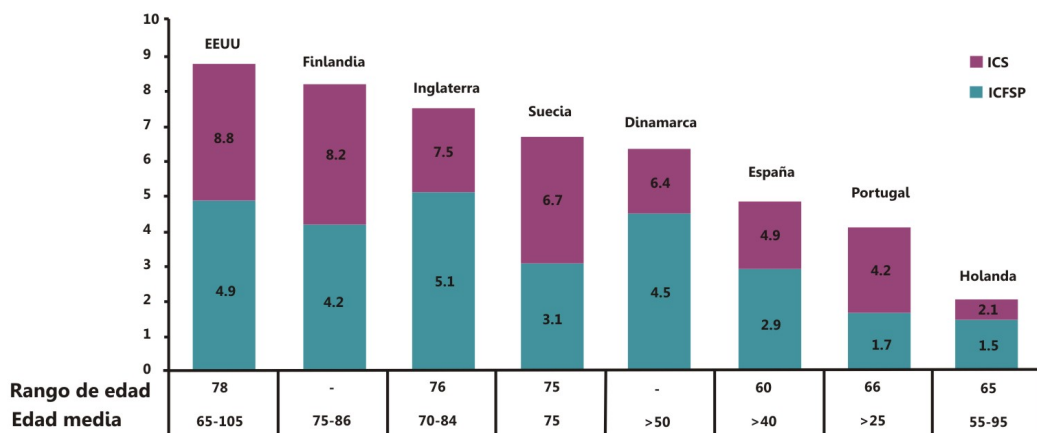


Figura 1. Prevalencia de la insuficiencia cardíaca en distintos países. ICS: insuficiencia cardíaca sistólica; ICFSP: insuficiencia cardíaca con función sistólica preservada. Tomada de *Hogg et al. J Am Coll Cardiol. 2004;43:317-327.*

No es de extrañar con estos números que la IC suponga una de las principales enfermedades en consumo de recursos sanitarios de cualquier tipo, especialmente entre la población de más edad. En este sentido, la IC supone la principal causa de hospitalización en pacientes de más de 65 años, con una alta tasa de reingresos (del 29 al 59 % en los primeros seis meses) [14], lo que ha propiciado la creación de unidades especializadas en IC en un intento de disminuir estos datos, mejorar la calidad de vida de los pacientes y disminuir el gasto sanitario [15].

Hasta fechas no muy lejanas se consideraba únicamente que la IC era significativa si existía una depresión de la función ventricular izquierda (ICS), lo que ha motivado que la práctica totalidad de los ensayos realizados en IC hayan incluido únicamente a este subgrupo de pacientes [16]. La insuficiencia cardíaca con función sistólica preservada (ICFSP) es una entidad que aunque conocida desde hace tiempo, nunca ha gozado del interés de la comunidad científica, Cardiólogos incluidos. Esta falta de interés se explica por el diferente perfil de estos pacientes (Tabla 3), que normalmente son bastante más añosos y con mayor número de comorbilidades asociadas [17], así como por la ausencia de procedimientos y terapias específicos.

Tabla 3**Características de los pacientes con ICFSP e ICS**

Característica	ICFSP	ICS
Edad	Frecuentemente mayores	50-70 años típicamente
Sexo	Más frecuente mujer	Más frecuente hombre
FEVI	Normal o >40%	<40%
Diámetro VI	Normal, frecuente la hipertrofia ventricular	Normalmente dilatado
Hipertrofia ventricular en ECG	Normalmente presente	A veces presente
Radiografía de tórax	Congestión con/sin cardiomegalia	Congestión y cardiomegalia
Ritmo de galope	Cuarto ruido	Tercer ruido
Hipertensión arterial	+++	++
Diabetes mellitus	+++	++
Infarto de miocardio previo	+	+++
Obesidad	+++	+
Enfermedad pulmonar	++	0
Apnea del sueño	++	++
Díalisis	++	0
Fibrilación auricular	+ (normalmente paroxística)	+ (normalmente persistente)

IC: insuficiencia cardíaca; ICFSP: insuficiencia cardíaca con función sistólica preservada; ICS: insuficiencia cardíaca sistólica; FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo; VI: ventrículo izquierdo; ECG: electrocardiograma.
Adaptada de Jessup et al. N Engl J Med 2003;348:2007-18

Aunque el perfil clínico de ambos tipos de IC es muy diferente, la prevalencia global de la ICFSP es muy parecida a la ICS, y si bien su pronóstico es ligeramente mejor que el de la ICS en población ambulatoria, éste se iguala bastante a partir del primer ingreso por descompensación (Figura 2) [18].

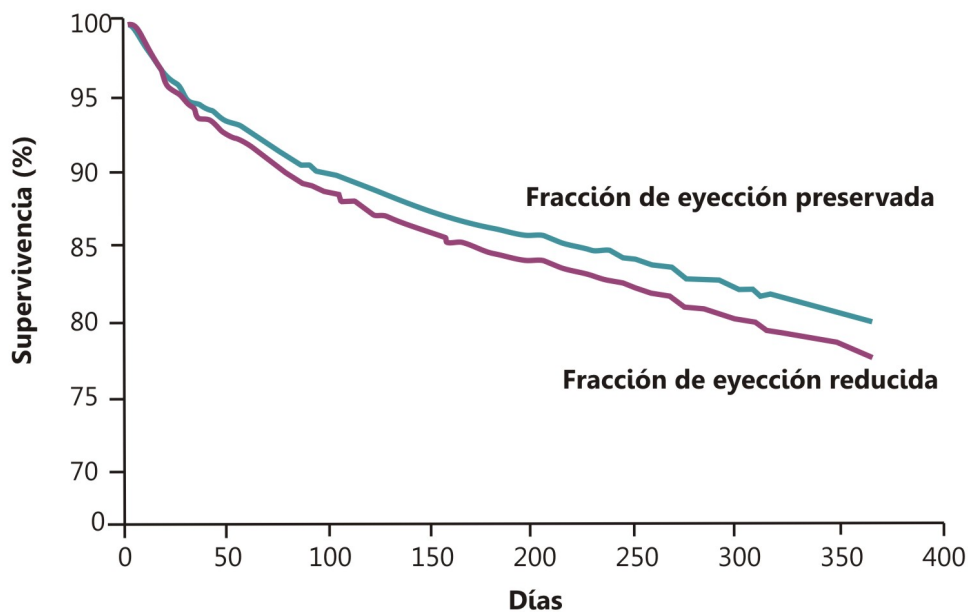


Figura 2. Curvas de supervivencia ajustadas para pacientes con ICFSP e ICS para el primer año tras el primer ingreso hospitalario. Hazard ratio, 1.13; intervalo de confianza al 95%, 0.94 a 1.36; $p=0,18$. Tomado de Bhatia RS et al. N Engl J Med. 2006 20;355:260-9

Además de la importante morbilidad que supone la IC (visitas a los servicios de urgencias, reingresos, consumo de fármacos), la IC es tras la cardiopatía isquémica, la patología cerebrovascular y el cáncer pulmonar y de bronquios, la cuarta causa de mortalidad en España (Tabla 4)[9].

Tabla 4**Número de defunciones según causa de muerte España 2011**

	Total	Hombres	Mujeres
Total defunciones	387.911	199.854	188.057
Cardiopatía isquémica	34.837	19.925	14.912
Enfermedades cerebrovasculares	28.855	12.152	16.703
Cáncer de bronquios y pulmón	21.058	17.479	3.579
Insuficiencia cardíaca	17.089	5.954	11.135
Enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores	15.904	11.819	4.085
Demencia	14.583	4.780	9.803
Enfermedad de Alzheimer	11.907	3.528	8.379
Cáncer de colon	11.687	6.687	5.000
Diabetes mellitus	9.955	4.153	5.842

Fuente: <http://www.ine.es/prensa/np703.pdf>

La mortalidad debida a la IC ha disminuido ligeramente en los últimos años, aunque los numerosos avances que se han producido en el tratamiento de esta enfermedad no han conseguido evitar que la morbi-mortalidad continúe siendo inaceptablemente alta, con una esperanza de vida del 50% a los 5 años, muy similar al pronóstico de los pacientes oncológicos (Figura 3 y 4) [19-22].

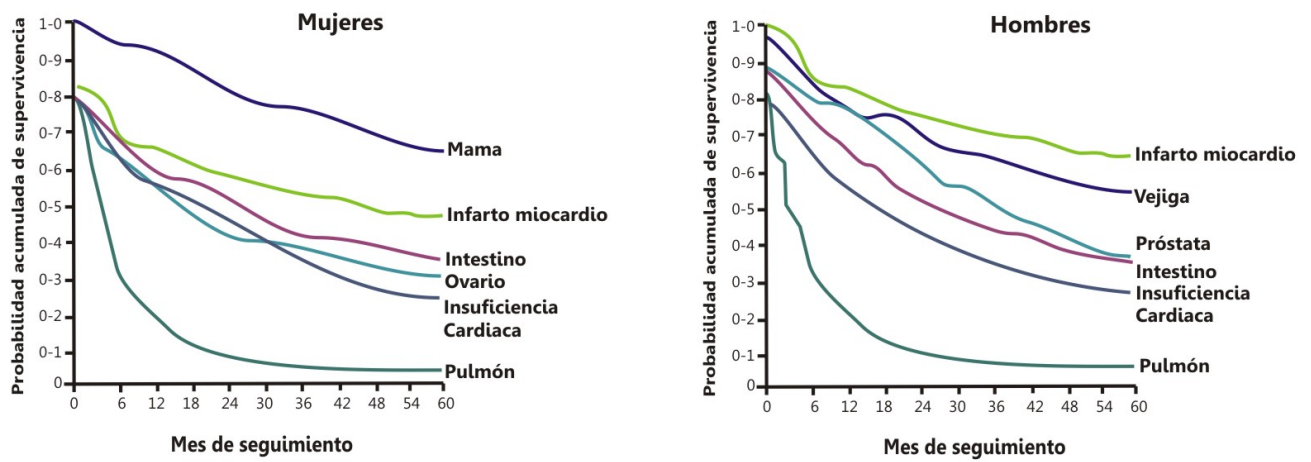


Figura 3. La supervivencia a los cinco años en insuficiencia cardíaca crónica es peor que en la mayoría de cánceres. Tomada de McMurray et al. Eur Heart J Supplements 2002; 4 (Suppl D): D50-D58.

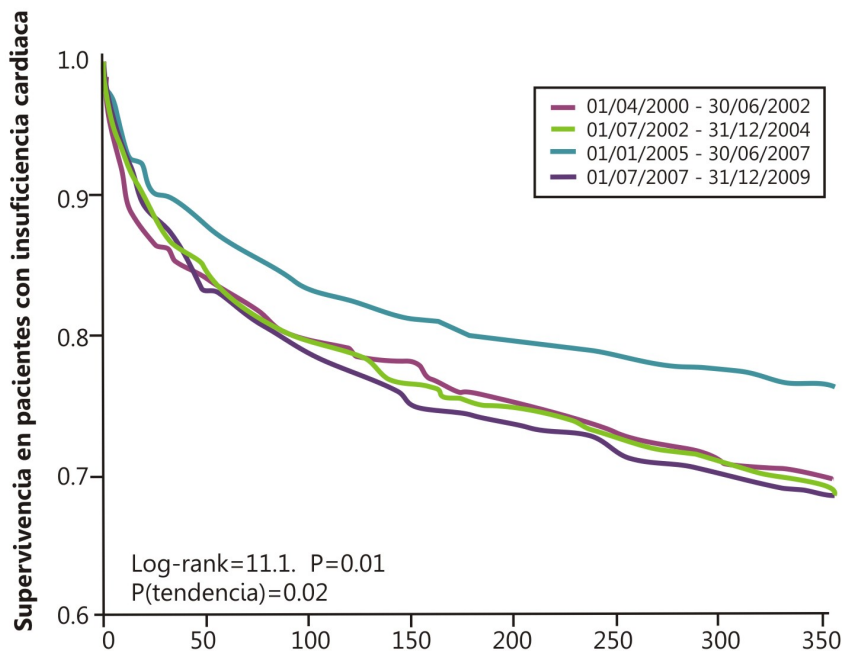


Figura 4. Mortalidad tras un primer ingreso por insuficiencia cardíaca en diferentes períodos. Tomado de Fernández-Bergés et al. Rev Clin Esp. 2013;213(1):16---24.

Es por ello que cualquier línea de investigación encaminada a conocer mejor la fisiopatología de la IC sea acogida con interés, pues un conocimiento más profundo de los procesos patológicos de cualquier enfermedad pone las bases para un mejor diagnóstico y tratamiento de la misma a largo plazo.

Inflamación e insuficiencia cardiaca

Los avances producidos en los últimos años han permitido reconocer que la IC no es sólo resultado de una agresión de cualquier tipo sobre el miocardio, sino que también es el resultado de una compleja interrelación entre los sistemas genéticos, neurohormonales y del sistema inflamatorio [23, 24].

La inflamación se está mostrando como un componente importante en cada vez mayor número de procesos patológicos e incluso en algunos fisiológicos como el ejercicio físico. El paradigma de inflamación se encuentra en la sepsis, donde un proceso inicial (infección) desencadena una respuesta sistémica que va mucho más allá de la patología inicial y se convierte en el aspecto clave de la enfermedad. Aunque en la IC el papel de la inflamación no es tan importante como en la sepsis o en la leucemia, su implicación no es despreciable (Figura 5), y cada vez son más los autores que se atreven a calificar a numerosos MI como factores de riesgo para el desarrollo de IC [25-28].

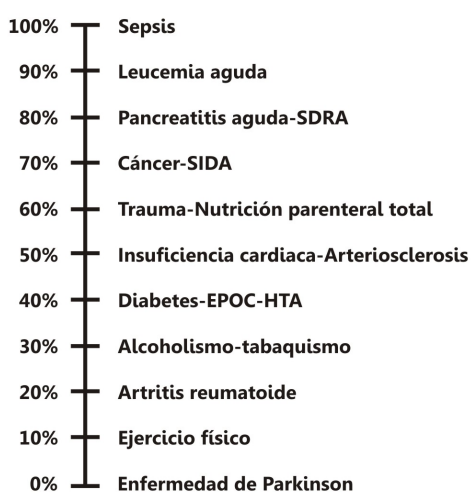


Figura 5. Escala de mayor a menor (100-0) respecto a la intensidad y persistencia de la respuesta inflamatoria sistémica.
SDRA: Síndrome de distrés respiratorio del adulto
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
HTA: Hipertensión arterial
Tomado de Navigante et al. Insuficiencia Cardiaca, vol. 4, nº 4, 2009

El concepto de MI es amplio, y engloba muchos tipos de moléculas. Así, dentro de dicho concepto o del término más actual biomarcador, se engloban tanto citoquinas, elementos inmunológicos, proteínas de fase aguda, proteínas implicadas en la coagulación e incluso otros tipos de moléculas como los polisacáridos [29]. En general, los MI son inespecíficos y se producen en respuesta a cualquier daño o disfunción que se produzca en el organismo, independientemente de la causa subyacente.

El conocimiento más profundo de la inflamación como proceso sistémico, con el descubrimiento de cada vez mayor número de MI implicados, ha puesto de manifiesto que siendo el proceso de la inflamación algo común en muchas enfermedades, existen particularidades en cada patología. Estas peculiaridades no son sólo entre patologías que afectan a diferentes sistemas, sino que están presentes incluso en las que afectan al mismo órgano, como el corazón.

El estudio de la inflamación en la IC se remonta a 1956, cuando por primera vez se comprobó que aquellos pacientes con IC más grave presentaban mayores niveles de proteína C reactiva (PCR) [30]. Más tarde, en la década de 1990 Levine et al. demostraron de forma similar que el TNF- α se encontraba más elevado en pacientes con IC [31], y a partir de esta fecha comenzaron a surgir más estudios involucrando a cada vez mayor número de MI (interleuquinas, factores de coagulación, metaloproteasas...).

El objetivo básico de cualquier investigación en el campo de la inflamación en la IC, según Morrow y de Lemos, se basa en la búsqueda de biomarcadores que cumplan los siguientes tres principios básicos [32]:

- Que su determinación se pueda realizar en un tiempo y coste razonables.
- Que aporte información aún no disponible.
- Que dicha información sea útil a la hora de la toma de decisiones clínicas.

Aunque estas premisas parezcan sencillas a simple vista, engloban una complejidad enorme y no todos los MI las cumplen. Pese a que un MI no satisfaga todas estas características, puede aportar otro tipo de información que lo haga interesante, como es profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, ayudar en la estratificación del riesgo de los pacientes y/o servir para monitorizar el tratamiento. Además,

ciertos MI, aparte de cumplir alguno de estos criterios, pueden ser patogénicos en sí mismos, y por ello constituir un potencial objetivo terapéutico.

Uno de los principales puntos de interés de la inflamación en la IC es saber si realmente existe una relación etiológica o causal. En este sentido existen varias posibilidades:

- La IC se produce por los mecanismos clásicos (isquemia, HTA...) y la inflamación aparece cuando existe IC pero sin relación fisiopatológica, es decir, se trata de un mero testigo.
- Cualquiera que sea la causa, tras el fallo cardíaco se activan mecanismos sistémicos de inflamación que contribuyen a perpetuar la IC, pero sin estar involucrados en su origen.
- Los MI están presentes antes del desarrollo de la IC y participan tanto en el inicio como en el mantenimiento y evolución de la misma.

Todo proceso patológico suele ser consecuencia de más de una causa, y en la IC ocurre lo mismo. Como se indica en el primer apartado, existen MI que únicamente son testigos de la IC sin relación fisiopatológica en ningún estadio de la enfermedad y que son consecuencia de la propia IC. Otros MI es cierto que no están presentes antes del inicio de la IC, pero una vez establecida ésta, aparecen y tienen un efecto nocivo sobre el organismo en general y/o sobre el miocardio en particular, ayudando en el mantenimiento de la IC. Finalmente, se ha comprobado que la inflamación de bajo grado provocada por otros procesos patológicos extracardíacos o incluso por factores de riesgo cardiovascular tradicionales (diabetes, hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo), tiene un efecto nocivo directo sobre el miocardio y constituye un factor de riesgo independiente para el desarrollo de IC [33].

Se han propuesto diferentes teorías para explicar el origen de la inflamación en la IC. Por un lado, el mismo miocardio puede producir citoquinas proinflamatorias (como el TNF- α) y algunas evidencias sugieren que esta producción puede incrementarse por la presencia de catecolaminas circulantes como sucede en la propia IC. Por otro lado, la translocación de endotoxinas bacterianas desde el intestino, suceso que se produce en pacientes con IC, puede a su vez activar el sistema inmune y derivar en la mayor producción de citoquinas inflamatorias. Una vez activada la inflamación, el efecto nocivo de los MI puede ser por su acción sobre el miocito, el intersticio miocárdico o ambos, y se puede resumir de la siguiente manera:

- Efectos conocidos: disfunción ventricular izquierda, edema de pulmón, miocardiopatía, disminución del flujo al músculo esquelético, disfunción endotelial, anorexia y caquexia.
- Efectos potenciales: desacople del receptor de la adenilciclasa, activación del programa de genes fetales y apoptosis de cardiomiocitos.

La existencia de MI de varios tipos, y con distinta relación con la IC es importante comentarla. Aquellos MI sin actividad biológica ni implicación en el desarrollo y/o mantenimiento de la IC no podrán ser objetivo terapéutico, pero sí servirían en la monitorización y/o diagnóstico de la enfermedad. De forma contraria, aquellos MI implicados en la IC, además de lo anterior, pueden servir como factores pronósticos o incluso constituir una diana terapéutica.

Una demostración indirecta del papel de la inflamación en la IC vino de la comprobación de que tratamientos conocidos y efectivos para la IC reducían el estado inflamatorio. En este sentido, en varios ensayos clínicos, el grupo con mejor evolución asoció también una disminución de determinados MI. Surge aquí de nuevo la disyuntiva de si la disminución en estos parámetros se debió a la mejoría de la IC, fue solo algo coyuntural o incluso si la mejoría de la IC se debió a la mejora de los propios MI.

Como se ha comentado, los primeros MI en descubrirse fueron la PCR y el TNF- α , a los que siguieron las interleuquinas (IL). Tanto el TNF- α como la IL-6 demostraron tener un efecto nocivo directo sobre el miocardio, por lo que se utilizaron como diana terapéutica. Los resultados de estos estudios fueron negativos, pero se pudo sacar una conclusión muy valiosa, y fue que la inflamación es un proceso altamente complejo, redundante y que el bloqueo de una sola de sus vías no detiene el proceso, pues la activación se traslada a otras rutas patológicas [34].

Coagulación e insuficiencia cardíaca

La IC, especialmente en fases avanzadas, se ha relacionado con alteraciones de la función endotelial y de la coagulación. Estas alteraciones favorecen un estado protrombótico

que permanece incluso en presencia de anticoagulación oral y que tiene un impacto negativo sobre la morbi-mortalidad de estos pacientes [35].

Existen datos suficientes en la literatura para afirmar que los sistemas de inflamación y coagulación están relacionados, y no sólo porque la inflamación active el proceso de la coagulación, sino porque la coagulación puede afectar también al estado inflamatorio. Es por ello que resulta difícil encontrar una patología en la que la inflamación juegue un papel destacado y no se vea afectada la coagulación, o viceversa. El ejemplo más claro de tan estrecha relación se observa en la coagulación intravascular diseminada, donde una patología inicial activa el sistema inflamatorio y éste a su vez, la cascada de la coagulación de forma incontrolada [36].

El principal nexo de unión entre ambos sistemas lo constituye el factor tisular (figura 6). Junto a esta relación existen otras vías por las que se explica la activación de la coagulación por parte de la inflamación, resumiéndose en tres mecanismos [37]:

- Aumento en la producción de factor tisular, fibrinógeno y otros factores implicados en la coagulación, a través del estímulo que suponen las citoquinas, especialmente la IL-6.
- La regulación a la baja de la proteína C.
- La inhibición de la fibrinólisis (TNF- α e IL-1).

A su vez, la coagulación también modula en parte el proceso de la inflamación, especialmente a través de la trombina y de sustancias liberadas por las plaquetas como la P-selectina (Figura 6).

En la patología cardiovascular, el ejemplo más claro de la relación inflamación-coagulación es el que se produce en la cardiopatía isquémica, donde la activación inflamatoria debida a la rotura de una placa arteriosclerótica conlleva la activación de la coagulación y finalmente desemboca en la trombosis del vaso sanguíneo. Pese a estos datos, la alteración de la coagulación en la IC parece ser independiente de la etiología, relacionándose más con el grado de inflamación de cada momento [37].

Los pacientes con IC poseen mayor riesgo de sufrir eventos trombóticos, y por ello su presencia supone un factor de riesgo añadido a tener en cuenta. Este hecho se refleja en

la práctica clínica, por ejemplo, al constituir la IC un factor de riesgo independiente a la hora de decidir el tratamiento anticoagulante en pacientes con fibrilación auricular.

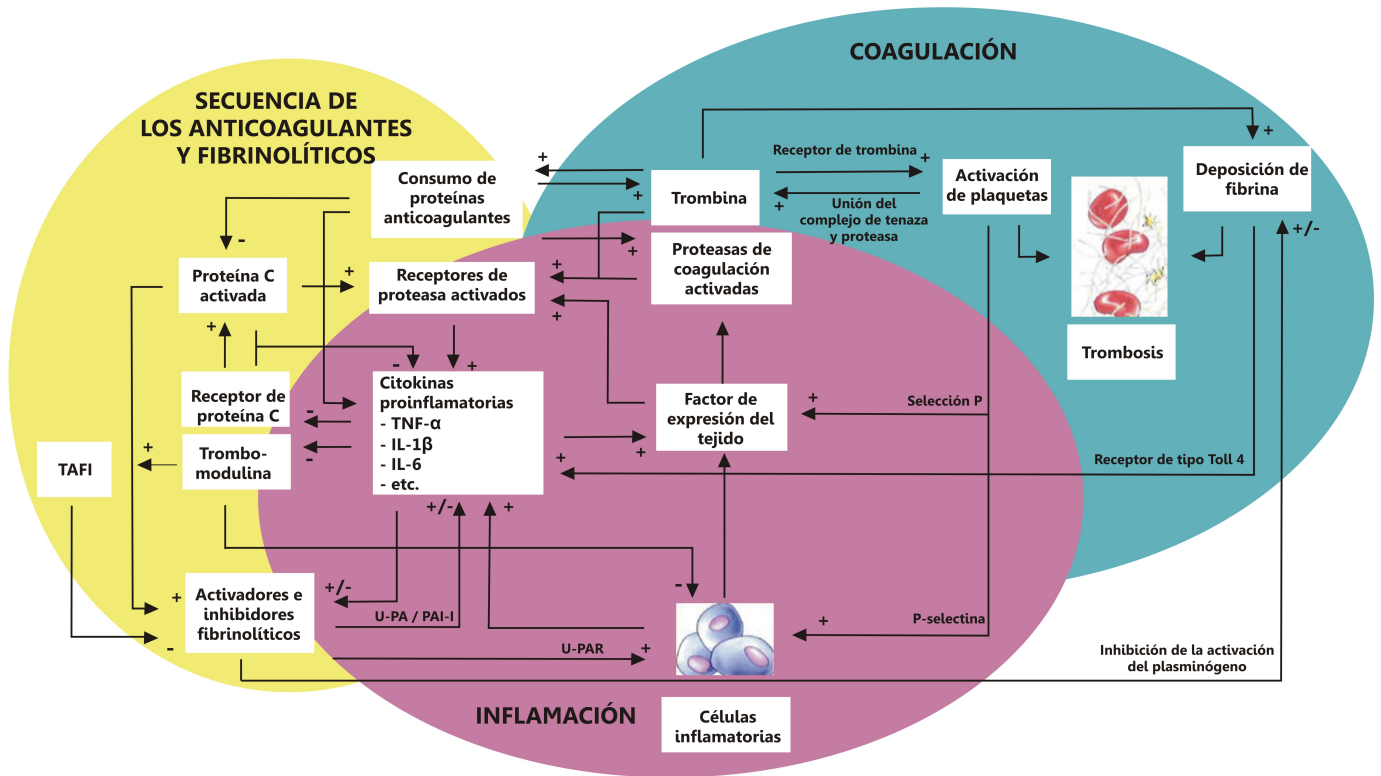


Figura 6. Relación entre inflamación y coagulación.

Disfunción endotelial e insuficiencia cardiaca

El endotelio constituye una monocapa de células que recubre la parte interna de los vasos sanguíneos. Su función no es únicamente de barrera mecánica entre el vaso y la sangre, sino que tiene una actividad biológica muy compleja. Mediante la liberación de múltiples sustancias, el endotelio participa en procesos tan variados como son el tono vascular, la coagulación, la inflamación e incluso en procesos inmunitarios. Entre la amplia variedad de sustancias que libera el endotelio se encuentran el óxido nítrico, prostaglandinas, el factor tisular, el factor von Willebrand (FvW) y la trombomodulina [38, 39].

La correcta función e integridad del endotelio vascular tiene una importancia notable en la enfermedad cardiovascular, incluyendo la IC. La disfunción endotelial (DE) puede darse por alteración de la función endotelial en diferentes grados o deberse a un daño anatómico o incluso a una separación del endotelio de la lámina interna. En ambos casos, el endotelio, y todas las sustancias y funciones que de él se derivan, se ven afectadas [40].

En el seno de la IC, tradicionalmente se consideraba que la DE se daba únicamente en estadios avanzados y la vasoconstricción era su única manifestación. Los avances científicos en este campo han demostrado que la DE forma parte de la fisiopatología de la IC, estando implicada tanto en su aparición como en su mantenimiento. La disfunción miocárdica por cualquier causa genera estrés vascular e hipoxia tisular, lo que facilita la DE. A su vez, la propia DE supone una alteración de las sustancias que libera el endotelio, lo que perpetúa la propia DE y favorece la aparición y/o mantenimiento de la IC [40].

En la actualidad el estudio de la DE (tanto por daño estructural como por disfunción aislada) se realiza por la medida de las concentraciones plasmáticas de FvW (marcador de daño/disfunción endotelial), trombomodulina soluble (marcador de daño endotelial) y e-selectina soluble (marcador de activación endotelial) [34, 41]. Los marcadores mencionados son una fuente indirecta de información sobre el estado endotelial, por lo que se hacía necesario disponer de un método de valoración directa del endotelio.

Las células endoteliales circulantes (CEC, Figura 7) son células provenientes de la descamación de la monocapa de la íntima de los vasos sanguíneos. Estas células son muy poco frecuentes en sujetos sanos (<3 células/mL), por lo que una mínima elevación en sangre periférica se considera patológico, confiriéndole gran sensibilidad para el diagnóstico de la DE. Su liberación se produce como consecuencia de una agresión al endotelio de cualquier tipo, con lo que se elevan en patologías tan variadas como la cardiopatía isquémica, la IC, la hipertensión pulmonar e incluso en procesos neoplásicos [42-44]. Al formar parte de la propia estructura del endotelio, la principal ventaja de las CEC frente a otros métodos de valoración del daño endotelial, radica en que suponen un método directo de valoración del daño/disfunción endotelial [45]. De este modo, Lee et al. encontraron a estas células, entre una amplia variedad de biomarcadores, como el único predictor de riesgo para sufrir un evento cardiovascular mayor en los 30 primeros días después de un síndrome coronaria agudo [46].

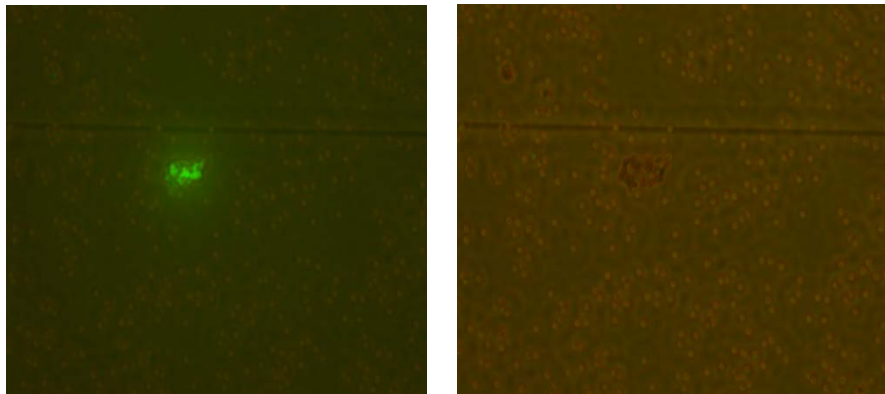


Figura 7. Células endoteliales circulantes formando una roseta de 10 μm de longitud. A la izquierda marcadas con un lecho inmunomagnético y a la derecha con tinción verde brillante con *Ulex Europaeus lectin*.

Al ser un marcador novel, y a pesar de su relación fisiopatológica clara con el endotelio, las CEC necesitaban una validación antes de poder ser empleadas como marcadores de DE. Varios estudios han demostrado que existe una buena correlación entre los niveles de CEC y los marcadores de DE ya conocidos y establecidos hasta la fecha, como son el FvW, la e-Selectina [47]. De igual manera, la validez de las CEC se ha demostrado frente a métodos invasivos de análisis de la función endotelial como la administración intravenosa de acetilcolina o adenosina y la medición del flujo en el antebrazo [48].

Justificación y Objetivos

Justificación

La insuficiencia cardíaca es una enfermedad con una alta prevalencia e incidencia al ser la vía final de numerosas y variadas cardiopatías. Por ello, dentro del concepto IC existen numerosas diferencias en función del tipo de IC y de la etiología de la misma. Una de las vías de estudio en los últimos años en el campo de la IC es la de los procesos inflamatorios y de disfunción endotelial implicadas en la misma. Ahora bien, los estudios publicados hasta la fecha se han realizado en pacientes con IC sin atender a su tipo ni a su etiología, por lo que el estudio de estos aspectos está más que justificado.

La motivación de esta tesis, que se presenta como compendio de publicaciones y está integrada por tres trabajos de investigación que se reproducen a continuación, es la de ahondar en el conocimiento de dos aspectos:

- a) El estudio de la inflamación y coagulación en pacientes con IC, su comparación con controles sanos y la exploración de correlaciones con aspectos clínicos.
- b) Profundizar en el conocimiento de las células endoteliales circulantes en pacientes con IC y su comparación con marcadores de disfunción endotelial ya establecidos y validados.
- c) Analizar posibles diferencias en el campo de la inflamación entre los dos tipos de IC, insuficiencia cardíaca con función sistólica deprimida o con función sistólica conservada. ICS e ICFSP.

En el primer artículo de los que componen esta tesis, se analizan diversos marcadores inflamatorios en pacientes con IC estable y se comparan con controles sanos, así como la correlación de estos marcadores con parámetros clínicos, analíticos y ecocardiográficos.

En el segundo artículo, se ha estudiado la evolución de un marcador novel de disfunción endotelial, las células endoteliales circulantes, en pacientes con IC. Este artículo es el primero que, en una misma población de pacientes con IC, ha analizado la evolución de las CEC desde la fase aguda a la estable, relacionándolas además con marcadores de disfunción endotelial clásicos como el factor von Willebrand o el factor de crecimiento vascular.

La IC se divide, en función de la fracción de eyección que presente el paciente, en IC con fracción de eyección deprimida (ICS) e IC con fracción de eyección conservada (ICFSP). Ambas difieren en muchos aspectos, si bien el pronóstico, una vez el paciente se inestabiliza, es muy similar. En el tercer y último artículo de los que componen esta tesis, se ha comparado el estado inflamatorio de pacientes con IC descompensada y ambos tipos de IC.

Con los tres artículos que componen el cuerpo central de esta tesis por compendio de publicaciones, y con el que se añade como suplementario, se constata un proceso de investigación continuo por parte del doctorando en el campo de la insuficiencia cardíaca en general, y de los marcadores de inflamación y de disfunción endotelial en particular. La población de estudio ha sido la habitual en la práctica clínica y no pacientes incluidos en ensayos clínicos, con lo que refleja mejor la población general de pacientes con IC y hace que sus resultados sean más fácilmente extrapolables al resto de pacientes con IC.

Objetivos específicos

Artículo 1

Título del Artículo 1

Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class. Sánchez-Lázaro IJ, Almenar L, Reganon E, Vila V, Martínez-Dolz L, Martínez-Sales V, Moro J, Agüero J, Ortiz-Martínez V, Salvador A. Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class. *Int J Cardiol.* 2008 Oct 13;129(3):388-93. Epub 2007 Nov 26. Erratum in: *Int J Cardiol.* 2011 Feb 3;146(3):484.

Objetivo del Artículo 1

Analizar si determinados marcadores de inflamación se encuentran más elevados en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica que en un grupo sano control.

Explorar las posibles diferencias en dichos niveles según la etiología de la insuficiencia cardíaca.

Comprobar si existe una correlación entre los marcadores inflamatorios, la fracción de eyección y el estadio funcional de los pacientes.

Artículo 2

Título del Artículo 2

Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction Martínez-Sales V, Sánchez-Lázaro I, Vila V, Almenar L, Contreras T, Reganon E. Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Dis Markers.* 2011;31(2):75-82.

Objetivo del Artículo 2

Evaluar la evolución de las células endoteliales circulantes en pacientes con insuficiencia cardíaca y diferente clase funcional.

Analizar si existe correlación entre el número de células endoteliales circulantes y marcadores ya establecidos de disfunción vascular y angiogénesis.

Artículo 3

Título del Artículo 3

Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure?. Sánchez-Lázaro IJ, Almenar-Bonet L, Reganon-Salvador E, Vila-Liante V, Martínez-Sales V, Martínez-Dolz L, Agüero-Ramón-Llin J, Salvador-Sanz A. Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure? Heart Int. 2011;6(2):e17.

Objetivo del Artículo 3

Analizar determinados marcadores inflamatorios en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda, y explorar posibles diferencias en estos marcadores según se trate de pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección deprimida o preservada.

Artículo complementario

Título del Artículo Complementario

Vila V, Sales VM, Almenar L, Lázaro IS, Villa P, Reganon E. Effect of oral anticoagulant therapy on thrombospondin-1 and von Willebrand factor in patients with stable heart failure. Thromb Res. 2008;121(5):611-5.

Objetivo del Artículo Complementario

Evaluar, en pacientes con insuficiencia cardíaca estable, el impacto de la anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K sobre determinados marcadores inflamatorios y de coagulación.

Métodos y Resultados

Artículo publicado fundamental 1

Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class. Sánchez-Lázaro IJ, Almenar L, Reganon E, Vila V, Martínez-Dolz L, Martínez-Sales V, Moro J, Agüero J, Ortiz-Martínez V, Salvador A. Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class. *Int J Cardiol.* 2008 Oct 13;129(3):388-93. Epub 2007 Nov 26. Erratum in: *Int J Cardiol.* 2011 Feb 3;146(3):484.

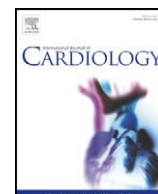




Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard



Corrigenda

Corrigendum to “Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients[☆]” Int J Cardiol 130 (2008) 276–277

Virtudes Vila^a, Vicenta Martínez-Sales^a, Luis Almenar^b, Ignacio Sánchez Lázaro^b, Piedad Villa^c, Edelmiro Reganon^{a,*}

^a Research Center, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^b Cardiology Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^c Clinical Pathology Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

Dr. Ignacio J. Sanchez Lazaro, the co-author of the above article wants to add that this article is part of his doctoral thesis in the Unversitat Autònoma de Barcelona (Departament de Medicini Interna). This information was missed in the original publication.

[☆] Supported by Conselleria Empresa, Universitat i Ciència, grant 05081.

DOI of original article: [10.1016/j.ijcard.2007.07.010](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.07.010).

* Corresponding author. Centro Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avda.

Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 963862797.

E-mail address: reganon_ede@gva.es (E. Reganon).

doi:[10.1016/j.ijcard.2011.01.001](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.01.001)

Corrigendum to “Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class[☆]” Int J Cardiol 129 (2008) 388–393

Ignacio J. Sánchez-Lázaro^{a,*}, Luis Almenar^b, Edelmiro Reganon^c, Virtudes Vila^c, Luis Martínez-Dolz^b, Vicenta Martínez-Sales^c, José Moro^b, Jaime Agüero^b, Víctor Ortiz-Martínez^b, Antonio Salvador^b

^a Avda. Ausias March 2, esc 2 pta 15. 46111, Rocafort, Valencia, Spain

^b Heart Failure and Heart Transplantation Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario La Fe, Spain

^c Research Center, Hospital Universitario La Fe, Spain

Dr. Ignacio J. Sanchez Lazaro, the first author of the above article wants to add that this article is part of his doctoral thesis in the Unversitat Autònoma de Barcelona (Departament de Medicini Interna). This information was missed in the original publication.

DOI of original article: [10.1016/j.ijcard.2007.07.138](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.07.138).

* Corresponding author. Fax: +34 96 197 33 14.

E-mail address: igsanla@comv.es (I.J. Sánchez-Lázaro).

doi:[10.1016/j.ijcard.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.01.002)

Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class [☆]

Ignacio J. Sánchez-Lázaro ^{a,*}, Luis Almenar ^b, Edelmiro Reganon ^c, Virtudes Vila ^c,
Luis Martínez-Dolz ^b, Vicenta Martínez-Sales ^c, José Moro ^b, Jaime Agüero ^b,
Víctor Ortiz-Martínez ^b, Antonio Salvador ^b

^a Avda. Ausias March 2, esc 2 pta 15. 46111, Rocafort, Valencia, Spain

^b Heart Failure and Heart Transplantation Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario La Fe, Spain

^c Research Center, Hospital Universitario La Fe, Spain

Received 12 April 2007; accepted 7 July 2007

Available online 26 November 2007

Abstract

Introduction and objectives: While it appears to be clear that an inflammatory process occurs in heart failure (HF), it is still to be defined whether inflammation depends to a greater extent on HF etiology, functional class (FC), or the extent of depression of ejection fraction (EF). Our objectives were to analyze differences in inflammatory marker levels as compared to a healthy population, to assess differences depending on HF etiology, and to relate values with FC and EF.

Patients and methods: Fifty-nine consecutive outpatients with stable HF (57+/-9 years, 89% males) and 59 controls (55+/-8 years, 85% males) were enrolled into the study. Causes of HF included ischemic heart disease ($n=24$), idiopathic dilated cardiomyopathy ($n=24$), and miscellaneous conditions ($n=11$). Patients with decompensation in the past 6 months were excluded from the study. Protein fibrinogen, sialic acid, C-reactive protein (CRP), and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) were measured. Echocardiography was performed in all study patients. FC was assessed using the NYHA classification.

Results: A comparison of inflammatory marker levels between the HF and control groups showed significant differences in all markers, except for TNF-alpha. Protein fibrinogen in controls: 253+/-54 mg/dl, protein fibrinogen in HF: 294+/-67 mg/dl; $p<0.05$. Sialic acid in controls: 53+/-1 mg/dl, sialic acid in HF: 61+/-12 mg/dl; $p<0.05$. CRP in controls: 1.3+/-0.7 mg/dl, CRP in HF: 7.8+/-1.2 mg/dl; $p<0.05$. TNF-alpha in controls: 183+/-51 ng/ml, TNF-alpha in HF: 203+/-13 ng/ml; $p=0.2$. No differences were found between the different etiologies of HF. A positive association was seen between FC and protein fibrinogen and TNF-alpha ($p<0.05$), but not with EF.

Conclusions: Increased inflammatory marker levels related to FC of the patient, but not to EF, are found in chronic HF.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Heart failure; Inflammatory markers; Ventricular function; Functional class

1. Introduction

Heart failure is no longer considered as a condition where only a pump failure exists. It is now seen as a disease in which

the neurohormonal system plays a primary role. The most widely studied neurohormonal markers are interleukins [1,2].

There are studies analyzing the value of inflammatory markers in certain conditions. These include fibrinogen and sialic acid in ischemic heart disease [3,4]. However, the value of these markers in patients with chronic stable HF depending on the etiology of the condition and the relationship to functional status and ejection fraction have been less extensively studied.

[☆] This work was supported by a research grant from the Generalitat Valenciana, Conselleria de Educació, Universitat i Ciència (05081).

* Corresponding author. Fax: +34 96 197 33 14.

E-mail address: igsanla@comv.es (I.J. Sánchez-Lázaro).

Table 1
Clinical profile of the analyzed groups

	Controls	Patients with chronic HF
No.	59	59
Age (years)	55±8	57±9
Males	50 (85)	53 (89)
Diabetes mellitus	0 (0)	18 (30)
Cholesterol (mg/dl)	225±38	188±37
Triglycerides (mg/dl)	134±95	154±88
HBP	2 (3)	19 (32)
Smoking — yes	Yes: 2 (3)	Yes: 3 (5)
– No	No: 18 (30)	No: 36 (61)
– Former smokers	Former smokers: 0 (0)	Former smokers: 15 (25)
Hyperuricemia	0 (0)	25 (43)
FC 1–2	59 (100)	32 (54)
FC>2	0(0)	16 (27)
EF	79±19	29±10
CA from AF	0 (0)	14 (23)
Complete LBBB	0 (0)	18 (30)
PM	0 (0)	7 (12)
Beta-blockers	0 (0)	22 (37)
CCBs	1 (2)	5 (8)
ACE inhibitors	1 (2)	41(69)
ARBs	0 (0)	6 (10)
ASA	0 (0)	16 (27)
Clopidogrel	0 (0)	3 (5)
Anticoagulants	0 (0)	30 (50)
Statins	0 (0)	26 (44)
Fibrates	0 (0)	1 (2)
Diuretics	0 (0)	43(72)
Nitrates	0 (0)	13 (22)
Amiodarone	0 (0)	12 (20)
Digoxin	0 (0)	38 (64)
Allopurinol	0 (0)	8 (13)

HBP: high blood pressure; FC: functional class; EF: ejection fraction; CA from AF: complete arrhythmia from atrial fibrillation; LBBB: left bundle branch block; PM: pacemaker; CCBs: calcium channel blockers. Values are given as mean±SD, number of cases, and percentages in brackets.

The aim of this study was to analyze whether inflammatory marker levels are increased in patients with chronic HF as compared to a control group, to assess potential differences in the levels depending on HF etiology, and to verify if a correlation exists between markers, ejection fraction, and a symptomatic status of patients.

2. Patients and methods

2.1. Patients and design

Fifty-nine outpatients diagnosed of chronic HF were evaluated in a cross-sectional study. Consecutive patients were recruited. Patients who had experienced any decompensation episode in the past six months and who did not give their consent were excluded from the study. The control group consisted of 59 healthy subjects from the hospital staff, age- and sex-matched to the patients. Patients were informed of the study objectives and gave their consent to participate in the study. All study procedures comply with the Declaration of Helsinki of 1975.

2.2. Etiology of HF

The cause of HF was established based on the clinical history. A diagnostic coronary angiography performed in the past year was available in all cases. Three groups were formed based on etiology: ischemic heart disease, idiopathic dilated cardiomyopathy, and a so-called miscellaneous group (seven valvular, two alcoholic cardiomyopathies, one postpartum, and one arrhythmogenic dysplasia of right ventricle).

2.3. Clinical profile and echocardiography

The clinical characteristics of the population studied are summarized in Tables 1 and 2. Functional class was determined based on the NYHA classification as acceptable (NYHA Class ≤ II) and poor (NYHA Class > II).

The echocardiographic study was performed with a HP Sonos 5500 equipment. Ejection fraction was measured using the modified Simpson method, following the guidelines of the

Table 2
Clinical profile of patients with chronic heart failure

	Ischemic heart disease	Idiopathic dilated cardiomyopathy	Miscellaneous
No.	24	24	11
Age (years)	59±8	56±9	55±8
Males	24 (100)	19 (79)	8 (72)
Diabetes mellitus	9 (37)	3 (13)	6 (54)
Cholesterol (mg/dl)	183±38	189±34	199±41
Triglycerides (mg/dl)	174±109	134±44	143±53
HBP	10 (41)	7 (35)	2 (18)
Smoking — yes	Yes: 2 (8)	Yes: 0 (0)	Yes: 1 (9)
– No	No: 14 (58)	no: 15 (62)	no: 9 (82)
– Former smokers	Former smokers: 8 (34)	Former smokers: 9 (37)	Former smokers: 1 (9)
Hyperuricemia	4 (16)	10 (42)	2 (18)
FC 1–2	10 (41)	14 (58)	8 (72)
FC>2	7 (29)	6 (25)	3 (27)
EF (%)	28±8	28±8	33±13
CA from AF	2 (8)	8 (34)	4 (36)
Complete LBBB	1 (4)	13 (54)	4 (36)
PM	2 (8)	4 (17)	1 (9)
Beta-blockers	10 (41)	8 (34)	4 (36)
CCBs	5 (21)	0 (0)	0 (0)
ACE inhibitors	18 (75)	15 (62)	8 (72)
ARBs	2 (8)	3 (13)	1 (9)
ASA	13 (54)	2 (8)	1 (9)
Clopidogrel	3 (13)	0 (0)	0 (0)
Anticoagulants	8 (34)	14 (58)	8 (72)
Statins	15 (62)	7 (29)	4 (36)
Fibrates	0 (0)	0 (0)	1 (9)
Diuretics	12 (50)	21 (87)	10 (91)
Nitrates	11 (46)	1 (4)	1 (9)
Amiodarone	6 (25)	3 (13)	3 (27)
Digoxin	13(54)	16(67)	9 (82)
Allopurinol	1 (4)	6 (25)	1 (9)

HBP: high blood pressure; FC: functional class; EF: ejection fraction; CA from AF: complete arrhythmia from atrial fibrillation; LBBB: left bundle branch block; PM: pacemaker; CCBs: calcium channel blockers. Values are given as mean±SD, number of cases, and percentages in brackets.

Table 3
Inflammatory markers in 59 patients with chronic heart failure and 59 healthy subjects (controls)

	Control (n=59)	HF patients (n=59)	p
Fibrinogen (mg/dl)	253±54	294±67	p=0.0002
Sialic acid (mg/dl)	53±11	61±12	p=0.0003
CRP (mg/l)	1.3±0.7	7.8±1.2	p=0.0001
TNF-alpha (ng/ml)	183±51	203±13	p=0.2

CRP: C-reactive protein; TNF-alpha: tumor necrosis factor alpha. Values are given as mean±SD.

American Society of Echocardiography [5]. Echocardiographies were performed within 30 days of blood sampling for marker tests.

2.4. Variables analyzed

Inflammatory markers tested included protein fibrinogen, sialic acid, C-reactive protein, and tumor necrosis factor alpha.

Protein fibrinogen plasma levels were measured using the heat precipitation method [6]. Within-test coefficient of variation, less than 8%.

Total plasma levels of sialic acid were measured using a commercial enzymatic-colorimetric method (Sialic acid

Table 4
Pearson's correlation coefficients between inflammatory markers and ejection fraction

	EF	p
Fibrinogen	0.066	0.631
Sialic acid	-0.050	0.717
CRP	0.018	0.898
TNF-α	0.081	0.564

CRP: C-reactive protein; TNF-alpha: tumor necrosis factor alpha; FC: functional class; EF: ejection fraction; p, significance of correlation.

Farbtest, Boehringer Mannheim, Germany). Within-test coefficient of variation, less than 3.8%.

CRP levels were measured by nephelometry using a commercial method, N Latex CRP mono kit-immunonephelometry (Dade-Behring, Germany). Within-test coefficient of variation, less than 4.3%.

Serum TNF-α levels were measured by ELISA using a commercial kit (IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg). Within-test coefficient of variation, less than 4.2%.

2.5. Statistical analysis

The results are given as mean±standard deviation (SD) for continuous variables, and as percentages for categorical

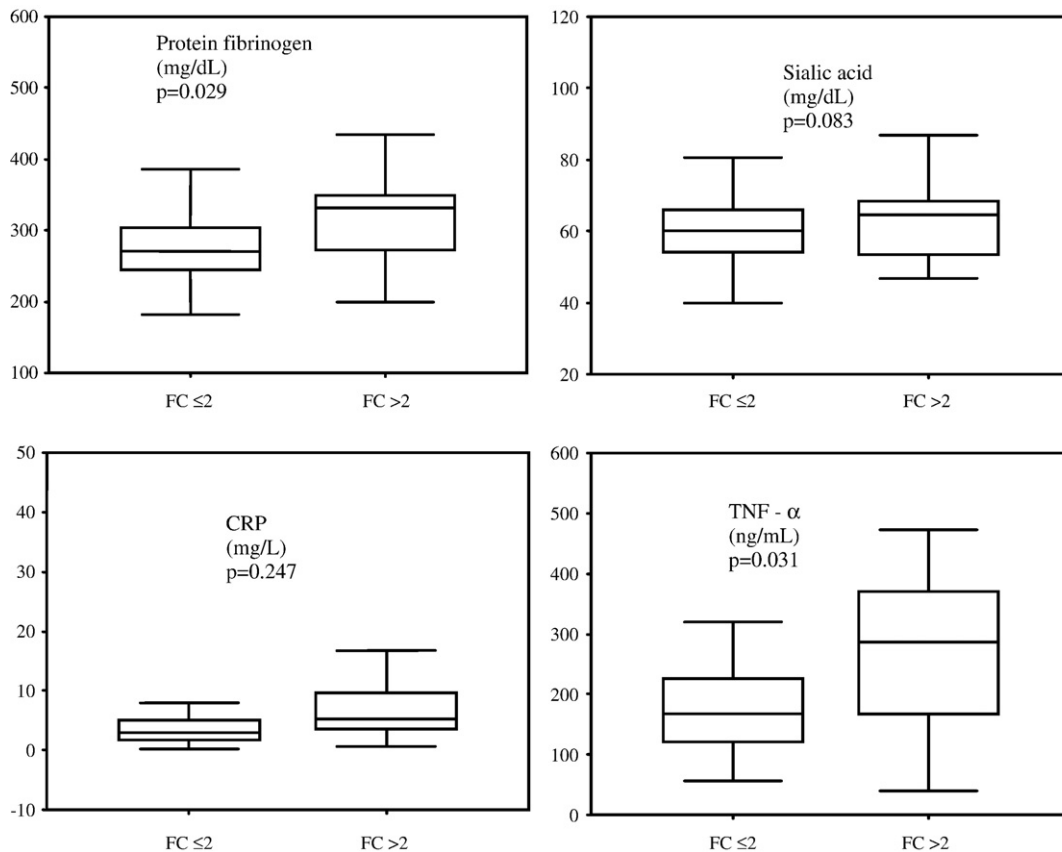


Fig. 1. Distribution and dispersion of fibrinogen, sialic acid, CRP, and TNF-alpha in HF patients grouped by functional class. Box plots show medians and their quartiles.

variables. Analysis of continuous variables across the different groups was carried out using an analysis of variance (ANOVA), and then with the Bonferroni test. Categorical variables were analyzed using a Chi-square test or a Fisher's exact test. Association of inflammatory markers to FC was analyzed using a logistic regression, while calculation of Pearson's bivariate correlation coefficients was used for EF. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All statistical tests were performed using software SPSS version 12.0 (Chicago, IL).

3. Results

3.1. Comparative analysis of baseline characteristics

Table 1 summarizes the clinical characteristics, biochemical parameters, and treatment of the study groups. Differences inherent to the presence of heart disease were seen in baseline characteristics of patients as compared to controls.

There were slight differences between the clinical profiles of patients when were grouped based on their etiological classification (Table 2). Thus, there was a greater prevalence of risk factors and treatment with beta-blockers, statins, and antiaggregants among patients with ischemic heart disease, and a greater use of allopurinol and diuretics among patients with iDMC, and anticoagulants in the miscellaneous group. No differences were seen in FC and EF (Table 3).

3.2. Inflammatory markers

A comparison of circulating levels of fibrinogen, CRP, sialic acid, and TNF- α between the patient and control groups showed higher levels of fibrinogen ($p = 0.0002$), sialic acid ($p = 0.0003$), and CRP ($p = 0.0001$) among patients. There were no significant differences in TNF- α levels.

When patients were grouped based on functional class (FC ≤ 2 and FC > 2), a symmetric distribution of circulating fibrinogen, CRP, sialic acid, and TNF- α levels was seen in both groups (Fig. 1). Higher median fibrinogen, CRP, sialic acid, and TNF- α levels were found in the FC > 2 as compared to the FC ≤ 2 patients. Patients with a poorer clinical condition therefore tend to have higher levels of inflammatory markers.

Table 5

Logistic regression showing correlation between inflammatory markers and FC

	OR	<i>p</i>	CI (95%)
Fibrinogen	1.018	0.026	1.002–1.036
Sialic acid	1.084	0.063	0.995–1.187
CRP	0.926	0.161	0.837–1.030
TNF- α	1.015	0.002	1.005–1.025

CRP: C-reactive protein; TNF-alpha: tumor necrosis factor alpha; FC: functional class; OR: odds ratio; *p*, significance of correlation. CI: confidence interval.

Table 6

Inflammatory markers

	Ischemic HD (<i>n</i> = 24)	iDMC (<i>n</i> = 24)	Miscellaneous (<i>n</i> = 11)	<i>p</i>
Fibrinogen (mg/dl)	290 ± 64	280 ± 64	333 ± 86	0.782
Sialic acid (mg/dl)	63 ± 15	61 ± 12	56 ± 11	0.286
CRP (mg/dl)	7 ± 15	7 ± 11	1 ± 14	0.925
TNF- α (ng/ml)	204 ± 124	199 ± 2	261 ± 105	0.839

Differences by HF etiology.

Ischemic HD: ischemic heart disease; iDCM: idiopathic dilated cardiomyopathy; CRP: C-reactive protein; TNF-alpha: tumor necrosis factor alpha; FC: functional class. Values are given as mean ± SD.

3.3. Correlation between inflammatory markers, ejection fraction, and functional class

No significant correlation was seen between inflammatory markers and ejection fraction (Table 4). By contrast, a slightly positive and statistically significant association was found of protein fibrinogen (OR: 1.018; $p = 0.026$) and TNF- α (OR: 1.015; $p = 0.002$) with functional class. Finally, sialic acid was associated to functional class (OR: 1.083), but the association did not reach statistical significance ($p = 0.063$) (Table 5).

3.4. Analysis by etiology of heart disease

When patients were divided based on the etiology of heart disease, no statistically significant differences were found between inflammatory marker levels and HF etiology (Table 6).

4. Discussion

As above stated, the inflammatory markers tested are increased in HF patients, their increases do not appear to depend on the cause of HF, and a correlation exists between FC and some inflammatory parameters, while such correlation is not seen for EF.

It should be noted that treatment of patients in our series followed clinical practice guidelines, particularly as regards use of drugs inhibiting the renin-angiotensin system. Percent use of recommended drugs was similar or higher as compared to that reported in similar studies [7].

HF patients had lower total and LDL cholesterol levels as compared to the control group. This is undoubtedly explained by the fact that a high proportion of patients were taking statins (42.2%), while healthy controls did not receive these drugs.

Hyperuricemia has been identified as a poor prognostic marker in HF patients regardless of diuretic use and kidney function [8], but no relationship to HF etiology has been established either. Our study demonstrated hyperuricemia to be much more common in the iDCM group, despite the fact that diuretic use was also greater in this same group. The proportion of patients treated with allopurinol is however very low, despite the fact that it has been suggested to

possibly have benefits by producing arterial vasodilation and decreasing free radicals after xanthine oxidase inhibition [9].

According to our results, marker increases are more related to the FC of patients than to their EF. Some previous studies [10–13] have already reported this clinical and analytical relationship to other inflammatory markers such as von Willebrand factor and TNF- α , but no protein fibrinogen.

Fibrinogen is a particularly helpful marker because it is both an indicator of inflammatory status and a determinant factor in thrombogenicity. Fibrinogen has been widely associated to ischemic heart disease [4,14], and patients with higher levels of this marker have a poorer prognosis. In large studies, fibrinogen has also been associated to a higher rate of embolic events in patients with atrial fibrillation, therefore identifying a subgroup of patients with an increased thrombogenicity [10,15,16]. Our analysis showed greater fibrinogen increases in the overall HF group (as an inflammation marker), but particularly in patients with HF of an ischemic and miscellaneous etiology. This latter data should be the result of the hypercoagulability status induced by the high prevalence of atrial fibrillation (valvular heart disease predominates in this subgroup), though some other additional factor should be involved, because such high fibrinogen levels are not found in iDCM, in which this arrhythmia occurs with a similar frequency. Increases in fibrinogen levels with FC lead to an increased procoagulant status that may partly explain the high rate of thrombotic events in patients in the most advanced stages.

Previous studies focusing on ischemic heart disease showed linear elevations of both plasma and myocardial sialic acid levels with disease severity [3,17]. In agreement with such studies, high sialic acid levels were also found in HF patients, though the underlying cause of HF was ischemic heart disease itself in most such patients. There are thus no studies showing that sialic acid levels are similarly increased in HF of a non-ischemic origin. Our results confirm that sialic acid levels tend to be higher in HF of an ischemic origin as compared to HF of any other etiology, but also that this marker is substantially increased in the other subgroups, particularly in the iDCM subgroup. However, statistical significance could not be reached in any of the comparisons because of the limited sample size.

CRP represents the model inflammatory marker, according to some working groups [18]. Moderate (3–10 mg/dl) and sustained increases in CRP levels are an unequivocal sign of activation of the inflammatory systems of the body [19]. Non-specificity of CRP is therefore higher as compared to other markers, and when analyzed in studies in which there is a great heterogeneity, its predictive value for cardiovascular events is substantially decreased [20]. According to the abovementioned working groups, our patients would be in the group with a high risk for experiencing cardiovascular events because they have CRP levels >3 mg/dl. The neuro-hormonal factor analyzed in our study was TNF- α . This marker has widely been related to ongoing inflammation states such as rheumatological diseases. While blockade of

this system has given favorable results in rheumatological diseases [21,22], antagonism has not had beneficial effects in HF [23]. This confirms that the immune system is redundant in HF. Based on its inflammatory characteristics, TNF- α has also been implicated in the pathogenesis of HF, and its levels have been related to patient status, as in our study [24,25]. Higher TNF- α levels were seen in the HF group. No statistical significance was reached because of the wide variability of this marker in the ischemic group. A novel finding was that more marked increases in TNF- α levels were seen among patients in the miscellaneous group, in whom a valvular etiology predominated.

As shown, it is obvious that inflammation plays a critical role in HF, but we may wonder whether such an effect is similarly important in all cases. An additional analysis showed that patients in the miscellaneous group (in which most HF's were of a valvular origin) tended to have lower sialic acid and CRP levels. Interestingly, and despite widespread use of anticoagulation in these patients, the benefits of anticoagulant therapy on thrombotic markers reported in some study were not seen [15]. The fact that this was the subgroup with more elevated fibrinogen levels may indeed be explained by the procoagulant tendency in these patients, due to a great extent to atrial fibrillation. We could therefore dare to say that inflammation plays a secondary role in these patients by virtue of more mechanical actions, such as continuous overload caused by valve regurgitation.

We think that this study may have significant clinical and economic implications. From the viewpoint of costs, sialic acid, one of the most useful proinflammatory factors, is the substance measured at a lower cost. On the other hand, once elevation of these markers is shown, a level could be found that served, if not as a tool for HF diagnosis, for prognostic evaluation of HF, as has occurred with natriuretic peptides.

The limited patient sample prevented some of the comparisons to reach statistical significance. Recruitment of patients for this study at an advanced heart failure outpatient clinic may have altered patient spectrum and percentage in each group as compared to standard clinical practice.

5. Conclusions

HF is a disease where inflammation plays an essential role. Our results suggest that etiology of HF does not appear to have a significant influence on the tested markers. The inflammatory process would be more closely related to clinical functional status of patients than to quantification of ventricular function.

References

- [1] Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005;96:3C–8C.
- [2] Anderson MR. *Prog Pediatr Cardiol* 2000;11:219–30.
- [3] Allain P, Olivier E, Le Bouil A, et al. Increase of sialic acid concentration in the plasma of patients with coronary disease. *Presse Med* 1996;25:96–8.

- [4] Coppola G, Rizzo M, Abrignani MG, et al. Fibrinogen as a predictor of mortality after acute myocardial infarction: a forty-two month follow-up study. *Ital Heart J* 2005;6:315–22.
- [5] Lang R, Bierig M, Devereux R, et al. 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 society of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440–63.
- [6] Reganon E, Martínez-Sales V, Vila V, et al. Relationship between fibrinogen protein and fibrinogen function in post-myocardial infarction patients. *Thromb Res* 2001;105:1–7.
- [7] Sola S, Mir M, Rajagopalan S, Helmy T, Tandom N, Khan R. Statin therapy is associated with improved cardiovascular outcomes and levels of inflammatory markers in patients with heart failure. *J Card Fail* 2005;11:607–12.
- [8] Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, et al. Uric acid and survival in chronic heart failure. *Circulation* 2003;107:1991–7.
- [9] Farquharson C, Butler R, Hill A, Belch J, Struthers A. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* 2002;106:221–6.
- [10] Lip G, Lip H, Pearce LA, Chin BSP, Conway DSG, Hart RG. Effects of congestive heart failure on plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin concentrations in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Heart* 2005;91:759–63.
- [11] Rodríguez-Reyna TS, Arrieta O, Castillo-Martínez L, et al. Tumor necrosis factor alpha and troponin T as a predictor of poor prognosis in patients with stable Heart failure. *Clin Invest Med* 2005;28:23–9.
- [12] Yin WH, Chen JW, Jen HL, et al. Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J* 2004;147:931–8.
- [13] Alonso-Martínez JL, Llorente-Diez B, Echegaray-Agara M, Olaz-Preciado F, Urbieto-Echezarreta M, Gonzalez-Arencibia C, et al. C-reactive protein as a predictor of improvement and readmission in heart failure. *Eur J heart Fail* 2002;4:331–6.
- [14] Arnau Vives MA, Rueda Soriano J, Martínez Dolz L, et al. Valor pronóstico del fibrinógeno en pacientes ingresados con sospecha de angina inestable o infarto de miocardio sin onda Q. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:622–30.
- [15] Cugno M, Mari D, Meroni PL, et al. Haemostatic and inflammatory biomarkers in advanced chronic heart failure: role of oral anticoagulants and successful heart transplantation. *Br J Haematol* 2004;126:85–92.
- [16] Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;294:1789–809.
- [17] Crook JR, Goldman JH, Dalziel M, et al. Increased ventricular sialylation in patients with heart failure secondary to ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 1997;20:455–8.
- [18] Smith S, Anderson J, Cannon R, et al. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;110:550–3.
- [19] Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for health care professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:449–511.
- [20] Best LG, Zhang Y, Lee ET, et al. C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in a population with a high prevalence of diabetes: the Strong Heart Study. *Circulation* 2005;112:1289–95.
- [21] Smolen JS, Han C, van der Heijde, et al. Infliximab treatment maintains employability in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:716–22.
- [22] Finckh A, Simard JF, Durvea J, et al. The effectiveness of anti-tumor necrosis factor therapy in preventing progressive radiographic joint damage in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2006;54:54–9.
- [23] Cheng ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Anti-TNF therapy against congestive heart failure. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003;107:3133–40.
- [24] Kosar F, Aksov Y, Ozguntekin G, Ozerol I, Varol E. Relationship between cytokines and tumor marker in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;8:270–4.
- [25] Herrera Garza H, Herrera Garza JL, Rodríguez González H, Treviño Treviño A, Ibarra Flores M, Torre Amione G. Importancia del factor de necrosis tumoral-alfa en la patogénesis de la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:61–6.

Artículo publicado fundamental 2

Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction Martínez-Sales V, Sánchez-Lázaro I, Vila V, Almenar L, Contreras T, Reganon E. Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Dis Markers*. 2011;31(2):75-82.

Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction¹

Vicenta Martínez-Sales^{a,*}, Ignacio Sánchez-Lázaro^{b,d}, Virtudes Vila^a, Luis Almenar^b, Teresa Contreras^c and Edelmiro Reganon^a

^aCentro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^bUnidad de Insuficiencia Cardíaca y Transplante, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^cServicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^dDepartment de Medicina de la Univesitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract. *Introduction and Aims:* Acute and chronic heart failure may manifest different degrees of endothelial damage and angiogenesis. Circulating endothelial cells (CEC) have been identified as marker of vascular damage. The aim of our study was to evaluate the evolution of the CEC at different stages of patients with heart failure. We also investigated a potential correlation between CEC and markers of vascular damage and angiogenesis.

Methods: We studied 32 heart failure patients at hospital admission (acute phase) and at revision after 3 months (stable phase) and 32 controls. Circulating markers of endothelial damage (CEC; von Willebrand factor, vWF and soluble E-selectin, sEsel) and angiogenesis (vascular endothelial growth factor, VEGF and thrombospondin-1) were quantified.

Results: Levels of CEC, vWF, sEsel and VEGF are significantly higher in heart failure patients than in controls. Levels of CEC (36.9 ± 15.3 vs. 21.5 ± 10.0 cells/ml; $p < 0.001$), vWF (325 ± 101 vs. $231 \pm 82\%$; $p < 0.001$) and VEGF (26.3 ± 15.2 vs. 21.9 ± 11.9 ng/ml; $p < 0.001$) are significantly higher in the acute phase than in the stable phase of heart failure. CEC levels correlate with vWF and VEGF. Results show that 100% of patients in acute phase and 37.5% in stable phase have levels of CEC higher than the 99th percentile of the distribution of controls (16 cells/ml). Therefore, increases in CEC represent a relative risk of 9.5 for heart failure patients suffering from acute phase.

Conclusions: CEC, in addition to being elevated in heart failure, correlate with vWF levels, providing further support for CEC as markers of endothelial damage. Levels of CEC are associated with the acute phase of heart failure and could be used as a marker of the worsening in heart failure.

Keywords: Heart failure, circulating endothelial cells, endothelial dysfunction, angiogenesis

1. Introduction

Endothelial abnormalities are typical in heart failure (HF) and represent one of the major physiopathological pathways implicated in the development and progression of HF. Circulating endothelial cells (CEC) are a noninvasive marker of vascular damage, remodelling and dysfunction [1–3]. Quantification of

CEC in peripheral blood is becoming a novel and reproducible method used to assess endothelial damage/dysfunction [4]. CEC represent mature endothelial cells that have become detached from the endothelial monolayer in response to endothelial injury. Thanks to a consensus definition of CEC and a standardized protocol for identifying these cells [5], good agreement now exists among laboratories with regard to normal CEC counts. Compared with the lower count observed in healthy subjects, increased CEC have been described in a wide spectrum of cardiovascular diseases, such as acute myocardial infarction, unstable angina and congestive HF, in which severe endothelial alterations are implicated [6–8]. Therefore, the increase in CEC reflects severe endothelial damage and the existence of denuded areas of the endothelium. Thus, determina-

*Corresponding author: Dr. V. Martínez-Sales, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009-Valencia, Spain. Tel.: +34 96 386 2797; Fax: +34 96 197 3018; E-mail: martinez_vicsal@gva.es.

¹This work is part of the doctoral thesis of Ignacio J. Sánchez Lázaro in the *Department de Medicina* (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain).

tion of CEC levels can serve as a tool to analyze the process of vascular damage/regeneration in HF.

Current well established markers of endothelial dysfunction are von Willebrand factor (vWF) [9] and soluble E-selectin (sEsel) [10]. Increased values of vWF and sEsel have been documented in HF [6,8,11,12] and some authors even consider sEsel a prognostic factor in acute HF [13–15].

Concentrations of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor (VEGF) and thrombospondin-1 (TSP-1) are increased and decreased, respectively, in chronic heart failure patients, which suggests a role of angiogenesis in the maintenance and repair of luminal endothelium in chronic HF [16]. It has been suggested that high levels of angiogenic factors in heart failure may play a role in the maintenance and repair of a perturbed or damaged endothelium through several different mechanisms [16–18].

The aim of our study was to evaluate the evolution of the CEC at different stages of patients with HF. We also investigated a potential correlation between the number of CEC and the circulating levels of established markers of vascular damage and angiogenesis.

2. Methods

2.1. Study design: Inclusion and exclusion criteria

Inclusion criteria were to be admitted for heart failure and to agree to complete a follow-up visit three months after discharge. Fifty-one patients consecutively admitted to the Cardiology Department of a reference hospital for HF were recruited. A clinical assessment, laboratory tests, electrocardiogram (ECG), echocardiography and coronary arteriography were performed in all patients. HF was defined according to the European Society of Cardiology Guidelines [14,19]. Patients were discharged with optimal medical therapy for their heart disease according to the European Guidelines for HF [14,19]. The follow-up period was three months \pm 5 days. At three months, an outpatient visit including laboratory tests, ECG and echocardiography was performed. Nine patients who had preserved ejection fraction, 3 patients who did not give written consent to participate and 7 patients who died (5 in hospital, 2 at home) before the 3-months follow-up visit at were excluded, as it was not possible to analyze the evolution of the study markers. The total number of patients included in the study after applying the exclusion criteria was 32.

The control group consisted of 32 healthy subjects, without cardiovascular risk factors, recruited among healthy hospital staff or healthy subjects who visited our hospital for medical checkups, age- and sex-matched to patients. All healthy controls had no history of cardiovascular disease, clinical evidence of vascular, metabolic or inflammatory disease and none was taking prescription medicines. The examination included a clinical examination, ECG and echocardiographic study. The study was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee and all participants gave their informed consent to take part on it.

2.2. Biomarkers analyzed and blood collection

Circulating markers of endothelial damage/activity (CEC, vWF and sEsel) and angiogenesis (VEGF and TSP-1) were tested. Venous blood samples were obtained from patients within 24 hours of hospital admission (acute phase) and at a 3-month revision (stable phase). The first 3 milliliters were discarded to avoid CEC damaged by the puncture. Blood for quantification of CEC was collected in a BD Vacutainer tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (1.8 mg/ml) and prepared for immunomagnetic separation within 1 hour. For vWF and sEsel determinations, blood was collected in a BD Vacutainer tube containing sodium citrate (129 mM) at a ratio of 1:9 (v/v, sodium citrate/blood). For VEGF and TSP-1 determinations, blood was collected in a dry BD Vacutainer tube. Samples were centrifuged at 1,500xg for 30 min at 4°C to obtain plasma or serum and then stored at -80°C to allow later batch analysis.

2.3. Biomarkers determination

The isolation and enumeration of CEC was performed by immunomagnetic isolation, following the definition and consensus protocol (5). CEC were isolated from whole blood at 4°C with Pan-Mouse M450 Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway) coated with s-Endo 1 (Biocytex, Marseille, France) a monoclonal antibody raised against the endothelial antigen CD-146. To avoid nonspecific binding of leukocytes to CD-146 coated beads, after immunomagnetic isolation, cells were incubated with lectin, FITC labeled, from *Ulex europaeus* UEA1 (Sigma-ALDRICH, Inc) for 1h in darkness. Thus we confirm the endothelial nature of the isolated cells. Samples were washed, suspended in buffer

and counted with fluorescence microscopy using a Naegotte chamber. A nucleated cell $> 10 \mu\text{m}$ in length, with more than five immunomagnetic beads attached and staining UEA-1 positive were regarded as CEC. Conglomerates were counted as one cell. The number of CEC was expressed as cells per milliliter of blood. Reproducibility was tested by performing six replicates of ten different samples. The coefficient of variation was 12%.

VWF antigen level was measured in a hemostatic testing system (ACLTop 700 CTS, Instrumentation Laboratory) using latex particles coated with a polyclonal antibody directed against vWF. The coefficient of variation was 7.5%.

Commercial ELISAs were used to determine sEsel (R&D Systems) and VEGF (Biosource) levels, showing a coefficient of variation of 6.5% and 4.9%, respectively.

TSP-1 was determined by indirect ELISA as previously described [20]. The coefficient of variation was 4.8%.

2.4. Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate whether each parameter came from a normal distribution. Statistical comparisons were performed using the t-test, analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-hoc. Bivariate correlation was performed using the Spearman rank correlation test. Measures of association for categorical variables with the Pearson Chi-Square test with Yate's correction was performed to estimate relative risk of independent variables dichotomized as values greater than 99% confidence interval of CEC (16 cells/ml) and 95% confidence interval of vWF (174%), sEsel (27 ng/ml), VEGF (245 pg/ml), TSP-1 (64 $\mu\text{g/ml}$) of distribution in healthy controls. Multiple regression analysis was performed to study the relations among CEC levels and clinical variables (dyslipidemia, arterial hypertension, diabetes mellitus and smoker) in admission HF patients. Values of $p \leq 0.05$ were regarded as statistically significant. All statistical calculations were performed using SPSS 11.5® (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA) computer software.

3. Results

The clinical characteristics, biochemical parameters and treatment of the study group are shown in Table 1,

Table 1
Clinical characteristics, biochemical parameters and treatment of 32 acute heart failure patients and 32 healthy controls

	Acute HF	Healthy controls
Age (years)	68 \pm 10	65 \pm 14
Sex (Male)	23	22
Etiology		
Ischemic	9	NA
IDCM	8	NA
Valvular	5	NA
Other	10	NA
Sinus rhythm*	19	32
Creatinine (mg/ml)*	1.47 \pm 0.61	0.94 \pm 0.15
B-type natriuretic peptide (pg/ml)*	376 \pm 297	7.7 \pm 4.8
EF < 40%*	32	0
Diabetes mellitus*	9	0
HT*	21	0
Dyslipidemia*	15	0
Smoker*		
Yes	4	2
No	14	4
Ex-smoker	10	6
BMI (kg/m ²)*	27 \pm 5	24 \pm 2
Aspirin	11	NA
Clopidogrel	4	NA
Acenocoumarol	12	NA
Beta-blocker	16	NA
ACEI	15	NA
AIIRA	4	NA
Statins	12	NA
Diuretics	28	NA
Antialdosterones	15	NA
Digoxin	5	NA
Amiodarone	3	NA

Data are expressed as mean \pm SD or as number of patients unless stated. * $p < 0.05$. ACEI: Angiotensin-converting enzyme inhibitors; AIIRA: Angiotensin II receptor antagonists; BMI: body mass index; BNP: B-type natriuretic peptide; EF: Ejection fraction; HF: Heart failure; HT: Systemic hypertension; IDCM: Idiopathic dilated cardiomyopathy; NA: Not applicable.

and levels of CEC and other analyzed markers, both in acute and stable phases and in controls, are shown in Table 2. Patient's hospitalization was always caused by HF in any of their chances (volume overload, pulmonary edema, dyspnea with minimal effort) and never by ischemic or arrhythmic causes. Patients were treated according to clinical practice guidelines. There were no changes in the patient's treatments for discharge to the three months follow-up. When comparing the levels of CEC, vWF, sEsel, TSP-1 and VEGF, among the smoker/non-smoker groups of acute HF patients, no significant differences were observed. A multiple regression analysis was performed in order to assess the influence of diabetes, hypertension and dyslipidemia in

Table 2

Circulating levels of endothelial dysfunction and angiogenesis markers in 32 heart failure patients determined at acute phase (hospital admission) and stable phase (after 3 months) and in 32 healthy controls

	Acute HF	Stable HF	Controls	p1	p2	p3
<i>Endothelial markers</i>						
CECs (cells/ml)	36.9 ± 15.3	21.5 ± 10.0	8.6 ± 5.2	< 0.001	< 0.001	< 0.001
vWF:Ag (%)	325 ± 101	231 ± 82	122 ± 27	< 0.001	< 0.001	< 0.001
sEsel (ng/ml)	26.3 ± 15.2	21.9 ± 11.9	17.1 ± 6.4	0.3	< 0.01	< 0.05
<i>Angiogenesis markers</i>						
VEGF (pg/ml)	411 ± 312	259 ± 226	143 ± 64	< 0.05	< 0.001	< 0.05
TSP-1 (μg/ml)	57.8 ± 19.1	49.4 ± 15.3	47.1 ± 9.6	0.5	< 0.05	0.8

Results are expressed as mean ± SD. CECs: circulating endothelial cells; HF: heart failure; sEsel: soluble E-selectin; TSP-1: thrombospondin-1; VEGF: vascular endothelial growth factor; vWF: von Willebrand factor; p1: Acute HF vs. Stable HF; p2: Acute HF vs. Control; p3: Stable HF vs. Control.

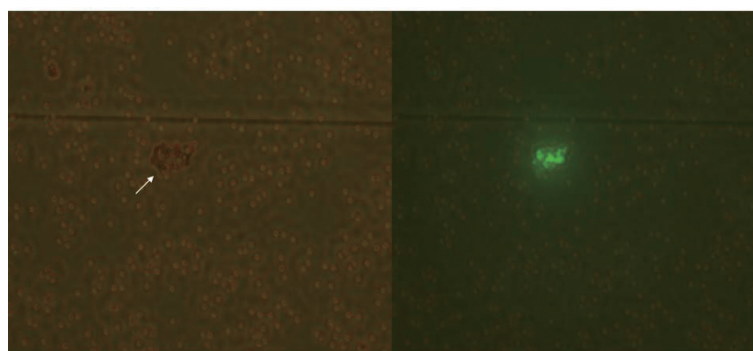


Fig. 1. A circulating endothelial cell, forming a rosette of 10 μm in length with more than six immunomagnetic beads (left), and staining bright green with Ulex Europaeus lectin (right). Photomicrograph in epifluorescence (Leica), wet preparation. For scale, the large numbers of residual immunomagnetic beads each have a diameter of 4.5 μm.

CEC level in admission HF patients. The results show no statistically significant correlation between these variables (coefficient of multiple correlations: 0.33, signification: 0.69 and a coefficient of determination: 0.106).

Figure 1 shows a typical, single CEC from a patient with HF; CD146-based immunomagnetic isolation with subsequent UEA-1 stain. None stained for the leukocyte-common antigen CD45. The distribution of the values of CEC in the three study groups is shown in Fig. 2. For HF patients, median and (interquartile range) CEC levels were 35 (25–43) cells/ml at hospital admission and 20 (16–22) cells/ml at stable phase, while healthy controls showed 6 (4–12) cells/ml. CEC counts in peripheral blood were significantly higher in HF patients both at acute and at stable phase than in controls ($p < 0.001$).

Table 2 summarizes the mean of circulating levels of endothelial dysfunction and angiogenesis markers determined in patients with acute and stable HF and in controls. Patients showed higher vWF levels in both at acute ($p < 0.001$) and at the stable phase ($p < 0.001$) than in controls. When comparing the two phases of

HF patients, significantly higher levels of vWF were found in patients at acute phase ($p < 0.001$). sEsel levels were significantly increased in the patients, at acute phase ($p < 0.01$) as well as at stable phase ($p < 0.05$) when compared to healthy controls. VEGF levels were raised in patients at acute phase compared to the levels at the stable phase ($p < 0.05$). Moreover, VEGF levels were significantly increased in acute and stable HF ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) as compared with controls. Levels of TSP-1 increased significantly in patients, only in the acute phase ($p < 0.05$) (Table 2).

Figure 3 shows temporal changes analysis in levels of CEC, sEsel, vWF, VEGF and TSP-1 in HF patients. Results represent the percentage of patients with CEC levels higher than the 99th percentile of the distribution of healthy controls as the top cutoff point of the normal range (CEC level above 16 cells/ml) and levels higher than the 95th percentile for vWF (level above 174%), sEse (level above 27 ng/ml), VEGF (level above 245 pg/ml) and TSP-1 (level above 64 μg/ml).

The study of the association of patient groups with levels of CEC dichotomized as greater than 16 cells/, shows that all acute HF patients (100%) have high num-

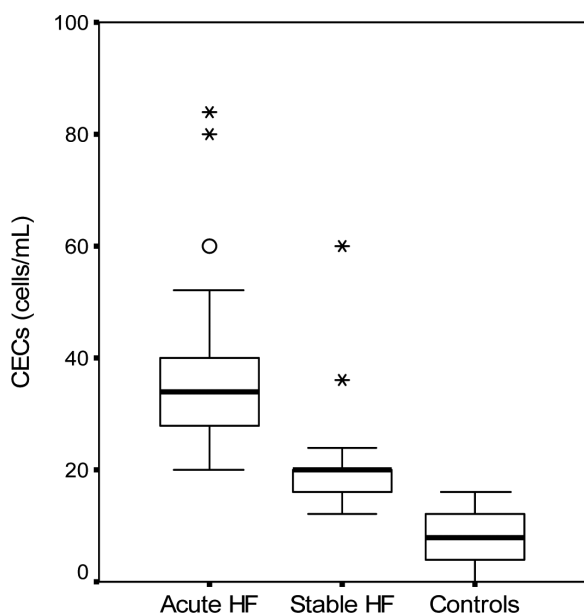


Fig. 2. Distribution of circulating endothelial cells in 32 heart failure patients at acute (hospital admission) and at stable phase (3-month revision) and in 32 healthy controls. Bloxplot showing median (line), interquartile range (boxes), 5% to 95% percentile (whiskers), and outliers (dot) and extremes (stars) cell levels. CECs: Circulating endothelial cells; HF: Heart failure.

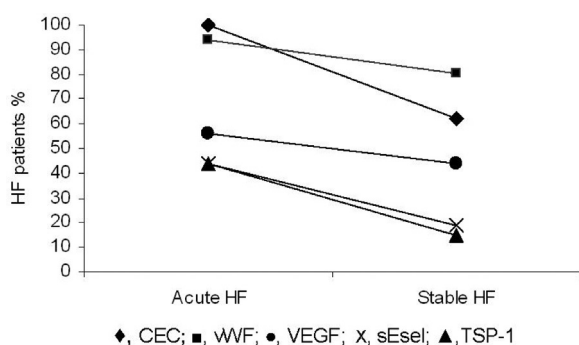


Fig. 3. Circulating endothelial cells, soluble E-selectin, von Willebrand factor, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 levels at acute and at stable phase in HF patients. Data represent the percentage of patients with marker levels higher than the 99% confidence interval of distribution in healthy controls (CECs) and 95% confidence interval of distribution in healthy controls (sEsel, TSP-1, VEGF and vWF). CECs: Circulating endothelial cells; HF: Heart failure; sEsel: Soluble E-selectin; TSP-1: Thrombospondin-1; VEGF: vascular endothelial growth factor; vWF: von Willebrand factor.

ber of CEC (Chi-square = 32.20, $p < 0.0001$ and a relative risk = 3.625, 95% confidence interval: 2.01 to 6.54) and 12 of 32 patients (37,5%) in stable group (Chi-square = 23.01, $p < 0.0001$ and a relative risk = 0.38, 95% confidence interval: 0.22 to 0.66). By nor-

malizing the value of the RR in the acute to the value in patients with stable HF, it has been possible to establish that the risk of having the highest number of CEC in the acute phase is 9.5 times higher than in the stable phase of the disease.

The cutoff point of the normal range (95th percentile) was exceeded by a large number of acute heart failure (vWF: 30 patients) and stable HF patients (vWF: 26 patients), while levels of sEsel (acute: 14 patients; stable HF: 5 patients), VEGF (acute: 18 patients; stable HF: 14 patients) and TSP-1 (acute: 14 patients; stable HF: 6 patients) were exceeded only by a small number of patients. The probability of heart failure patients having sEsel, vWF, VEGF and TSP-1 levels above the cutoff point against controls was significant for vWF ($p < 0.001$, RR = 5.94; 95% Confidence Interval: 2.84 to 12.4), and VEGF ($p < 0.01$, relative risk = 2.33; 95% confidence Interval: 1.55 to 3.51).

In the whole study group, CEC correlated well with vWF (Spearman $r = 0.678$, $p < 0.001$) and modestly with VEGF ($r = 0.39$, $p < 0.01$). Levels of vWF and TSP-1 were modestly correlated ($r = 0.269$, $p = 0.05$).

4. Discussion

The results obtained in this study show that patients admitted for acute HF have elevated CEC levels that decrease 3-month after hospital discharge, but without reaching the values of healthy subjects. CEC are a novel marker of endothelial damage, and their concentration correlates with other markers of endothelial function (vWF) and angiogenesis (VEGF). These data reflect a continued endothelial activation through endothelial damage and endothelial maintenance and repair of luminal endothelium.

Patient recruitment as well as sample collection was done within the first 24 hours of hospital admission, to coincide with the acute phase of disease [13]. Evaluation at three months after discharge was done arbitrarily, since neither the clinical practice guidelines nor the scientific literature establish a temporal criterion to distinguish between the two phases of HF [13,15,21,22]. Levels in our study are also higher than those published in HF patients without hospital admissions for at least six months, so we think that more than three months are needed to stabilize the inflammatory state [16,23]. This study is consistent with previous observations on raised CEC in patients with acute and/or stable HF as compared with healthy controls [6,8]. Our study also showed that acute HF was associated with high

numbers of CEC, which significantly decreased after 3 months of treatment. This decrease was associated with the clinical improvement of the studied patients. These results do not coincide with those of Chong et al. [6], who reported that number of CEC increased in both patients groups, but with no significant difference between them. This discrepancy could be due to the fact that our patients enter the study in the acute phase and follow-up has been performed until their stabilization; while Chong et al. [6] studied two different patient groups, one with acute HF and other with chronic HF. In addition, highest levels of CEC in our study may differ from those of Chong et al. [6] because of the different techniques used to quantify CEC.

CEC are cells from the vascular endothelium that have become detached in response to damage. As shown by Makin et al. [7] in acute myocardial infarction and Chong et al. [6] in HF, our study revealed that CEC, in addition to being elevated in HF, were positively correlated with vWF levels. This latter finding provides further support for CEC as early markers of endothelial damage [6,13,24]. CEC reflect an impairment in vasodilation produced by an endothelial denudation in HF, while in pulmonary hypertension the CEC levels reflect an endothelial proliferation. Recent studies have shown that the effect of clopidogrel after a stent placement could decrease the levels of CEC [25]. In our study only few patients were treated with clopidogrel, so we think that this fact didn't affect our results. As an addition to the studies conducted in HF, our study is the first to draw these conclusions in the same population of patients at different phases of the disease.

Studies have found that vWF is a suitable marker of endothelial dysfunction, increased levels being found in inflammatory and atherosclerotic vascular diseases [9]. HF is associated with impaired endothelium, which contributes to the peripheral vasoconstriction that is characteristic of HF [17], and high levels of vWF are associated with HF [6,8,16,26,27]. Our data showed that CEC were strongly correlated with vWF ($p < 0.001$) so the correlation between CEC and vWF reveals the presence of endothelial damage in these patients.

Although more weakly, E-selectin [12] is elevated in HF patients and some authors even consider it a prognostic factor in acute heart failure [13–15]. E-selectin promotes adherence of leukocytes to vascular endothelium, facilitates its permeability and acts as a chemotactic factor. Consequently, it plays a key role in maintenance of inflammation in HF. This role may be modified by drugs such as statins [28], which may

explain why the differences between the two phases of HF in our study were smaller than with other markers.

Analysis of the angiogenesis parameter in our patients showed that HF leads to progression of the angiogenesis response with high levels of VEGF. High levels of angiogenic factors in HF may play a role in the maintenance and repair of a damaged endothelium through different mechanisms [16–18]. VEGF is one the growth factors implicated in angiogenesis. The myocardial ischemia occurring in HF promotes the release of VEGF, especially in phases of decompensation. In spite of this, the role of VEGF in HF is unclear; as there is insufficient evidence that true angiogenesis occurs in HF. Thus, elevated VEGF levels may only reflect the process of vascular repair, which would also explain the biphasic nature (raised in acute heart failure but diminished in very late phases of the disease) observed in some studies [16,17,29]. Our results would support the theory that VEGF is increased as a result of the need for endothelial repair, since we observed a significant correlation with CEC, which would indicate the presence of endothelial damage.

Regarding the study limitations and despite the fact that the sample enabled us to draw novel and important conclusions, a larger number of patients would have allowed us to explore other relationships, such as the possible influence of drugs the different markers and different etiologies. Another limitation is the potential effect of oral anticoagulant treatment on the study parameters. When comparing our data with those of other studies, it should not be forgotten that our hospital is a tertiary care facility. This means that patients diagnosed with HF are received by other departments in the hospital (Short Stay Unit, Internal Medicine), and only those with more severe illness (from which the study patients were recruited) are referred to the Cardiology Department.

5. Conclusions

Our study revealed that CEC, in addition to being elevated in HF, were positively correlated with vWF levels, providing further support for CEC as marker of endothelial damage. Levels of CEC are associated with the acute phase of HF patients. This way the levels of CEC could be use as a marker of worsening in HF, although these conclusions should be confirmed by larger studies.

Finally, we want to point out that this study is the first to draw these conclusions in the same population of patients at different phases of the disease.

Acknowledgments

The authors wish to thank Josefa Llorés Alegre, Ursula Salinas and Daniel Hernandez for their expert technical assistance.

We also thank Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (RETICS: REDINSCOR grant RD06/0003/1001, RECAVA grant RD06/0014/0004 and RENEVAS grant RD06/0026/0006).

This study is part of the doctoral thesis of Ignacio Sánchez-Lázaro in the Universitat Autònoma de Barcelona (Departament de Medicina Interna).

This work was supported in part by research grants from Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, FIS PI08124; Generalitat Valenciana, Conselleria Sanitat, AP037/07 and Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante de la Sociedad Española de Cardiología, 2009.

References

- [1] J. Quilici, N. Banzet, P. Paule, J.B. Meynard, M. Mutin, J.L. Bonnet et al., Circulating endothelial cells count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes, *Circulation* **110** (2004), 1586–1591.
- [2] A. Widman, F. Sabatier, L. Arnaud, L. Bonello, G. Al-Massarani, F. Paganelli et al., CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells, *J Thromb Haemost* **6** (2008), 869–876.
- [3] P. Mancuso, A. Burlini, G. Pruneri, A. Goldhirsch, G. Martinelli and F. Bertolini, Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients, *Blood* **97** (2001), 3658–3661.
- [4] A.D. Blann, A. Woywodt, F. Bertolini, T.M. Bull, J.P. Buyon, R.M. Clancy et al., Circulating endothelial cells. Biomarkers of vascular diseases, *Thromb Haemost* **93** (2005), 228–235.
- [5] A. Woywodt, A.D. Blann, T. Kirsch, U. Erdbruegger, N. Banzet, M. Haubitz et al., Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol, *J Thromb Haemost* **4** (2006), 671–677.
- [6] A.Y. Chong, G.Y. Lip, B. Freestone and A.D. Blann, Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: Comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin, *Eur J Heart Fail* **8** (2006), 167–172.
- [7] A.J. Makin, A.D. Blann, N.A. Chung, S.H. Silverman and G.Y. Lip, Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor, *Eur Heart J* **25** (2004), 371–376.
- [8] A.Y. Chong, A.D. Blann, J. Patel, B. Freestone, E. Hughes and G.Y. Lip, Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide, *Circulation* **110** (2004), 1794–1798.
- [9] A.D. Blann, Plasma von Willebrand factor, thrombosis and the endothelium: the first 30 years, *Thromb Haemost* **95** (2006), 49–55.
- [10] B. Freestone, A.Y. Chong, Blann and G.Y. Lip, The effects of direct current cardioversion for persistent atrial fibrillation on indices of endothelial damage/dysfunction, *Thrombosis Res* **118** (2006), 479–485.
- [11] V. Vila, V. Martínez-Sales, L. Almenar, I. Sánchez Lázaro, P. Villa and E. Reganon, Effect of oral anticoagulant therapy on thrombospondin-1 and von Willebrand factor in patients with stable heart failure, *Thromb Res* **121** (2008), 611–615.
- [12] A.D. Blann and A. Pretorius, Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: two sides of the same coin, or two different coins? *Atherosclerosis* **188** (2006), 12–18.
- [13] A.Y. Chong, B. Freestone, J. Patel, H.S. Lim, E. Hughes, A.D. Blann et al., Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes, *Am J Cardiol* **97** (2006), 671–675.
- [14] European Society of Cardiology, Heart Failure Association of the ESC (HFA), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), K. Dickstein, A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J.J. McMurray, P. Ponikowski, P.A. Poole-Wilson et al., ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), *Eur J Heart Fail* **10** (2008), 933–989.
- [15] C. Gürgün, M. Ildizli, O. Yavuzgil, A. Sin, A. Apaydin, C. Cinar et al., The effects of short term statin treatment on left ventricular function and inflammatory markers in patients with chronic heart failure, *Int J Cardiol* **123** (2008), 102–107.
- [16] V. Vila, V. Martínez-Sales, L. Almenar, I. Sánchez Lázaro, P. Villa and E. Reganon, Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients, *Int J Cardiol* **130** (2008), 276–277.
- [17] G.Y. Lip and I. Chung, Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in heart failure, *J Card Fail* **11** (2005), 285–287.
- [18] M. Hristov and C. Weber, Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability, *Curr Opin Lipidol* **19** (2008), 491–497.
- [19] Task Force for Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of European Society of Cardiology, K. Dickstein, A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J.J. McMurray, P. Ponikowski, P.A. Poole-Wilson et al., ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), *Eur Heart J* **29** (2008), 2388–442.
- [20] V. Martínez-Sales, V. Vila, M. Ferrando and E. Reganon, Atorvastatin neutralizes the up regulation of thrombospondin-1 induced by thrombin in human umbilical vein endothelial cells, *Endothelium* **14** (2007), 233–238.
- [21] European Society of Cardiology; Heart Failure Association of the ESC (HFA), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), K. Dickstein, A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J.J. McMurray, P. Ponikowski, P.A. Poole-Wilson et al., ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008, *Eur Heart J* **29** (2008), 2388–2442.

- [22] G. Balconi, R. Lehmann, F. Fiordaliso, B. Assmus, S. Dimmeler, P. Sarto et al., Levels of circulating pro-angiogenic cells predict cardiovascular outcomes in patients with chronic Heart Failure, *J Card Fail* **15** (2009), 747–755.
- [23] I.J. Sánchez-Lázaro, L. Almenar, E. Reganon, V. Vila, L. Martínez-Dolz, V. Martínez-Sales et al., Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class, *Int J Cardiol* **129** (2008), 388–393.
- [24] U. Erdbruegger, M. Haubitz and A. Woywodt, Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage, *Clin Chim Acta* **373** (2006), 17–26.
- [25] L. Bonello, K. Harhour, F. Sabatier, L. Camoin-Jau, L. Arnaud, K. Baumstarck-Barrau et al., Level of Adenosine Diphosphate Receptor P2Y₁₂ Blockade During Percutaneous Coronary Intervention Predicts the Extent of Endothelial Injury, Assessed by Circulating Endothelial Cell Measurement *J Am Coll Cardiol* **56** (2010), 1024–1031.
- [26] U.M. Vischer, Von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease, *J Thromb Haemost* **4** (2006), 1186–1193.
- [27] L. Martínez-Dolz, L. Almenar, E. Reganon, V. Vila, C. Chamorro, L. Andrés et al., Follow-up study on the utility of von Willebrand factor levels in the diagnosis of cardiac allograft vasculopathy, *J Heart Lung Transplant* **27** (2008), 760–766.
- [28] K.A. Eccles, H. Sowden, K.E. Porter, S.M. Parkin, S. Homer-Vanniasinkam and A.M. Graham, Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow, *Atherosclerosis* **200** (2008), 69–79.
- [29] M. Valgimigli, G.M. Rigolin, A. Fucili, M.D. Porta, O. Soukhomovskaia, P. Malagutti et al., CD34₊ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure, *Circulation* **110** (2004), 1209–1212.

Artículo publicado fundamental 3

Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure? Sánchez-Lázaro IJ, Almenar-Bonet L, Reganon-Salvador E, Vila-Liante V, Martínez-Sales V, Martínez-Dolz L, Agüero-Ramón-Llin J, Salvador-Sanz A. Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure? *Heart Int.* 2011;6(2):e17.



Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure?

Ignacio J. Sánchez-Lázaro,^{1,2} Luis Almenar-Bonet,¹ Edelmiro Reganon-Salvador,³ Virtudes Vila-Liante,³ Vicenta Martínez-Sales,³ Luis Martínez-Dolz,¹ Jaime Agüero-Ramón-Llin,¹ Antonio Salvador-Sanz¹

¹Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ²Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; ³Research Center, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

Abstract

This study aimed to determine if there are differences in inflammatory markers in the acute phase between systolic heart failure and heart failure with preserved systolic function. One hundred and thirty-one patients with acute heart failure were recruited consecutively. At admission, plasma fibrinogen, C-reactive protein, sialic acid, von Willebrand factor, vascular endothelial growth factor, interleukin-6 and NTproBNP were all evaluated. If the ejection fraction was 45% or over

patients were included in the HF-PSF group; the remaining patients were included in the SHF group. The HF-PSF patients were older (72 ± 10 vs 63 ± 12 years, $P<0.001$), presented a higher rate of atrial fibrillation (56.1 vs 21.3% , $P<0.001$), and had a lower rate of hemoglobin (12.2 ± 2 vs 13.3 ± 2.1 g/dL, $P<0.01$). No significant differences were observed in the inflammation markers analyzed among SHF and HF-PSF groups. In the acute phase of heart failure there is a marked elevation of inflammatory markers but there are no differences in the inflammatory markers analyzed between the two different types of heart failure.

the persistence of the disease. Certain inflammatory markers (IM) of a prognostic value have been identified. Some of them have even been shown to have a clinical use,^{6,7} like brain natriuretic peptide (BNP) and its non-active aminoterminal fragment NTproBNP. On the other hand, there have been very few studies of inflammatory status in HF-PSF patients.⁸

HF studies generally tend to cover only one type of HF; very few have covered both. As a result, only a few studies have compared SHF with HF-PSF, and even fewer studies have been concerned with research into inflammation. To date, there has been only one article comparing several IM in stable patients in terms of HF type.⁸

The objective of this study was to assess the levels of specific IM in patients who had been diagnosed with acute HF while hospitalized according to the type of HF presented (SHF vs HF-PSF).

Introduction

Heart failure (HF) is currently one of the most prevalent diseases and it inflicts a considerable economic burden on the health care system.¹ Until a few years ago, attention was only paid to HF with depressed systolic function (SHF). It was not until quite recently that an interest in HF with preserved systolic function (HF-PSF) has been shown.² Despite the fact that HF-PSF represents 50% of the population with HF,^{3,4} few specific studies have been conducted in clinical, prognostic, and treatment terms. This implies assuming that what we know about SHF applies to HF-PSF. Nonetheless, there are some studies which prove that the two types of HF differ. Thanks to a number of studies, an improved prognosis in SHF has been observed in recent years, while there has been no such improvement in the field of HF-PSF given the lack of specific studies. Inflammation has generally been shown to play a key role in HF, particularly in SHF.⁵ In these patients, an increased inflammation status occurs in the stable phase of the disease. This increases in the decompensation periods. This inflammation contributes not only to the central and peripheral manifestations of the disease, but also to

Materials and Methods

Study population

From September 2006 to November 2007, 155 patients diagnosed with acute HF and admitted to the Cardiology Unit were consecutively enrolled. HF diagnosis was made according to the patients' signs and symptoms and to the Framingham criteria.⁹ All the patients had a functional NYHA class of III or over. HF etiology was based on medical records and on the results of complementary tests. Patients who had been previously hospitalized, had undergone coronary/heart surgery three months prior to being admitted to the Cardiology Unit, or had not signed the informed consent, were excluded from the study. A total number of 131 patients went forward for analysis (SHF n=62, HFPSF n=69).

This study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. It was also approved by the Biomedical Research Ethics

Correspondence: Ignacio J. Sánchez-Lázaro, Avda. Ausias March 2, esc. 2, pta. 15, 46111, Rocafort, Valencia, Spain.
Tel. +34.629821756 - Fax: +34.961973314.
E-mail: ignaciosanchezlazaro@gmail.com

Key words: heart failure, inflammation

Funding: this work was supported in part by grants from Consellería Sanitat GVA: AP037/07, research grants from Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Instituto de Salud Carlos III: FIS PI08124, and Fundación Mutua Madrileña.

Conflict of interest: the authors report no conflicts of interest.

This article is part of the doctoral thesis of Ignacio J. Sánchez Lázaro in the Medicine Department of the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Received for publication: 7 May 2011.
Revision received: 25 August 2011.
Accepted for publication: 7 October 2011

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright I.J. Sánchez-Lázaro et al., 2011
Licensee PAGEPress, Italy
Heart International 2011; 6:e17
doi:10.4081/hi.2011.e17

Committee at the University La Fe Hospital. All the patients gave their written informed consent to participate in this study.

Variables and complementary tests

High blood pressure, dyslipidemia and diabetes were considered when patients were prescribed drugs to control these risk factors.

An electrocardiogram was performed for all patients upon arrival. An echocardiography was performed within 48 h of hospital admission to rule out transient systolic dysfunction. The equipment used was an HP Sonos 5500® with a 2.5 MHz probe (Philips, Eindhoven, The Netherlands). All the readings, including the ejection fraction (EF), were taken according to the recommendations of the American Society of Echocardiography.¹⁰ If the EF was below 45%, the patient was included in the SHF group, while the remaining patients were included in the HF-PSF group. Coronary catheterization was performed in those patients who had not previously undergone the procedure, or who had had this performed more than one year before.

Markers and biochemical determinations

In an attempt to minimize the influence of the treatment, blood samples were obtained from all patients within 24 h of hospital admission. IM included were: plasma fibrinogen (PF), C-reactive protein (CRP), sialic acid (SA), von Willebrand factor (vWF), vascular endothelial growth factor VEGF, interleukin-6 (IL-6), and NTproBNP. PF levels were obtained by measuring the plasma fibrin formation rate by a turbidity assay. The coefficient of variation was 8%. CRP plasma levels were measured by nephelometry using a commercial high sensitivity assay (Dade-Behring, Germany). The coefficient of variation was 4.3%. Total SA plasma levels were measured using a commercial enzymatic-colorimetric method (Sialic acid Farbtest, Boehringer Mannheim, Germany). The coefficient of variation was 3.6%. As an endothelial dysfunction marker, vWF antigen levels were measured in an ACL-TOP (3G) (Instrumentation Laboratory) using latex particles coated with a polyclonal antibody directed against vWF. The coefficient of variation was 7.5%. As well as the angiogenesis markers, total serum levels of VEGF were determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (VEGF Biosource International). The coefficient of variation was 4.9%. IL-6 serum levels were determined by ELISA method (High Sensitivity Human IL-6 ELISA kit, Diaclone). The coefficient of variation was 3.6%. NT-proBNP was measured by electrochemiluminescence immunoassays in an Elecsys® 2010 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Statistical analysis

The continuous variables were expressed as mean ± standard deviation. Student's t-test was used to analyze the quantitative variables, while the χ^2 test was performed to analyze the qualitative variables. Pearson's correlation was performed for correlations. The normality of IM was verified by the Kolmogorov-Smirnov test and the Mann-Whitney U-test. The statistical package used was SPSS®, v. 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill, USA).

Results

Baseline characteristics

Patients' baseline characteristics and treatments are shown in Tables 1 and 2, respectively. SHF patients were significantly older (72±10 vs 63±12 years, P<0.001). The HF-PSF group included more non-smokers (73.9 vs 38.7%, P<0.001), and patients presented a higher rate of atrial fibrillation (56.1 vs 21.3%, P<0.001). Among the etiologies, valvular (46.4 vs 11.5%, P<0.001) and hypertensive etiologies (20.3 vs 8.2%, P<0.001) were more frequent in

HF-PSF patients, while ischemic (39.2 vs 20.3%, P<0.001) and idiopathic dilated cardiomyopathy etiologies (26.2 vs 1.4%, P<0.001) were more frequent in SHF patients. EF was lower in the SHF group (28±9 vs 57±4%, P<0.001) and the end diastolic diameter was higher (63±9 vs 49±7 mm, P<0.001). Differences in patients' basal treatment were related to their basic pathologies; nonetheless, acetylsalicylic acid was the most frequent treatment in the SHF group (46.6 vs 28.4%; P<0.05), and anticoagulants (24.1 vs 44.8%; P<0.05) and calcium antagonists (15.5 vs 34.3%; P<0.05) were the most frequent treatment in the HF-PSF group.

Of the general analytical data (Table 1), only hemoglobin was significantly lower in the HF-PSF patient group (12.2±2 vs 13.3±2.1 g/dL, P<0.01). No differences were found in the remaining ordinary analytical values, including the Quick Index or creatinine.

Inflammatory markers

No significant inter-group differences were found in the IM analyzed (Table 3); only a high VEGF tendency was found among the SHF patients (424±323 vs 337±263 pg/mL, P<0.1). We performed an analysis between the

Table 1. Basal characteristics.

Total HF (n=131)	SHF (n=62)	HF-PSF (n=69)	
Sex male (%)*	59	77	42
Age (years)*	68±11	63±12	72±10
AHT (%)	72.5	72.6	72.5
Dyslipidemia (%)*	48.9	58.1	40.6
Diabetes (%)	37.4	40.3	34.8
Smoking (%)*			
Yes	6.8	9.7	4.3
No	56.8	38.7	73.9
Ex	36.4	51.6	21.7
Permanent AF (%)**	40	21.3	56.5
Etiology (%)*			
Ischemic	29.2	39.3	-20.3
IDCM	13.1	26.2	-1.4
Valvular	30.0	11.5	-46.4
AHT	14.6	8.2	-20.3
Other	13.1	14.9	-1.6
EF (%)**	43±16	28±9	57±4
EDD (mm)**	56±10	63±9	49±7
PsAP (mmHg)	44±18	44±16	45±19
Glucose (mg/dL)	114±41	112±47	115±36
Creatinine (mg/dL)	1.34±0.51	1.38±0.55	1.31±0.48
Total cholesterol (mg/dL)	169±44	168±43	170±45
Total proteins (mg/dL)	6.7±0.8	6.7±0.9	6.7±0.6
Sodium (mEq/L)	138±4	138±4	138±3
Hemoglobin (g/dL)*	12.7±2.1	13.3±2.1	12.2±2.0
Quick index (%)	67±28	68±25	67±30

HF, heart failure; SHF, systolic heart failure; HF-PSF, heart failure with preserved systolic function; AHT, arterial hypertension; FA, atrial fibrillation; IDCM, idiopathic dilated cardiomyopathy; EF, ejection fraction; sPAP, systolic pulmonary artery pressure; EDD, end-diastolic diameter; RV, right ventricle; differences SHF vs. HF-PSF, *P<0.05, **P<0.001.



patients in functional class III (20 patients) or IV/IV (111 patients) but no significant differences were found.

Correlations

SA related inversely and significantly with the end-diastolic diameter in the HF-PSF group ($r = -0.375$, $P < 0.05$) (Table 4). The same occurred in the SHF group with hemoglobin ($r = -0.330$, $P < 0.05$). We found a positive relationship between NTproBNP and creatinine in both groups, particularly in the SHF group ($r = 0.471$, $P < 0.05$). Similarly, creatinine associated inversely with hemoglobin in both the SHF ($r = -0.384$, $P < 0.05$) and the HF-PSF ($r = 0.278$, $P < 0.05$) groups.

Discussion

Our results show that there are no significant differences in the elevation of certain IM regarding the type of HF in the acute phase of HF. HF can be classified into two groups according to the EF: SHF and HF-PSF. Both groups share many characteristics, but there are others that clearly differentiate them. Most of the studies in the field of HF were performed in patients with SHF. Consequently, while the prognosis of SHF has improved in the last decade, HF-PSF prognosis has seen no such improvement.

Inflammation plays a key role in the physiopathology of HF and many studies have been conducted in this area; however, these studies were mainly on patients in stable phase. These studies have proven that the elevation of IM is related to severity.

The physiopathology of inflammation within HF is complex, as many elements contribute to

it through the secretion of IM. Thus, in some studies, rather than focusing on identifying isolated IM as prognostic factors, a combination of IM has been investigated.¹¹ Therefore, a wide and varied range of IM have been determined in the present study with the aim of covering as many aspects involved in inflammation as possible.

The first conclusion of this study can be drawn from patients' basal characteristics. As shown in Tables 1 and 2, differences were concordant with other studies¹² and were also logical from a physiopathological point of view.

Regarding prognosis, that of SHF is worse than that for HF-PSF in the stable phase, but prognosis is the same for the two types when HF-PSF patients are hospitalized.¹³ Therefore, prognosis does not only depend on the EF. On the other hand, and as already proven by our group,¹⁴ inflammation is more related to functional status than to EF.

As shown in Table 3, IM elevation was significant in both groups, and 3-4 times higher than the values from other studies performed in patients with stable HF.¹⁵

Fibrinogen is a marker which allows exploration of both the general inflammatory status and the hypercoagulable state. Multiple studies have associated this to ischemic heart disease, although it also increases in other heart pathologies^{16,17} and in stable phase regardless of the anticoagulant therapy.¹⁸ There were no differences in the PF, which proves that in this phase the hypercoagulable state is similar in both groups.

SA is particularly high in patients with ischemic heart disease.¹⁹ Our group proved that SA is also increased in patients with stable HF of other etiologies,¹⁴ as it also occurs in

this study in the acute phase of HF.

The most sensitive and less specific IM is the CRP. Some groups consider it to be the IM paradigm.²⁰ Its chronic and sustained elevation (>3 mg/dL) has been proven to have negative prognostic values in multiple diseases, including HF. CRP is strongly associated with atherosclerosis and, therefore, to the ischemic etiology.²¹ Some studies have shown that there are no differences in the increase in CRP between SHF and HF-PSF in stable phases.²² We have found no differences in the acute phase either. This proves, on the one hand, the non-specificity of CRP, and on the other that an increase in CRP seems to be more related to the function status than to the etiology or the type of HF.

HF is associated with a marked endothelial dysfunction and coagulation alterations.²³ vWF is a marker of endothelial dysfunction and coagulation status. Some studies have demonstrated a marked elevation of vWF in HF patients,²⁴ but to date no comparison has been made between patients with SHF and HF-PSF. Nevertheless, we have proved that vWF levels are remarkably high in our sample and, in addition, that there is no relationship between the EF and the type of HF. Both groups presented a similar Quick index, implying that coagulation therapy does not seem to have influenced these results. IL-6 is a cytokine that has been related to the severity of HF and has prognostic value.^{25,26} IL-6 levels increase with the functional status of HF patients; therefore, the levels presented herein were considerably higher than those published by other authors involving patients with stable HF, and were very similar to the subgroups with worse prognosis.²⁷ The association between IL-6 and the

Table 2. Treatment upon hospital admission in both groups.

	SHF (n=62)	HF-PSF (n=69)
IEC/ARA-II	53.4	41.8
Beta-blockers	29.3	22.4
Antialdosteronics	29.3	22.4
ASA*	46.6	28.4
Anticoagulants*	24.1	44.8
Nitrates	27.6	17.9
Calcium antagonists*	15.5	34.3
Digoxin*	15.5	35.8
Furosemide	56.9	53.7
Insulin	10.3	16.4
Statins [‡]	36.2	20.9
Allopurinol	8.6	3

SHF, systolic heart failure; HF-PSF, heart failure with preserved systolic function. All the values are expressed as percentages. [‡] $P < 0.1$. * $P < 0.05$.

Table 3. Comparison of inflammatory markers between both groups.

	Total HF (n=131)	SHF (n=62)	HF-PSF (n=69)
PF (mg/dL)	349±79	348±86	352±71
CRP (mg/L)	37.2±47.5	36.0±46.4	38.8±48.9
SA (mg/dL)	71.8±16.8	71.6±18.2	72.3±15.7
vWF (%)	331±127	318±128	347±124
VEFG (pg/mL)*	378±295	424±323	337±263
IL-6 (pg/mL)	15.5±20.4	16.6±24.8	14.9±15.9
NTproBNP (pg/mL)	6929±7014	8121±8526	5453±4262

HF, heart failure; SHF, systolic heart failure; HF-PSF, heart failure with preserved systolic function; PF, plasma fibrinogen; SA, sialic acid; CRP, C-reactive protein; vWF, von Willebrand factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. No significant differences were observed in any of the comparisons. Differences SHF vs HF-PSF, * $P < 0.1$.

Table 4. Correlations upon hospital admission.

	Total HF (n=131)	SHF (n=62)	HF-PSF (n=69)
SA-EDD	-0.219*	0.220#	-0.375*
SA-HB	-0.210*	-0.330*	-0.078#
NTproBNP-creatinine	0.408*	0.471*	0.441#
Creatinine-HB	-0.311**	-0.384*	-0.278*

HF, heart failure; SHF, systolic heart failure; HF-PSF, heart failure with preserved systolic function; SA, sialic acid; EDD, end diastolic diameter; HB, hemoglobin; sPAP, systolic pulmonary artery pressure. Differences SHF vs HF-PSF, # $P < 0.1$. * $P < 0.05$. ** $P < 0.001$.

EF has not been clearly determined, as there are many studies providing contradictory data.^{28,29} In our case, no relationship was observed in IL-6 whether the EF was higher or lower than 45%.

In HF, oxygen supply to tissue is reduced. This stimulates new vessel formation at the tissue level. VEGF is an angiogenesis marker believed to be involved in the physiopathology of HF; it also has prognostic value. VEGF levels are increased in stable HF patients in comparison with controls.¹⁵ From all the markers analyzed, this is the only one in which a significant tendency was found. Thus, patients with SHF have slightly greater values, which may indicate that these patients present more tissue hypoxia and more angiogenic proliferation. BNP and its precursor NTproBNP are the most commonly used markers in HF. We analyzed NTproBNP as its determination was easier to obtain than the brain natriuretic peptid. Both markers have a significant diagnostic and prognostic value.^{30,31} In stable HF patients, those with depressed EF present higher values of these peptides than patients with preserved EF.⁸ Iwanaga *et al.*³² found that in patients with symptomatic HF, BNP was higher in those with an EF below 50%. However, the functional status of 68% of these patients was below II. In our study, all the patients presented a clear deterioration of the functional status (functional class \geq III), and in that context, no differences were observed in the BNP and NTproBNP values regarding the type of HF.

In patients with stable HF, multiple correlations between the different IM and echocardiographic and clinical parameters were established. SA negatively correlated with the end-diastolic diameter in patients with HF-PSF, and with hemoglobin in patients with SHF. As no explanation has been found for this, it is thought to be a casual correlation. It is logical indeed that NTproBNP was found to be higher as creatinine increased and as hemoglobin decreased. Renal elimination of NTproBNP causes patients with renal failure to present an increase in its values. In addition, it has been proven that anemia acts as an aggravating factor; therefore, it is normal that NTproBNP concentrations in patients with anemia are higher. This study has several limitations. Recruiting patients only admitted to the Cardiology Unit could have biased the sample. Our hospital has other units with HF patients, but these are only those less symptomatic. Perhaps in our sample there is a profile of patients with advanced HF. Moreover, a control group has not been established, but we believe that there are many studies in the literature in which the normal range of the analyzed IM has been established. Therefore, these limitations do not invalidate the study results.

Conclusions

The main conclusion of this work is that, in the acute phase of HF, no differences are observed in the analyzed IM regarding the type of HF (SHF *vs* HF-PSF). Further long-term studies are needed in order to determine when differences in patients with stable HF appear, and what prognostic value these differences may have.

References

- Alonso-Pulpón L, Borrás X, Brugada J, et al. Investigadores de REDINSCOR. [Clinical and Preclinical Heart Failure Research Network (REDINSCOR). Instituto de Salud Carlos III Cooperative Special Topic Research Networks]. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:76-81.
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 2008;10:933-89.
- Maeder MT, Kaye DM. Heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:905-18.
- Vasan RS, Levy D. Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria. *Circulation* 2000;101:2118-21.
- Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005;95:3C-8C.
- Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, et al. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2009;158:422-30.
- Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, et al. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001;103:2055-9.
- Niethammer M, Sieber M, von Haehling S, et al. Inflammatory pathways in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* 2008;129:111-7.
- McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, et al. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 1971;285:1441-6.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. 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;18:1440-63.
- Niizeki T, Takeishi Y, Kitahara T, et al. Combination of conventional biomarkers for risk stratification in chronic heart failure. *J Cardiol* 2009;53:179-87.
- Chatterjee K, Massie B. Systolic and diastolic heart failure: differences and similarities. *J Card Fail* 2007;13:569-76.
- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2006;355:251-9.
- Sánchez-Lázaro IJ, Almenar L, Reganon E, et al. Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class. *Int J Cardiol* 2008;129:388-93.
- Vila V, Martínez-Sales V, Almenar L, et al. Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients. *Int J Cardiol* 2008;130:276-7.
- Coppola G, Rizzo M, Abrignani MG, et al. Fibrinogen as a predictor of mortality after acute myocardial infarction: a forty-two-month follow-up study. *Ital Heart J* 2005;6:315-22.
- Arnau Vives MA, Rueda Soriano J, Martínez Dolz LV, et al. Prognostic value of fibrinogen in patients admitted with suspected unstable angina and non-q-wave myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:622-30.
- Vila V, Sales VM, Almenar L, et al. Effect of oral anticoagulant therapy on thrombospondin-1 and von Willebrand factor in patients with stable heart failure. *Thromb Res* 2008;121:611-5.
- Crook JR, Goldman JH, Dalziel M, et al. Increased ventricular sialylation in patients with heart failure secondary to ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 1997;20:455-8.
- Smith SC Jr, Anderson JL, Cannon RO 3rd, et al. CDC; AHA. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the clinical practice discussion group. *Circulation* 2004;110:e550-3.
- Suleiman M, Khatib R, Agmon Y, et al. Early inflammation and risk of long-term development of heart failure and mortality in survivors of acute myocardial infarction



- predictive role of C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:962-8.
22. Michowitz Y, Arbel Y, Wexler D, et al. Predictive value of high sensitivity CRP in patients with diastolic heart failure. *Int J Cardiol* 2008;125:347-51.
 23. Chong AY, Blann AD, Lip GY. Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure. *QJM* 2003;96:253-67.
 24. Lip GY, Blann AD. Thrombogenesis, atherogenesis and angiogenesis in vascular disease: a new 'vascular triad'. *Ann Med* 2004;36:119-25.
 25. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1045-50.
 26. Roig E, Orús J, Paré C, et al. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;82:688-90.
 27. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102:3060-7.
 28. Birner CM, Ulucan C, Fredersdorf S, et al. Head-to-head comparison of BNP and IL-6 as markers of clinical and experimental heart failure: Superiority of BNP. *Cytokine* 2007;40:89-97.
 29. Gwechenberger M, Hülsmann M, Berger R, et al. Interleukin-6 and B-type natriuretic peptide are independent predictors for worsening of heart failure in patients with progressive congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:839-44.
 30. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. 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.
 31. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al.; 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.
 32. Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S, et al. B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:742-8.



Artículo complementario

De acuerdo con la normativa vigente de la Universitat Autònoma de Barcelona, a continuación se expone un artículo que, no cumpliendo las condiciones para ser considerado artículo fundamental de esta tesis doctoral, ha sido aceptado por la Comissió d'Estudis de Postgrau, como artículo complementario.

Vila V, Sales VM, Almenar L, Lázaro IS, Villa P, Reganon E. Effect of oral anticoagulant therapy on thrombospondin-1 and von Willebrand factor in patients with stable heart failure. *Thromb Res.* 2008;121(5):611-5.



ELSEVIER

REGULAR ARTICLE

Effect of oral anticoagulant therapy on thrombospondin-1 and von Willebrand factor in patients with stable heart failure

Virtudes Vila^a, Vicenta Martínez Sales^a, Luis Almenar^b,
Ignacio Sánchez Lázaro^b, Piedad Villa^c, Edelmiro Reganon^{a,*}

^a Research Center, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^b Heart Failure and Transplant Unit, Cardiology Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^c Clinical Pathology Department, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

Received 23 March 2007; received in revised form 28 June 2007; accepted 28 June 2007

Available online 10 August 2007

KEYWORDS

Heart failure;
Oral anticoagulation
therapy;
Endothelial dysfunction;
von Willebrand factor;
Thrombospondin-1

Abstract

Introduction: Heart failure (HF) is associated with coagulation activation, abnormal inflammation and endothelial dysfunction. High levels of von Willebrand factor (VWF) may manifest endothelial dysfunction and hypercoagulable state. The haemostatic activity of VWF is a function of multimers size; only large multimers of VWF are haemostatically active. Thrombospondin-1 (TSP-1) reduces the average multimer size of VWF. Patients with HF are in risk of thromboembolic events and oral anticoagulation therapy (OAT) has been shown to prevent it. This study was designed to evaluate whether VWF and TSP-1 levels are modified by OAT in stable HF patients. The effect of OAT on markers of inflammation and coagulation was also investigated.

Materials and methods: Fifty-nine patients with stable HF were studied and 33 of them received OAT. VWF, TSP-1, fibrinogen, prothrombin fragment 1+2 (F1+2), tissue factor (TF), D-dimer, endogenous thrombin generation (ETG), C reactive protein (CRP), tumour necrosis factor α (TNF α) and interleukin 6 (IL-6) were measured.

Abbreviations: HF, heart failure; VWF, von Willebrand factor; TSP-1, thrombospondin-1; OAT, oral anticoagulation therapy; F1+2, prothrombin 1+2 factor; TF, tissue factor; D-dimer, fibrin D-dimer; CRP, C-reactive protein; TNF α , tumour necrosis factor α ; IL-6, interleukin 6; ETG, endogenous thrombin generation.

* Corresponding author. Centro Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 3862797; fax: +34 96 1973018.

E-mail address: reganon_ed@uva.es (E. Reganon).

Results: Stable HF patients receiving OAT had higher VWF ($p=0.02$) and lower TSP-1 ($p=0.02$), ETG and F1+2 ($p=0.003$) than patients without OAT. However, there were no significant differences in the levels of fibrinogen, TF, D-dimer, CRP, IL6 and TNF α . The TSP-1/VWF ratio in patients receiving AOT was significantly lower than in patients without OAT ($p=0.005$).

Conclusion: OAT may have a dual effect on the haemostatic profile in stable HF by reducing thrombin generation and increasing the VWF. The decrease of TSP-1 induced by OAT may be clinically effective in neoangiogenesis. The increase of VWF in patients receiving anticoagulant treatment may also reflect an effect of OAT on endothelial dysfunction.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

Stable heart failure (HF) is a common final consequence of several cardiomyopathies. The pathophysiologic mechanism of this disorder is complex. In recent years, evidence of the importance of inflammation in the HF has emerged, and pro-inflammatory markers (interleukin-6, tumour necrosis factor, and C reactive protein) have been found to predict future heart failure [1,2]. Chronic HF is also associated with marked endothelial dysfunction and blood coagulation abnormalities [3,4]. Furthermore, high levels of fibrinogen and high levels of VWF have been related to advancing HF [5]. Fibrinogen is an acute-phase response marker associated with acute and chronic inflammatory processes [6] and with the risk of cardiovascular disease [7]. VWF is a multimeric plasma protein with distinct biological functions, and it plays a critical role in primary haemostasis. Its haemostatic function depends on the composition of multimers: only the large multimers forms of VWF are haemostatically active [8]. This functional importance of multimer size relates to the affinity of VWF for its ligands [9]. Modulation of VWF multimer size is, therefore, critical to the control of its haemostatic activity. Several previous studies [10–12] have reported that the multimeric size of VWF can be controlled in part by TSP-1, which facilitates reduction of disulfide bonds that hold VWF multimers together [11] and causes a decrease in the average multimer size of plasma VWF [12].

The endothelial and blood coagulation abnormalities associated with chronic HF may lead to an increased risk of venous thromboembolism [13]. Many studies have been done to investigate if oral anticoagulation is of benefit for the prevention of thromboembolism in HF but the use of this therapy for HF patients has been controversial subject [14,15].

This study was designed to investigate whether circulating levels of VWF and TSP-1 are modified by oral anticoagulant therapy in patients with stable heart failure. The effect of OAT on markers of inflammation and coagulation was also analyzed.

Materials and methods

Patients

Fifty-nine patients with stable HF, older than 35 and younger than 72, were studied. These patients were recruited from the outpatient cardiac insufficiency clinic, with the HF of more than one-year duration and with a stable clinical situation; without admissions to the hospital by decompositions of the cardiomyopathy, changes in the treatment or in the functional situation in at least 6 months prior to the inclusion in the study. The diagnosis of HF was based on patient history, physical examination, electrocardiogram, echocardiogram and coronarography. The functional status was determined according to the classification of the New York Heart Association (NYHA), in class I/II and class III/IV. The left ventricular ejection fraction (LVEF $\leq 35\%$) was determined through the method modified of Simpson and the Guides of the American Society of Echocardiography. Thirty-three patients received acenocoumarol as oral anticoagulant therapy (OAT) designed to maintain a prothrombin time international normalized ratio (INR).

Twenty-two patients were treated with β -blockers, 47 with angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor blockers, 38 with digitalis, and 43 with diuretics.

A control group of 59 healthy subjects of similar age and sex to the patient group were recruited along with cases from healthy hospital staff or persons who visited our hospital for medical checkups. All healthy control subjects had no clinical evidence of myocardial insufficiency or angina pectoris, no history of ischemic heart disease, and normal cardiovascular examination.

The study was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of our institution and written informed consent was obtained from all patients and controls.

Blood collection

Venous blood samples were obtained between 8 and 10 am, after a 12-hour overnight fast. Subjects were in a sitting position for 20 min before venipuncture. Blood samples were collected into BD Vacutainer tubes containing CTAD (sodium citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole). The ratio of anticoagulant (129 mM sodium citrate) to blood was 1:9 (v/v). Blood samples collected into dry BD Vacutainer tubes were also obtained. Each sample was immediately centrifuged at 2000 g for 30 min at 4 °C to obtain plasma or serum. The samples were tested immediately or frozen in aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Methods

Fibrinogen plasma levels were obtained by measuring the plasma fibrin formation rate by a turbidity assay [15]. In brief, 10 μl of a

solution of human thrombin (25 IU/ml) were added to 490 μ l of diluted fresh plasma (1/50, v/v), and a kinetic study was performed at 350 nm. The coefficient of variation was 5%.

Prothrombin fragment F1+2 (F1+2) (Enzygnost F1+2 kit, Dade-Behring, Germany), Fibrin D-dimer (D-Dimer) (Asserachrom D-D, Diagnostica Stago, Roche, Basel, Switzerland) and tissue factor (TF) (Immubind, Tissue factor ELISA kit, American Diagnostica, USA) plasma levels were determined by enzyme immunoassay kits. The coefficients of variation of the F1+2, D-dimer and TF techniques were 8%, 5% and 10%, respectively.

Endogenous thrombin generation (ETG) was evaluated in fresh whole blood after adding 12.5 mM CaCl_2 (final concentration). ETG was stopped at 20 min by adding 20 mM EDTA (final concentration). Free thrombin activity was determined using the chromogenic substrate S-2238 (1 mM final concentration) (Chromogenix-Instrumentation Laboratory Spa). The coefficient of variation was 7.2%.

C-reactive protein (CRP) plasma level was measured with a high sensitivity assays using particle enhanced immunological agglutination technique (N Latex CRP mono kit with immunonephelometry, Dade-Behring, Germany). The coefficient of variation was 4.3%.

Interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) plasma levels were determined by commercial ELISA kits (High sensitivity human IL-6 ELISA kit, Diaclone Research, Besancon, France and Quantikine HS Human TNF-alpha, R&D Systems, Minneapolis, USA). The coefficients of variation were 3.6% and 4.2%, respectively.

Von Willebrand factor antigen (VWF) plasma level was measured in ACL 9000 coagulation analyzer (Beckman-Coulter, USA) using latex particles coated with a polyclonal antibody directed against VWF. The coefficient of variation was 7.5%.

Thrombospondin-1 (TSP-1) serum level was quantified by means of an indirect ELISA. Briefly, the ELISA plate was coated with TSP-1 (20 μ g/ml) obtained in our laboratory from human platelets. The samples and the TSP-1 standard (Sigma-Aldrich Co, USA) were incubated overnight with specific polyclonal antibody for TSP-1 (thrombospondin Ab-8, NeoMarkers Lab Vision Corporation, USA), then they were added to the washed ELISA plate, and incubated for 2 h. A horseradish peroxidase (HRP) conjugated donkey-anti-rabbit IgG (Amersham, England) was used as a secondary antibody and incubated for 2 h. A solution of *o*-phenylenediamine-dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich Co, USA) was used as a substrate. The reaction was stopped with 4 M H_2SO_4 . Optical density was read in an ELISA plate reader (Thermo Labsystems). The coefficient of variation was 4.8%.

Glucose, cholesterol, triglycerides, levels were evaluated by enzymatic techniques in a Dax-72 autoanalyzer.

Statistical analysis

All continuous variables were checked for normal distribution. Differences in variables between two groups were compared using the *p* values for impaired Student's *t* test. Chi-square test, with Yate's correction, was conducted to compare differences in number of cases in variables between two groups. Two tailed *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with the SPSS statistical package version 11.5, for Windows.

Results

The clinical and biochemical characteristics of HF patients are shown in Table 1. There was no significant clinical difference between the patients receiving and not receiving OAT in terms of

the aetiology of HF, blood pressure and routine laboratory parameters.

The coagulation, inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis parameters determined in HF patients receiving and not receiving OAT and control group are shown in Table 2. The two treatment groups of patients exhibited significantly higher levels of fibrinogen, CRP, TNF α and VWF than control group. In patients receiving OAT, there was seen significantly lower levels of ETG, F1+2 and TSP-1 than controls. When the HF patients were divided based on OAT, significantly higher levels of VWF ($p=0.02$) were observed in-patient receiving OAT, who also had significantly lower levels of ETG ($p=0.003$), F1+2 ($p<0.0001$), and TSP-1 ($p=0.02$). In the group of patients who were not treated with OAT, aspirin was the drug selected, and to eliminate the effect that it could have on the increase of VWF and TSP-1 levels, the patients without OAT were divided on the basis of aspirin treatment. We found that there were not significant differences in the levels of VWF (149 ± 79 vs. 161 ± 61 %; $p=0.67$) and TSP-1 (48 ± 16 vs. 40 ± 11 μ g/ml; $p=0.18$) in patients treated with aspirin versus non treated patients. There were no significant differences in the rest of studied variables.

In order to assess the effect that OAT has on the haemostatic activity of VWF and according to several previous studies (10–12), we have calculated the TSP-1/VWF ratio in our patients and control subjects. The results obtained show that the value of

Table 1 Clinical and laboratory parameters in 59 stable heart failure patients, 33 patients receiving OAT and 26 patients not receiving OAT

	Patients receiving OAT (n=33)	Patients not receiving OAT (n=26)	<i>p</i>
Age (years)	56 \pm 8 (35–69)	58 \pm 9 (37–72)	0.35
Males (n)	27	25	0.12
Etiology			
Ischemic (n)	12	16	0.10
Dilated (n)	16	9	0.42
Valvular (n)	5	1	0.32
Smoker (n)	2	1	0.70
Diabetes (n)	11	7	0.81
Hypertension (n)	10	9	0.94
Body max index (kg/m ²)	27 \pm 5	26 \pm 3	0.37
Lipid lowering treatment (n)	12	10	0.87
Aspirin treatment (n)	4	14	0.002
Laboratory			
Total cholesterol (mg/dl)	190 \pm 37	186 \pm 38	0.86
HDL-cholesterol (mg/dl)	45 \pm 13	42 \pm 7	0.29
LDL-cholesterol (mg/dl)	112 \pm 32	122 \pm 33	0.25
Triglycerides (mg/dl)	140 \pm 65	168 \pm 107	0.22
Glucose (mg/dl)	119 \pm 68	127 \pm 50	0.62

Values are expressed as mean \pm SD, range in parenthesis, or number of cases. *p*, *p*-values for Student *t* test and Chi-square test (with Yate's correction). OAT, oral anticoagulant therapy.

TSP-1/VWF ratio in the group of patients receiving AOT was significantly lower (0.21 ± 0.13) than in the patients without OAT (0.37 ± 0.28 , $p=0.005$) and than in the controls subjects (0.64 ± 0.51 , $p=0.0001$) (Table 2). The value of TSP-1/VWF ratio in patients without OAT were also significant lower than the values in control subjects ($p=0.01$).

Discussion

The results of this study have confirmed the presence of high levels of inflammatory markers, such as fibrinogen, CRP, IL6 and $\text{TNF}\alpha$, and endothelial dysfunction marker, VWF, in stable HF [1–7]. These abnormalities, along with others, persisted in the patients receiving OAT. We also found that patients receiving OAT had elevated plasma levels of VWF, and decreased TSP-1, ETG and F1 + 2 as compared with patients not receiving OAT.

The increase of inflammation markers IL-6, $\text{TNF}\alpha$ and CRP observed in our patients was not significantly modified by the anticoagulant treatment. Nevertheless, in accordance with the previous results, our patients, with and without OAT, had higher levels of fibrinogen, which has been identified as a major independent risk factor for cardiovascular disease persisting the risk of thrombotic event [7,17,18].

The analysis of the coagulation parameters in our patients receiving OAT indicated a decrease of the hypercoagulable state as it was previously described in chronic HF patients [13,14,16]. Patients treated with OAT showed efficiently reduced the markers of thrombin generation (F1 + 2) and endogenous thrombin generation (ETG). The association between OAT and low levels of thrombin generation markers has been previously described [16,19]. However, analysis of D-dimer and TF, markers of coagulation activation, did not show significant decreases

between stable HF patients receiving and not receiving OAT, and they did not show significant differences within the control group.

Elevated levels of VWF were observed in the two groups of our stable HF patients in according with previously reported data [16,20–22]. In addition to its important functions in haemostatics, VWF has attracted considerable interest as predictor of cardiovascular disease [20,23,24]. In HF, high levels of VWF have been associated with hypercoagulable state [21] and endothelial dysfunction [22] and were predictive of adverse outcomes in these patients [25]. In our patients, we found higher VWF levels in those receiving OAT than in those who were not. This fact indicates the possible effect of oral anticoagulation on endothelial dysfunction. OAT was also associated to a decrease of TSP-1 levels. In this sense, it has been reported that interference with the release of cellular stores of TSPs may be clinically effective in augmenting neoangiogenesis [26]. Furthermore, TSP-1 is a multifunctional glycoprotein that possessed VWF reductase activity [11] that it can control the cleavage of the disulfide bonds that hold VWF multimers together [12]. The multimer distribution of VWF in plasma is regulated by ADAMTS13, a metalloprotease with TSP type 1 repeat that cleaves the ultra-large form of VWF by a single proteolysis [27]. These findings indicate that TSP-1 and ADAMTS13, influences VWF multimeric size and therefore the haemostatic activity of VWF [10–12]. The ratio of the circulating levels of TSP-1 and VWF inversely reflect the size of VWF multimers [10]. In our patients, it was observed that OAT affected TSP-1/VWF ratio and it was significantly lower in the HF patients with than without OAT. The increase of VWF may directly influence the

Table 2 Coagulation, inflammation and endothelial dysfunction parameters in 33 stable HF patients receiving OAT, 26 stable HF patients not receiving OAT and 59 control subjects

	Patients receiving OAT (n=33)	Patients not receiving OAT (n=26)	Control (n=59)	P1	P2	P3
Fibrinogen (mg/dl)	312 ± 68	295 ± 59	249 ± 43	0.33	<0.0001	<0.0001
ETG (IU/ml)	8.2 ± 3.4	11.2 ± 3.6	11.5 ± 4.6	0.003	0.0009	0.77
F1+2 (nmol/L)	0.41 ± 0.19	0.88 ± 0.32	0.99 ± 0.30	<0.0001	<0.0001	0.15
D-dimer (ng/ml)	148 ± 105	182 ± 123	171 ± 130	0.28	0.41	0.72
TF (ng/ml)	197 ± 101	218 ± 108	179 ± 72	0.46	0.33	0.056
CRP (mg/L)	7.7 ± 10.5	6.1 ± 7.7	1.7 ± 2.1	0.53	<0.0001	<0.0001
$\text{TNF}\alpha$ (pg/ml)	1.6 ± 0.7	1.9 ± 1.7	0.88 ± 0.32	0.39	<0.0001	<0.0001
IL-6 (pg/ml)	3.9 ± 8.1	4.1 ± 8.7	1.8 ± 1.5	0.93	0.067	0.062
VWF:Ag (%)	222 ± 116	159 ± 72	104 ± 51	0.02	<0.0001	0.0002
TSP-1 (µg/ml)	36 ± 11	44 ± 14	47 ± 13	0.02	0.0002	0.35
TSP-1/VWF:Ag	0.21 ± 0.13	0.37 ± 0.28	0.64 ± 0.51	0.005	0.0001	0.01

P1, stable HF patients receiving OAT vs. HF patients without OAT; P2, stable HF patients receiving OAT vs. control; P3, stable HF patients without OAT vs. control.

possibility of a thrombotic event, as suggested by the association of VWF levels with an increased risk of ischemic heart disease (20,23,24).

Conclusion

OAT may have a dual effect on the haemostatic profile of stable heart failure patients by reducing thrombin generation and increasing the VWF. The decrease of TSP-1 induced by OAT may be clinically effective in augmenting neoangiogenesis. The increase of VWF in patients receiving anticoagulant treatment may also reflect an effect of OAT on endothelial dysfunction.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ursula Salinas, Aurelia Royo and Josefa Llorens for their expert technical assistance. The study was supported by a grant from Generalitat Valenciana, Conselleria Sanitat. AP-004/06.

References

- [1] Anker SD, Von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 2004;**90**:464–70.
- [2] Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003;**107**:1486–91.
- [3] Chong AY, Blann AD, Lip GY. Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure. *QJM* 2003;**96**:253–67.
- [4] Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GY. Endothelial dysfunction and damage in chronic heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation* 2004;**110**:1794–8.
- [5] Lip GY, Blann AD. Thrombogenesis, atherogenesis and angiogenesis in vascular disease: a new 'vascular triad'. *Ann Med* 2004;**36**:119–25.
- [6] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;**340**:448–54.
- [7] Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;**118**:956–63.
- [8] Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998;**67**:395–424.
- [9] Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol* 1996;**72**:341–8.
- [10] Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ. Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J Exp Med* 2001;**193**:1341–9.
- [11] Pimanda JE, Annis DS, Raftery M, Mosher DF, Chesterman CN, Hogg PJ. The von Willebrand factor-reducing activity of thrombospondin-1 is located in the calcium-binding/C-terminal sequence and requires a free thiol at position 974. *Blood* 2002;**100**:2832–8.
- [12] Pimanda JE, Ganderton T, Maekawa A, Yap CL, Lawler J, Kershaw G, et al. Role of thrombospondin-1 in control of von Willebrand factor multimer size in mice. *J Biol Chem* 2004;**279**:21439–48.
- [13] Davis CJ, Gurbel PA, Gattis WA, Fuzaylov SY, Nair GV, O'Connor CM, et al. Hemostatic abnormalities in patients with congestive heart failure: diagnostic significance and clinical challenge. *Int J Cardiol* 2000;**75**:15–21.
- [14] De Lorenzo F, Saba N, Kakkar VV. Blood coagulation in patients with chronic heart failure: evidence for hypercoagulable state and potential for pharmacological intervention. *Drugs* 2003;**63**:565–76.
- [15] Reganon E, Vila V, Aznar J. Gelification of fibrinogen in plasma. A kinetic study by turbidity measurement. *Haemostasis* 1984;**14**:170–8.
- [16] Cugno M, Mari D, Meroni PL, Gronda E, Vicari F, Frigerio M, et al. Haemostatic and inflammatory biomarkers in advanced chronic heart failure: role of oral anticoagulants and successful heart transplantation. *Br J Haematol* 2004;**126**:85–92.
- [17] Reganon E, Vila V, Ferrando F, Martinez-Sales V, Fayos L, Ruano M, et al. Elevated high molecular weight fibrinogen in plasma is predictive of coronary ischemic events after acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999;**82**:1403–5.
- [18] Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;**294**:1799–809.
- [19] Bruhn HD, Liebsch J, Wagner C. Documentation of hypocoagulability by measurement of prothrombin fragment F1+2 when introducing oral anticoagulant therapy. *Thromb Res* 1992;**68**:317–9.
- [20] Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2006;**4**:1186–93.
- [21] Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GY. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. *Circulation* 2001;**103**:1746–51.
- [22] Lip GY, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res* 1997;**34**:255–65.
- [23] Whincup PH, Danesh J, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J* 2002;**23**:1764–70.
- [24] Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1997;**96**:1102–8.
- [25] Chong AY, Freestone B, Patel J, Lim HS, Hughes E, Blann AD, et al. Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes. *Am J Cardiol* 2006;**97**:671–5.
- [26] Kopp HG, Hooper AT, Broekman MJ, Vecilla ST, Petit I, Luo M, et al. Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J Clin Invest* 2006;**116**:3277–91.
- [27] Furlan M, Robles R, Lamie B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;**87**:4223–34.



Discusión conjunta

La inflamación, la alteración de la coagulación y la disfunción endotelial son tres procesos básicos en el desarrollo y mantenimiento de la IC [34, 40]. Estos tres mecanismos no son independientes, sino que existen puntos y vías en común que hacen que se influyan mutuamente. Como se ha comentado en la introducción, en los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de estos procesos en la IC, aunque todavía quedan aspectos por aclarar en cada uno de los mismos.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido el estudio de los procesos de la inflamación, coagulación y disfunción endotelial en la IC, explorando aspectos no estudiados hasta la fecha en cada uno de estos campos. De esta forma, la estructura de la discusión de esta Tesis Doctoral se plantea analizando los hallazgos de cada uno de los artículos en cada ámbito de estudio.

Inflamación

En el *Artículo 1* se comparó el grado de inflamación en una población de 59 pacientes ambulatorios con IC de diferentes etiologías. Los principales objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Cuantificación de la inflamación mediante el análisis de determinados MI (PCR, TNF- α , fibrinógeno proteico y ácido siálico).
- Búsqueda de diferencias en el proceso de la inflamación según la etiología de la IC.
- Establecer correlaciones entre los diferentes MI con la fracción de eyección y el estadio funcional.

La elección de los MI en este Artículo 1 se realizó en base a que ya eran MI conocidos y con estudios previos que demostraban su implicación en la IC [24]. Los dos

primeros (PCR y TNF- α), y según la literatura disponible, podían considerarse MI “más generales” en la IC con independencia de la etiología, mientras que tanto el FP como el AS, y según apuntaban estudios previos, eran más específicos de la etiología isquémica [49]. Junto a esto, la reproducibilidad, experiencia del grupo y el coste de las determinaciones influyeron también a la hora de seleccionar estos MI, ya que el propósito era estudiar MI accesibles a la mayor parte de la comunidad médica.

En un primer análisis se comparó el grado de inflamación de los 59 pacientes frente a controles sanos. Como ya se sabía, los pacientes con IC, pese a ser ambulatorios y encontrarse en una fase de estabilidad clínica (sin descompensaciones en los seis meses previos), presentaban valores más elevados de todos los MI analizados. Los primeros estudios sobre inflamación e IC se realizaron en pacientes ingresados y en aquellos ambulatorios pero con peor situación funcional. Posteriormente se publicaron trabajos, incluidos los basados en el estudio Framingham, que demostraban que en pacientes sin evidencia de enfermedad, la elevación de determinados MI constituía un factor de riesgo para el desarrollo de IC [25]. Entre ambas poblaciones de estudio, quedó aquella constituida por pacientes con IC pero estables, sobre los que apenas se han realizado estudios. Los resultados de este estudio demuestran que no sólo existe una mayor activación de la inflamación en estos pacientes, sino que ésta, y siempre por los valores de los MI analizados, es muy elevada pese a encontrarse clínicamente estables y óptimamente tratados.

El segundo aspecto a destacar del *Artículo 1* es el que hace referencia a la etiología de la IC. Los pacientes objeto de estudio se dividieron en tres etiologías, a saber, isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática y una miscelánea. Es cierto que tras esta división los grupos estaban constituidos por pocos pacientes, pero no se observó ningún tipo de diferencia en los MI analizados en función de la etiología de la IC. Estas diferencias no se observaron ni siquiera en aquellos MI, como el FP y el AS, que según estudios previos deberían encontrarse más elevados en aquellos pacientes de etiología isquémica [50, 51]. El período de estabilidad de seis meses podría explicar en parte este hecho, ya que implicaba la exclusión también de eventos isquémicos, momento en el que, según apuntan algunos estudios, se produce la mayor elevación de estos MI. Por otro lado, el FP refleja también el estado de la coagulación, proceso que se ve alterado en la IC con independencia de la etiología de la misma. La elevación del AS en el resto de etiologías es un aspecto no

demostrado hasta la fecha, pero podría estar en relación con la disfunción microvascular que se produce en cualquier tipo de IC, que propicia la ruptura de los hematíes y la liberación del AS a la sangre [52]. Junto a esto hay que destacar que la ausencia de diferencias en los MI analizados entre las diversas etiologías apunta a que los mecanismos neurohormonales por los que se perpetúa la IC, son similares en todos los pacientes.

Hasta la publicación de este estudio, apenas existían trabajos que comparasen la relación de los MI con el estadio funcional y la fracción de eyección. Clásicamente, la mayoría de estudios de este tipo, incluían únicamente pacientes con fracción de eyección (FE) muy deprimida, excluyendo los menos afectados (>35% de FE) [23]. En el Artículo 1, el criterio de inclusión fue clínico, y no determinado por la FE como sucede en trabajos previos, por lo que el rango de FE fue mayor. Para el análisis del estadio funcional (EF) se dividió a los pacientes en dos grupos, a saber, EF I y II por un lado y III y IV por otro. Aunque débil, y sólo con dos MI (FP y TNF- α) se obtuvo una correlación entre los MI y el EF, y no con la FE determinada mediante ecocardiografía. La determinación del EF presenta muchas limitaciones y en ocasiones es difícil de cuantificar, pero también es cierto que la FE no siempre es cuantificable de forma precisa. Los resultados obtenidos en el Artículo 1 refuerzan la importancia de la clínica en el seguimiento de estos pacientes y avalan decisiones tales como la de encaminar a pacientes hacia el trasplante cardíaco en función de su sintomatología, y no de la cifra de su FE.

En el *Artículo 3* se analizó el grado de inflamación de pacientes con IC aguda, pero comparando aquellos que presentaban IC con función sistólica deprimida o conservada. Como se comentó en la introducción, ambos tipos de IC tienen muchas diferencias clínicas (edad de presentación, sexo más afectado, comorbilidades...) y especialmente en lo que a fisiopatología se refiere, pero también comparten muchas similitudes (pronóstico, sintomatología...) [53]. Respecto al tratamiento, y con excepción de los inótropos que se utilizan casi exclusivamente en pacientes con FE <35%, el tratamiento en la fase aguda y en la crónica es muy similar en ambos subgrupos, pese a que la práctica totalidad de la evidencia científica se hay realizado en la ICS [54].

Desde el punto de vista de la inflamación, sucede algo similar a con el tratamiento, la mayoría de estudios se han realizado en la ICS. Es por ello que los trabajos científicos en pacientes con ICFSP sean escasos, y más aún en lo que se refiere a la comparación de ambos tipos de IC entre sí.

Los MI analizados en el *Artículo 3* comprendieron marcadores de inflamación generales (PCR, IL-6, FP, AS), específicos de la IC (NTproBNP), otros centrados en el estudio de la coagulación (FP, FvW) y finalmente dos de disfunción endotelial (FvW y VEFG). En ninguno de ellos se observó diferencias entre ambos grupos en la fase aguda, ni tan siquiera en los niveles del NTproBNP. Este marcador es actualmente de referencia en IC, por lo que la ausencia de diferencias significativas entre los dos grupos va en la dirección de que en la fase aguda de la IC, ambos subgrupos son muy similares [55].

El análisis de tan variados MI se realizó para comparar lo más ampliamente posible los procesos de la inflamación, coagulación y disfunción endotelial en ambos grupos, demostrando la ausencia de diferencias en los tres marcadores analizados.

El objetivo principal del *Artículo complementario* fue el estudio del efecto de la anticoagulación oral (con antagonistas de la vitamina K) en pacientes con IC estable. Se analizó en 59 pacientes y otros tantos controles diferentes parámetros de la coagulación. Junto con los marcadores de coagulación estudiados, se determinó también la PCR, el TNF- α , el fibrinógeno y la IL-6 como representantes de la inflamación. No hubo diferencias en estos MI entre aquellos pacientes que recibían anticoagulación oral y los que no, aunque como era de esperar, en ambos grupos se encontraron más elevados que en el grupo de controles sanos. Aunque no resulte un hallazgo muy llamativo, estas conclusiones no habían sido publicadas hasta la fecha. Al estar interrelacionados los sistemas de la inflamación, coagulación y disfunción endotelial, era posible que la influencia sobre uno de ellos afectara tal vez a los otros sistemas, pero no fue así. El fibrinógeno es el último paso en la cascada de la coagulación, pero a pesar de esto son pocos los estudios que han analizado el efecto de la anticoagulación sobre este marcador. En teoría, la anticoagulación a largo plazo debería disminuir los niveles de fibrinógeno en cualquier tipo de pacientes, pero algunos estudios en pacientes con IC [56] han demostrado que no es así, sino que puede incluso aumentar. El hecho de que aumente, o por lo menos no disminuya el fibrinógeno en estos pacientes puede explicarse por su papel como reactante de fase aguda y por la activación continua que sufre en la IC.

Coagulación

Uno de los motivos por los que se escogió el FP como MI en el *Artículo 1* fue su doble vertiente como MI y de la coagulación. Estudios previos habían demostrado que los pacientes con cardiopatía isquémica y fibrilación auricular, no sólo presentaban mayores niveles de FP, sino que aquellos pacientes con niveles más altos, tenían un mayor número de eventos isquémicos/embólicos y por ello, peor pronóstico vital [57, 58]. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los niveles de FP entre los tres grupos. Existen varias posibles explicaciones para este hecho. Entre estas razones se encuentran el reducido tamaño de la muestra de nuestro trabajo, la necesaria estabilidad clínica de los pacientes (lo que descartaba eventos isquémicos recientes) y principalmente a que el 34% de los pacientes del grupo de MCDi presentaban fibrilación auricular. Como se ha comentado previamente, la fibrilación auricular es un factor que por sí mismo ha demostrado alterar la coagulación en pacientes sin otra cardiopatía, pudiendo haber alterado los resultados.

Los pacientes con IC y en ritmo sinusal, presentan ya de por sí mayor riesgo de fenómenos tromboticos que la población sana [59], con lo que no es de extrañar que aquellos con fibrilación auricular sean más propensos a este tipo de complicaciones [60]. Este incremento del riesgo se recoge en los diferentes algoritmos empleados para decidir si se debe anticoagular a pacientes con esta arritmia [61]. Como se observa en este trabajo y en otros similares, parte del aumento del riesgo puede explicarse por la inflamación que se produce en la IC y que se acompaña de una activación mantenida de la cascada de la coagulación. Esta activación continua conlleva un estado procoagulante con niveles más elevados de alguno de sus productos finales como el FP [62, 63].

Al igual que con el TNF- α , el FP se encontró más elevado en aquellos pacientes con peor EF, y se obtuvo una correlación débil pero significativa con el EF. No obtuvimos correlación con la FE determinada mediante ecocardiografía. Esta disparidad entre clínica y datos ecocardiográficos se ve a diario en la clínica, y así es frecuente encontrar pacientes con FE del 10% y EF I y otros en cambio con FE del 30% y EF IV. Esta correlación tampoco se había comunicado en artículos previos, y vuelve a poner el acento en la clínica frente a la solicitud de pruebas complementarias que muchas veces realizamos por práctica rutinaria.

En el *Artículo 3* el marcador de coagulación analizado fue igualmente el FP. La fibrilación auricular permanente fue más frecuente en el grupo de ICS, pese a que el uso de

anticoagulación crónica (la indicación principal fue la fibrilación auricular paroxística) fue más frecuente en el grupo de ICFSP. Pese a estos datos, no hubo diferencias entre ambos tipos de IC en lo que a niveles de FP se refiere, lo que corrobora los datos del resto de MI señalando que en la fase aguda de la IC no existen diferencias tampoco en la alteración de la coagulación. Estos datos han sido confirmados clínicamente por el estudio Loire Valley Atrial Fibrillation Project, en el que se observó que en pacientes con fibrilación auricular no valvular, la tasa de eventos embólicos era similar en aquellos pacientes con ICS o ICFSP [64].

Hay que destacar que si bien no se trató de la misma población de estudio, los niveles de FP fueron mucho más elevados en los pacientes con descompensación aguda que en los pacientes del *Artículo 1* que se encontraban estables. Este dato puede explicar en parte el mayor riesgo de fenómenos trombóticos/ embólicos en la fase aguda de pacientes ingresados por IC con independencia del tipo de IC [63, 65].

Como se observa en el *Artículo complementario*, la anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K disminuyó de forma significativa únicamente algunos factores de los que intervienen en la cascada de la coagulación. Así, únicamente el fragmento F 1+2 de la protrombina disminuyó de forma significativa con la anticoagulación, mientras que tanto el FP, los D-dímeros como el factor tisular no se modificaron con esta terapia. Estos hallazgos pueden explicar por qué los pacientes con IC e indicación de anticoagulación, a pesar de ésta, siguen sufriendo mayor número de eventos trombóticos que el resto de la población anticoagulada por la misma indicación. Estos resultados del *Artículo complementario* ayudan a explicar por qué tanto en el *Artículo 1* como en el *Artículo 3* no hubo diferencias en el FP en los diferentes grupos a pesar de la tasa de anticoagulación tan diferente.

Disfunción endotelial

El endotelio es más que una simple lámina de células con efecto barrera, pues está implicado en la homeostasis de numerosos procesos a través de la liberación de diversas sustancias como el óxido nítrico [66].

La DE es un proceso conocido desde hace tiempo en la IC, pero no ha sido hasta hace poco que además se ha implicado en la fisiopatología de la misma. Hasta la publicación

de artículos como los de Freestone [67], la DE se consideraba que era una consecuencia de la IC, especialmente en fases avanzadas de la enfermedad. Tras estos artículos en los que se observó que la DE estaba ya presente en fases precoces de la enfermedad, y que tenía una implicación fisiopatológica con la IC, la DE ganó protagonismo.

En el *Artículo 2* se evaluó diferentes marcadores de DE en una misma población de pacientes con IC. Dicho análisis se realizó primero en la fase aguda de la enfermedad y posteriormente, y en los mismos pacientes, en una fase de estabilidad clínica (tres meses tras el alta). Ambas fases de la enfermedad se compararon con controles sanos ajustados por edad y sexo.

El análisis de la DE se realizó mediante la determinación de marcadores de DE clásicos (factor von Willebrand y e-selectina), marcadores de angiogénesis (factor de crecimiento vasculo-endotelial y la trombospondina) y un parámetro novedoso de DE, las células endoteliales circulantes. Estas células, y según apuntaban algunos estudios [67], presentaban mayor sensibilidad para el diagnóstico de la DE.

El principal valor de este Artículo fue no sólo el análisis de la DE de forma prospectiva en la misma población de pacientes con IC, sino también su correlación con marcadores de DE ya conocidos y validados. Hasta este Artículo, se había comunicado la validez de las CEC y su relación con la DE que se produce en numerosas enfermedades, incluida la IC, pero no se había hecho una correlación de este tipo ni evaluado su evolución en estos pacientes.

El FvW ha sido considerado hasta hace poco tiempo como un marcador de referencia para el estudio de la DE [41]. Entre las limitaciones que presenta se encuentran el ser un marcador de DE indirecto y estar implicado en otros procesos biológicos, como la coagulación. Como se demuestra en el *Artículo complementario*, la anticoagulación en pacientes con IC aumenta los niveles de FvW y trombospondina. Es en este tipo de pacientes donde de forma práctica se demostraría la superioridad de las CEC frente a otros marcadores de DE, pues al ser marcadores de daño directo, su nivel no se vería afectado por este tipo de tratamientos.

En el *Artículo 3* también se analizaron diversos parámetros de DE, en concreto el FvW y el VEGF. Al igual que en otros ámbitos de estudio, apenas existe en la literatura

trabajos que hayan evaluado la DE en pacientes con ICFSP, y menos aún una comparación con la ICS. En este Artículo se analizó la DE mediante marcadores clásicos pero validados por estudios previos. Los resultados concluyeron que en la fase aguda de la IC, al igual que con la inflamación y la coagulación, no existen diferencias entre ambos tipos de IC según los marcadores analizados. Como se ha demostrado en el *Artículo complementario*, la anticoagulación puede influir en los valores de FvW, ahora bien, pensamos que este hecho no afectó a los resultados ni a las conclusiones porque en nuestro caso el índice de Quick fue muy similar en ambos grupos.

En este mismo *Artículo 3*, además de demostrarse unos valores muy altos de ambos marcadores de DE, no se encontró correlación tampoco con la FE, apoyando la teoría de que la DE es independiente de ésta y probablemente se correlacione más con el estado clínico del paciente.

Limitaciones

La presente tesis doctoral la componen tres artículos fundamentales y otro complementario, enmarcados dentro de una misma línea de investigación. Es por ello que una de las principales limitaciones de esta tesis es que los pacientes estudiados en los diferentes trabajos poseían características similares entre sí pero no eran exactamente los mismos. Esto, más que afectar a los resultados de cada artículo, ha podido influir a la hora de la comparación de los resultados entre los diferentes trabajos.

Tanto los artículos fundamentales como el complementario tienen un tamaño muestral pequeño. Muchos de los resultados obtenidos no se han visto afectados por este hecho, pero sí que ha podido afectar a determinadas comparaciones y correlaciones entre grupos.

Los diferentes artículos poseen resultados lo suficientemente claros para su toma en consideración, y por ello las limitaciones pensamos que no invalidan los resultados ni las conclusiones obtenidas.



Conclusiones y aplicabilidad de los resultados

En el ámbito de inflamación y la IC hemos obtenido varias conclusiones:

- Los pacientes con IC ambulatoria, a pesar de estar estables clínicamente, presentan parámetros de inflamación más elevados que en un grupo ajustado de sujetos sanos. (*Artículo 1*).
- El grado de inflamación en pacientes con IC ambulatoria es independiente de la cardiopatía de base. (*Artículo 1*).
- En este mismo tipo de pacientes, la elevación de los marcadores inflamatorios se correlaciona mejor con el estadio funcional de los mismos que con parámetros obtenidos de pruebas complementarias como la fracción de eyección. (*Artículo 1*).
- No existen diferencias en el grado de inflamación en pacientes ingresados por descompensación de su IC, según el tipo de IC del que se trate (fracción de eyección deprimida o fracción de eyección conservada). (*Artículo 3*).
- En el campo de la coagulación, las principales conclusiones extraídas de los diferentes trabajos son las siguientes:
 - La etiología de la IC no afecta a la alteración de la coagulación que se produce en pacientes con ICS y estables (*Artículo 1*).
 - No existen diferencias en la alteración de la coagulación que se produce en la fase de descompensación de pacientes con ICS o ICFSP (*Artículo 2*).
 - La anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K apenas normaliza la activación del sistema de la coagulación que se produce en pacientes con IC (*Artículo complementario*).
- En lo relativo a la disfunción endotelial en la IC las conclusiones que hemos obtenido han sido las siguientes:
 - Las CEC se elevan de forma notable en pacientes ingresados por IC (*Artículo 2*).
 - El nivel de las CEC disminuye con la estabilización de la IC, pero persiste más elevado que en sujetos sanos (*Artículo 2*).
 - Los niveles de CEC se correlacionan con parámetros más clásicos y establecidos de disfunción endotelial como son el factor von Willebrand y el factor de crecimiento vasculo-endotelial (*Artículo 2*).

- De los resultados de los trabajos que se han expuesto en esta tesis doctoral se derivan varias posibles aplicaciones prácticas:
- La inflamación en la IC estable se relaciona más con el estadio funcional que con pruebas hasta ahora tan imprescindibles como la determinación de la fracción de eyección. Este dato enfatiza la importancia de un seguimiento más clínico de los pacientes con IC frente a un seguimiento basado en la determinación de pruebas complementarias.
- Los pacientes ingresados por IC presentan un grado de inflamación similar tanto si se tratan de pacientes con fracción de eyección deprimida como conservada, por lo que el tratamiento debe ser igual de precoz y agresivo en ambos casos, frente a la creencia de que los pacientes con ICFSR representaban una forma menor y más banal de IC.
- En la IC existe una disfunción endotelial conocida desde hace tiempo. Hasta ahora los parámetros por los que se cuantificaba dicha disfunción eran indirectos. Las CEC suponen un método de medición más directo y preciso del daño endotelial. La constatación de que este nuevo parámetro se correlaciona con los marcadores clásicos permitirá que en el futuro la técnica de elección para la determinación de la disfunción endotelial sea la determinación de CEC.

Anexos

Métodos de laboratorio

En este apartado se detallan con más precisión las técnicas empleadas para la determinación de los diferentes marcadores inflamatorios, de coagulación y de disfunción endotelial tratados en esta tesis.

Muchos de los marcadores estudiados se analizaron mediante kits comerciales que empleaban el método ELISA-sándwich. Este tipo de ELISA es el más utilizado ya que tiene mayor sensibilidad que los ensayos en los que el antígeno se une directamente a los anticuerpos inmovilizados en la fase sólida. En este tipo de ensayo los pocillos de las microplacas están recubiertos de un anticuerpo específico de captura en exceso quedando así retenido el antígeno que deseamos cuantificar tras una incubación. Cualquier sitio libre quedará bloqueado por una proteína que no interfiere en la cuantificación tal como la albúmina. Tras un lavado se adiciona un segundo anticuerpo específico en exceso que generalmente difiere un poco del primer anticuerpo. Este anticuerpo puede estar conjugado con biotina o con una enzima. Posteriormente se realiza un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido al antígeno y se añade un sustrato adecuado al enzima utilizado. Tras la incubación se mide el grado de hidrólisis del sustrato. La cantidad de sustrato hidrolizado será proporcional a la cantidad de enzima unida al pocillo la cual será proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

PCR

Los niveles de proteína C reactiva (PCR) se determinaron mediante un test de alta sensibilidad usando técnicas de aglutinación inmunológica aumentada. (N Latex CRP mono kit, Dade-Behring, Germany). El coeficiente de variación fue del 4,3% y la sensibilidad del método 0,3 mg/L.

Ácido Siálico

Los niveles plasmáticos de ácido siálico se determinaron usando un método enzimático-colorimétrico comercial (Sialic Acid Farbtest, Boehringer, Mannheim, Alemania). La sensibilidad fue de 19 mg/dl y el coeficiente de variación fue del 3,6%.

Cuantificación de la generación endógena de trombina

Las muestras destinadas para la cuantificación de la generación de trombina (GET) fueron recogidas con anticoagulante citrato trisódico 0,109 M, en tubos de plástico Vacutainer (BD Diagnostics). Posteriormente se centrifugaron a 1.500g, durante 30 minutos y a 4°C para la obtención del plasma con micropartículas y plasma libre de plaquetas (PLP). La GET se midió por el método de trombograma calibrado automatizado (CAT, Thrombinoscope BV), en las diferentes muestras de plasma. La GET se activó por la adición de 20µL Cl₂Ca (12,5mM), 20µL de sustrato de trombina fluorogénica (Thrombinoscope BV) y 20µL de calibrador a 80µL de plasma. La trombina generada se midió en un lector de fluorescencia (Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems) a 390/460 nm. Se obtuvieron curvas de generación de trombina que se calcularon con el software de Thrombinoscope (Thrombinoscope BV) de las que se analizaron tres parámetros: tiempo de latencia (min) (fase de iniciación de coagulación), potencial endógeno trombina (nM x min.) y pico de trombina (nM). El coeficiente de variación fue de 7,2%.

Células endoteliales circulantes

Las células endoteliales circulantes (CEC) se aislaron a partir de sangre entera a 4°C con un anticuerpo monoclonal recubierto con Pan-Mouse M450 Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway) y dirigido frente al antígeno endotelial CD-146. Para evitar uniones no específicas de leucocitos al CD-146 recubierto, tras el aislamiento inmunomagnético, las células se incubaron durante 1 h en oscuridad, con lecitina marcada con FITC de europaeus UEA1 (Sigma-ALDRICH, Inc). Así se confirmó la naturaleza endotelial de las células. Estas muestras se lavaron, suspendieron en tampón y se contaron mediante microscopía de fluorescencia

usando una cámara Nageotte. Se consideró que la célula que se observaba era CEC si era nucleada, tenía una longitud $>10 \mu\text{m}$, y tenía unidas más de 5 esferas marcadas con UEA-1. Los conglomerados se contaron como una sola célula. El número de CEC se expresó como células por mililitro de sangre. La reproducibilidad del test se determinó mediante la realización de 6 determinaciones de 10 muestras diferentes. El coeficiente de variación fue del 12%.

E-Selectina

Los niveles plasmáticos de este marcador se determinaron mediante kits comerciales de ELISA-sándwich (R&D Systems), con una sensibilidad de $0,027 \text{ ng/ml}$ y un coeficiente de variación del 6,5%.

Factor de crecimiento vaso endotelial

Este marcador, también conocido por sus siglas en inglés VEGF se analizó igualmente mediante un kit comercial tipo ELISA-sándwich (Biosource), con una sensibilidad de 5 pg/ml y un coeficiente de variación del 4,9%.

Fibrinógeno

Los niveles plasmáticos de fibrinógeno se obtuvieron midiendo la tasa de formación de fibrina por el método de turbidimetría. En resumen, se añadió $10 \mu\text{l}$ de una solución de trombina humana (25 IU/ml) a $490 \mu\text{l}$ de plasma diluido ($1/50$, ev/v), y el estudio cinético se realizó a 350 nm . La sensibilidad fue de 10 mg/dl y el coeficiente de variación fue del 8%.

Dímeros D de fibrina

Su cuantificación se realizó utilizando un kit comercial (Asserachrom D-D, Diagnostica Stago, Roche, Basilea, Suiza). El coeficiente de variación del método fue del 5%.

Fragmento 1+2 de protrombina

Su cuantificación se realizó mediante un kit comercial (Enzygnost F1+2 kit, Dade-Behring, Alemania). El coeficiente de variación fue del 8%.

Interleuquina 6

Se realizó mediante un kit comercial según el método ELISA-sándwich (High sensitivity human IL-6 ELISA kit, Diaclone Research, Besancon, Francia). La sensibilidad fue de 0,8 pg/ml El coeficiente de variación fue del 10%.

Factor de necrosis tumoral Alfa

Se realizó mediante un kit comercial según el método ELISA-sándwich (Quantikine HS Human TNF-alpha, R&D Systems, Minneapolis, EEUU). La sensibilidad fue de 0,3 pg/ml El coeficiente de variación fue del 4,2%.

Factor Von Willebrand

Los niveles plasmáticos de factor von Willebrand (FvW) se determinaron mediante un analizador de la coagulación ACL 9000 (Beckman-Coulter, EEUU) usando partículas de látex

recubiertas con anticuerpos monoclonales contra FvW. El coeficiente de variación fue del 7,5%.

Trombospondina-1

Los niveles en suero de trombospondina-1 (TSP-1) se cuantificaron mediante métodos de ELISA indirecto[68]. Brevemente: placas de ELISA de 96 pocillos que se recubrieron con TSP-1 (20 µg/ml). Las muestras y el estándar de TSP-1 (Sigma-Aldrich Co, EEUU) se incubaron con anticuerpos policlonales específicos para TSP-1 (Thrombospondin Ab-8, NeoMarkers Lab Vision Corporation, EEUU) entre 18-24 h, y posteriormente se añadieron a la placa. Un anti-anticuerpo conjugado con peroxidasa (Amersham, Inglaterra) se utilizó como segundo anticuerpo. Como sustrato revelador de color se empleó una solución de 0-fenilenediamina-dihidroclorhídrico (OPD, Sigma-Aldrich Co, EEUU). La densidad óptica se determinó a 490 nm mediante un lector de placas ELISA (Thermo Labsystems, España). La sensibilidad del método es 12 µg/ml y su coeficiente de variación 4,8%.

NT-ProBNP

Los niveles de este marcador se determinaron mediante un kit comercial (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) basado en un test inmunológico in vitro mediante anticuerpos monoclonales que reconocen los epitopos del tramo N-terminal (1-76) del proBNP en un analizador Elecsys 2100 ®. El coeficiente de variación fue del 3,6%.

Bibliografía

1. Fernandez-Berges, D., et al., *[Clinical characteristics and mortality of heart failure. INCAex study.]* Rev Clin Esp, 2012.
2. Bogner, H.R., et al., *Assessment of cost and health resource utilization for elderly patients with heart failure and diabetes mellitus.* J Card Fail, 2010. **16**(6): p. 454-60.
3. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association.* Circulation, 2011. **123**(8): p. 933-44.
4. McCullough, P.A., et al., *Outcomes and prognostic factors of systolic as compared with diastolic heart failure in urban America.* Congest Heart Fail, 2005. **11**(1): p. 6-11.
5. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction.* N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.
6. Jimenez-Navarro, M.F., et al., *[Trends of hospitalizations for chronic heart failure in Andalusia in the last decade].* Rev Clin Esp, 2006. **206**(10): p. 474-6.
7. Steinberg, B.A., et al., *Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes.* Circulation, 2012. **126**(1): p. 65-75.
8. Cortina, A., et al., *Prevalence of heart failure in Asturias (a region in the north of Spain).* Am J Cardiol, 2001. **87**(12): p. 1417-9.
9. Anguita Sanchez, M., et al., *Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study.* Rev Esp Cardiol, 2008. **61**(10): p. 1041-9.
10. Koelling, T.M., et al., *The expanding national burden of heart failure in the United States: the influence of heart failure in women.* Am Heart J, 2004. **147**(1): p. 74-8.
11. Stewart, S., et al., *Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?* Heart, 2003. **89**(1): p. 49-53.
12. Zhang, W. and S. Watanabe-Galloway, *Ten-year secular trends for congestive heart failure hospitalizations: an analysis of regional differences in the United States.* Congest Heart Fail, 2008. **14**(5): p. 266-71.
13. Hogg, K., K. Swedberg, and J. McMurray, *Heart failure with preserved left ventricular systolic function: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis.* J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(3): p. 317-27.
14. Dunlay, S.M., et al., *Hospitalizations after heart failure diagnosis a community perspective.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(18): p. 1695-702.
15. Chan, D.C., et al., *Heart failure disease management programs: a cost-effectiveness analysis.* Am Heart J, 2008. **155**(2): p. 332-8.
16. Borlaug, B.A. and W.J. Paulus, *Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment.* Eur Heart J, 2011. **32**(6): p. 670-9.
17. McDonald, K., *Diastolic heart failure in the elderly: underlying mechanisms and clinical relevance.* Int J Cardiol, 2008. **125**(2): p. 197-202.
18. Bhatia, R.S., et al., *Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study.* N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 260-9.

19. MacIntyre, K., et al., *Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995*. *Circulation*, 2000. **102**(10): p. 1126-31.
20. Rodriguez-Artalejo, F., et al., *Trends in hospitalization and mortality for heart failure in Spain, 1980-1993*. *Eur Heart J*, 1997. **18**(11): p. 1771-9.
21. Rodriguez-Artalejo, F., J.R. Banegas Banegas, and P. Guallar-Castillon, [*Epidemiology of heart failure*]. *Rev Esp Cardiol*, 2004. **57**(2): p. 163-70.
22. Levy, D., et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(18): p. 1397-402.
23. Braunwald, E., *Biomarkers in heart failure*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(20): p. 2148-59.
24. Torre-Amione, G., *Immune activation in chronic heart failure*. *Am J Cardiol*, 2005. **95**(11A): p. 3C-8C; discussion 38C-40C.
25. Vasan, R.S., et al., *Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2003. **107**(11): p. 1486-91.
26. Ingelsson, E., et al., *Inflammation, as measured by the erythrocyte sedimentation rate, is an independent predictor for the development of heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(11): p. 1802-6.
27. Kardys, I., et al., *C-reactive protein and risk of heart failure. The Rotterdam Study*. *Am Heart J*, 2006. **152**(3): p. 514-20.
28. Cesari, M., et al., *Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study*. *Circulation*, 2003. **108**(19): p. 2317-22.
29. Anker, S.D. and S. von Haehling, *Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview*. *Heart*, 2004. **90**(4): p. 464-70.
30. Elster, S.K., E. Braunwald, and H.F. Wood, *A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure*. *Am Heart J*, 1956. **51**(4): p. 533-41.
31. Levine, B., et al., *Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure*. *N Engl J Med*, 1990. **323**(4): p. 236-41.
32. Morrow, D.A. and J.A. de Lemos, *Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers*. *Circulation*, 2007. **115**(8): p. 949-52.
33. Willerson, J.T. and P.M. Ridker, *Inflammation as a cardiovascular risk factor*. *Circulation*, 2004. **109**(21 Suppl 1): p. I12-10.
34. Vila, V., et al., *Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients*. *Int J Cardiol*, 2008. **130**(2): p. 276-7.
35. Roldan Schilling, V., et al., [*Thrombogenic and endothelial damage markers in patients with ischemic systolic impairment*]. *Rev Esp Cardiol*, 2001. **54**(10): p. 1155-60.
36. Levi, M. and T. van der Poll, *Two-way interactions between inflammation and coagulation*. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. **15**(7): p. 254-9.
37. Petaja, J., *Inflammation and coagulation. An overview*. *Thromb Res*, 2011. **127 Suppl 2**: p. S34-7.
38. Marti, C.N., et al., *Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(16): p. 1455-69.
39. Chong, A.Y., et al., *Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes*. *Am J Cardiol*, 2006. **97**(5): p. 671-5.
40. Tousoulis, D., M. Charakida, and C. Stefanadis, *Inflammation and endothelial dysfunction as therapeutic targets in patients with heart failure*. *Int J Cardiol*, 2005. **100**(3): p. 347-53.
41. Blann, A.D., *Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years*. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(1): p. 49-55.
42. Quilici, J., et al., *Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2004. **110**(12): p. 1586-91.

43. Chong, A.Y., et al., *Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin*. *Eur J Heart Fail*, 2006. **8**(2): p. 167-72.
44. Fleitas, T., et al., *Circulating endothelial cells and microparticles as prognostic markers in advanced non-small cell lung cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47365.
45. Blann, A.D., et al., *Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(2): p. 228-35.
46. Lee, K.W., et al., *Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 526-32.
47. Chong, A.Y., et al., *Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide*. *Circulation*, 2004. **110**(13): p. 1794-8.
48. Rajagopalan, S., et al., *Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3677-83.
49. Reganon, E., et al., *Sialic acid is an inflammation marker associated with a history of deep vein thrombosis*. *Thromb Res*, 2007. **119**(1): p. 73-8.
50. Allain, P., et al., *[Increase of sialic acid concentration in the plasma of patients with coronary disease]*. *Presse Med*, 1996. **25**(3): p. 96-8.
51. Coppola, G., et al., *Fibrinogen as a predictor of mortality after acute myocardial infarction: a forty-two-month follow-up study*. *Ital Heart J*, 2005. **6**(4): p. 315-22.
52. Topcuoglu, C., et al., *Total and lipid-associated sialic acid in serum and thrombocytes in patients with chronic heart failure*. *Clin Biochem*, 2010. **43**(4-5): p. 447-9.
53. Ho, J.E., et al., *Discriminating clinical features of heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in the community*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(14): p. 1734-41.
54. McMurray, J.J., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(8): p. 803-69.
55. Chatterjee, K. and B. Massie, *Systolic and diastolic heart failure: differences and similarities*. *J Card Fail*, 2007. **13**(7): p. 569-76.
56. Eritsland, J., et al., *Effects of long-term treatment with warfarin on fibrinogen, FPA, TAT, and D-dimer in patients with coronary artery disease*. *Thromb Res*, 1992. **66**(1): p. 55-60.
57. Arnau Vives, M.A., et al., *[Prognostic value of fibrinogen in patients admitted with suspected unstable angina and non-q-wave myocardial infarction]*. *Rev Esp Cardiol*, 2002. **55**(6): p. 622-30.
58. Conway, D.S., et al., *Predictive value of indexes of inflammation and hypercoagulability on success of cardioversion of persistent atrial fibrillation*. *Am J Cardiol*, 2004. **94**(4): p. 508-10.
59. Palka, I., et al., *Altered fibrin clot properties in patients with chronic heart failure and sinus rhythm: a novel prothrombotic mechanism*. *Heart*, 2010. **96**(14): p. 1114-8.
60. Jang, S.J., et al., *Impact of heart failure with normal ejection fraction on the occurrence of ischaemic stroke in patients with atrial fibrillation*. *Heart*, 2013. **99**(1): p. 17-21.
61. Camm, A.J., et al., *2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(21): p. 2719-47.

62. Klein, L. and B. O'Connell J, *Thromboembolic risk in the patient with heart failure*. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2007. **9**(4): p. 310-7.
63. De Lorenzo, F., N. Saba, and V.V. Kakkar, *Blood coagulation in patients with chronic heart failure: evidence for hypercoagulable state and potential for pharmacological intervention*. *Drugs*, 2003. **63**(6): p. 565-76.
64. Banerjee, A., et al., *Ejection fraction and outcomes in patients with atrial fibrillation and heart failure: the Loire Valley Atrial Fibrillation Project*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(3): p. 295-301.
65. Mentz, R.J., et al., *Atrial fibrillation or flutter on initial electrocardiogram is associated with worse outcomes in patients admitted for worsening heart failure with reduced ejection fraction: findings from the EVEREST Trial*. *Am Heart J*, 2012. **164**(6): p. 884-92 e2.
66. Boos, C.J., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Circulating endothelial cells in cardiovascular disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(8): p. 1538-47.
67. Freestone, B., et al., *The effects of direct current cardioversion for persistent atrial fibrillation on indices of endothelial damage/dysfunction*. *Thromb Res*, 2006. **118**(4): p. 479-85.
68. Martinez-Sales, V., et al., *Atorvastatin neutralizes the up-regulation of thrombospondin-1 induced by thrombin in human umbilical vein endothelial cells*. *Endothelium*, 2007. **14**(4-5): p. 233-8.

