

Fator de Diferenciação de Crescimento 15: um Novo Biomarcador em Pacientes com Disfunção Diastólica?

Growth-differentiation Factor-15: a Novel Biomarker in Patients with Diastolic Dysfunction?

Wilfried Dinh, Reiner Füh, Mark Lankisch, Georg Hess, Dietmar Zdunek, Thomas Scheffold, Frank Kramer, Rolf Michael Klein, Michael Coll Barroso, Werner Nickl

Institute for Heart and Circulation Research, University Witten/Herdecke - Alemanha; Helios Clinics Wuppertal, Departamento de Cardiologia, Wuppertal - Alemanha; CoroVital, Institute for Sports Medicine, Wuppertal - Alemanha; Universität Mainz, Departamento Médico, Langenbeckstrasse 1, Mainz - Alemanha; Roche Diagnostics, Forrenstrasse in CH Rotkreuz - Suíça; Institut für Herzinfarktforschung Ludwigshafen (IHF) - Alemanha; Global Biomarker Research, Bayer Schering Pharma, Wuppertal - Alemanha; Augusta Hospital Düsseldorf, Departamento de Cardiologia, Düsseldorf - Alemanha

Resumo

Fundamento: O fator de diferenciação de crescimento-15 ou GDF-15, uma citocina de resposta ao estresse relacionada ao fator transformador de crescimento beta (TGF- β), está elevado e independentemente relacionado à prognóstico adverso na insuficiência cardíaca sistólica.

Objetivo: O objetivo do presente estudo é investigar os níveis plasmáticos de GDF-15 em pacientes com disfunção diastólica pré-clínica ou insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal (ICFEN).

Métodos: Avaliamos 119 pacientes com fração de ejeção (FE) normal, encaminhados à angiografia coronariana eletiva, dos quais 75 (63%) tinham doença arterial coronariana (DAC). Os indivíduos foram classificados como tendo disfunção diastólica ventricular esquerda leve (DDVE grau I, n = 61), ICFEN (DDVE grau II ou III, n = 38) ou função diastólica normal (controles, n = 20). Em um subgrupo de 20 indivíduos, alterações no débito cardíaco (DC) foram medidas através de reinalação de gás inerte (Innocor[®]) em resposta a um teste hemodinâmico ortostático.

Resultados: Os níveis de GDF-15 na ICFEN [mediana 1,08, variação interquartil (0,88-1,30) ng/ml] eram significativamente mais altos do que nos controles [0,60 (0,50-0,71) ng/ml, p = 0,003] e em pacientes com DDVE grau I [0,78 (0,62-1,04) ng/ml, p < 0,001]. Além disso, os níveis de GDF-15 estavam significativamente elevados em pacientes com DDVE grau I, em comparação aos controles (p = 0,003). Adicionalmente, GDF-15 estava correlacionado com os marcadores ecocardiográficos de disfunção diastólica e estava correlacionado com a magnitude da resposta do CO à alteração na posição do corpo de ereta para supina (r = -0,67, p = 0,005).

Conclusão: Os níveis de GDF-15 estão elevados em indivíduos com ICFEN e podem diferenciar função diastólica normal de DDVE. Além disso, os níveis de GDF-15 estão associados com uma redução na resposta do DC no teste hemodinâmico ortostático. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

Palavras-chave: Fator 15 de diferenciação de crescimento, insuficiência cardíaca, volume sistólico, disfunção ventricular.

Abstract

Background: Growth differentiation factor-15 (GDF-15), a stress-responsive transforming growth factor- β -related cytokine, is elevated and independently related to an adverse prognosis in systolic heart failure.

Objective: This study aimed to investigate plasma levels of GDF-15 in patients with preclinical diastolic dysfunction or heart failure with normal ejection fraction (HF_nEF).

Methods: We evaluated 119 patients with normal ejection fraction referred for an elective coronary angiography, 75 (63%) of whom had coronary artery disease. Subjects were classified as having either mild left ventricular diastolic dysfunction (LVDD grade I, n = 61), HF_nEF (LVDD grade II or III, n = 38) or normal diastolic function (controls, n = 20). In a subgroup of 20 subjects, changes in cardiac output (CO) were measured by inert gas rebreathing (Innocor[™]) in response to an orthostatic hemodynamic test.

Results: Growth differentiation factor-15 levels in HF_nEF [median 1.08, interquartile range (0.88-1.30) ng/ml] were significantly higher than in controls [0.60 (0.50-0.71) ng/ml, p = 0.003] and in patients with LVDD grade I [0.78 (0.62-1.04) ng/ml, p < 0.001]. In addition, GDF-15 was significantly elevated in patients with LVDD grade I compared to controls (p = 0.003). Furthermore, GDF-15 was correlated with echocardiographic markers of diastolic dysfunction and was correlated with the magnitude of CO response to the change in body position from standing to supine (r = -0.67, p = 0.005).

Conclusion: Growth differentiation factor-15 levels are elevated in subjects with HF_nEF and can differentiate normal diastolic function from asymptomatic LVDD. In addition, GDF-15 is associated with a reduced cardiac output response in the orthostatic hemodynamic test. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

Keywords: Growth differentiation factor 15; heart failure; stroke volume; ventricular dysfunction.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Wilfried Dinh •

Arrenberger Street, 20 - 42113 - Wuppertal - NRW

E-mail: wilfried.dinh@googlemail.com, wilfried.dinh@gmx.de

Artigo recebido em 06/10/10; revisado recebido em 15/12/10; aceito em 03/01/11.

Introdução

Quase 50% dos pacientes que apresentam sinais e sintomas de insuficiência cardíaca (IC) tem fração de ejeção (FE) normal^{1,2}, uma condição chamada de insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal (ICFEN). Dados recentes sugerem que a mortalidade geral da ICFEN é equivalente à da insuficiência cardíaca sistólica (ICS)^{1,2}. Na população em geral, a disfunção diastólica ventricular esquerda (DDVE), a qual é considerada precursora da ICFEN³, é um preditor potente e independente de morte⁴.

Entretanto, estudos clínicos sobre a ICFEN tem sido frequentemente desapontadores, incluindo aqueles com medicamentos aprovados para ICS⁵⁻⁷.

Não obstante a mesma mortalidade geral, isso é em parte devido à menor proporção de morte relacionada à IC na população geral de pacientes com ICFEN⁸. As discrepâncias nas taxas de mortalidade relacionada à IC podem ser atribuídas à considerável heterogeneidade em pacientes com ICFEN, o que pode ser explicado pelo uso de diferentes critérios de recrutamento⁹ ou a complexidade do diagnóstico ecocardiográfico. Embora uma diretriz específica tenha sido proposta recentemente pela *American Society of Cardiology*¹⁰, o estabelecimento dessa condição médica é difícil na prática clínica. A ecocardiografia pode mostrar um resultado enganoso ou inconclusivo e nem sempre é suficiente para estabelecer o diagnóstico. A melhor caracterização de pacientes com ICFEN e risco maior de morte e complicações relacionadas à IC podem permitir uma uso mais efetivo de intervenções específicas.

Biomarcadores refletem um mecanismo distinto da doença, incluindo ativação neurohumoral, inflamação, dano ao miócito e turnover da matriz extracelular.

O Fator de Diferenciação de Crescimento-15 (*Growth Differentiation Factor-15*) ou GDF-15 é um membro da superfamília de citocinas TGF- β (Fator Transformador de Crescimento Beta), e foi clonado primeiramente como uma citocina inibidora de macrófagos-1¹¹. Estudos anteriores demonstraram que pacientes com ICS tinham níveis circulantes aumentados de GDF-15¹² e foi demonstrado que esses níveis fornecem informação prognóstica além dos fatores de riscos clínicos e bioquímicos estabelecidos^{13,14}.

O objetivo do presente estudo foi testar o valor diagnóstico do GDF-15 na identificação de pacientes com DDVE pré-clínica assintomática ou ICFEN. Além disso, analisamos a associação dos níveis de GDF-15 com diferentes condições de pré-carga.

Métodos

Um total de 119 pacientes consecutivos encaminhados à angiografia coronariana eletiva devido a doença arterial coronariana (DAC) estável ou suspeitada ou avaliação diagnóstica de IC foram incluídos no estudo. Pacientes que necessitavam de revascularização coronariana com angioplastia ou cirurgia de revascularização não foram incluídos do estudo. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética local e consentimento livre e informado foi obtido de todos os pacientes. Os critérios de exclusão incluíram uma fração de

ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) < 50%, DAC conhecida com dor torácica progressiva no último mês, angioplastia coronariana ou infarto do miocárdio há menos de 6 semanas, cardiomiopatia hipertrófica, doença cardíaca valvar moderada a grave, hipertensão não-controlada, fibrilação atrial ou outras arritmias graves ou creatinina sérica > 2,0 mg/dl.

Em pacientes sem diabetes, um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) padrão foi realizado (75 g glicose), de acordo com o protocolo da Organização Mundial da Saúde (OMS), como previamente descrito¹⁵. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso (kg)/altura(m²).

Ecocardiografia

A ecocardiografia foi realizada utilizando um sistema de ultrassom padrão (Vivid 7, General Electric, Milwaukee, Wisconsin). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi medida com base no método biplano de Simpson modificado. O índice de volume do átrio esquerdo (IVAE)¹⁶ foi calculado usando o método área-comprimento biplano¹⁶. As dimensões foram registradas através de técnicas padrão de acordo com as diretrizes atuais¹⁷. O índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) foi calculado pela fórmula de Devereux indexada à área de superfície corporal¹⁷. O fluxo transmitral convencional foi medido por Doppler pulsado. As velocidades precoce atrial (E), tardia atrial (A) e a razão (E/A) foram medidas, obtendo-se a média de três batimentos consecutivos. A imagem por Doppler tecidual pulsado (DTP) foi obtida na junção lateral do anel mitral e septal, obtendo-se a média de três batimentos consecutivos. As velocidades diastólicas precoces (E' medial, E' lateral) foram registradas; o valor médio (E' média) foi determinado da E' nas regiões lateral e medial do anel mitral. As razões de E/E' medial, E/E' lateral e a razão média E/E' foram calculadas. A disfunção diastólica foi classificada de acordo com o estudo de consenso comum das *American Society of Echocardiography* e *European Society of Echocardiography* (ASE, ESC)¹⁰.

Reinalação de gás inerte (Innocor®)

Uma espirometria (dispositivo Innocor® INNO0500) foi realizada para excluir disfunção pulmonar relevante. O débito cardíaco (DC) foi medido utilizando-se um dispositivo de reinalação de gás inerte (RGI) (Innocor®, Innovision A/S, Dinamarca) em um subgrupo com função diastólica normal ou DDVE leve assintomática (DDVE grau I, n = 10) e pacientes com ICFEN (DDVE grau II ou III, n = 10). O método já foi descrito em detalhes em outro lugar¹⁸ e já foi validado em pacientes com IC em repouso e durante exercício^{19,20}. Para o método de RGI, um gás-teste enriquecido com 0,5% N₂O (gás solúvel no sangue) e 0,1% SF₆ (gás insolúvel no sangue) foi utilizado. O volume de gás foi ajustado para atender à demanda fisiológica durante o repouso. O uso de SF₆ permitiu a medida do volume dos pulmões, válvula e bolsa de reinalação. A concentração do gás-teste foi diminuída durante a manobra de reinalação, com uma taxa proporcional ao fluxo sanguíneo pulmonar (FSP). A diminuição da cinética de eliminação do N₂₀ se correlaciona com o FSP e DC na ausência de shunt pulmonar. Antes da mensuração, os pacientes foram instruídos sobre a técnica de reinalação. O

intervalo para medidas foi de no mínimo 3 minutos, para permitir clearance completo do gás inerte. O DC foi medido com o paciente em diferentes posições corporais como um modelo de alterações da carga ventricular e indexado para a área de superfície corporal (ASC, DCi). Após cinco minutos de repouso na posição supina, o DC foi medido três vezes, e então a posição corporal foi mudada de supina para ereta. Após um período de três minutos antes do período mínimo para atingir o equilíbrio hemodinâmico, três medidas consecutivas foram realizadas. As médias das medidas foram obtidas em cada posição.

Análise laboratorial

Amostras de sangue foram obtidas em repouso para análise de parâmetros laboratoriais de rotina e armazenadas a -80°C para análise posterior. Após o descongelamento, GDF-15 foi medido no plasma utilizando-se um imunoenensaio por eletroquimioluminescência pré-comercial e NT-proBNP com um imunoenensaio por eletroquimioluminescência disponível comercialmente em um equipamento analisador automatizado (Elecsys[®], Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) por um investigador cego para as características dos pacientes.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* estatístico SPSS (SPSS 17.0, Chicago, IL). Os dados são apresentados como medianas (variação interquartil) para variáveis contínuas ou números absolutos (%) para variáveis categóricas, salvo especificação em contrário. Valores log-transformados foram usados para análise, quando apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Testes não-paramétricos foram realizados para diferenças de grupos entre categorias. O teste de Kruskal Wallis foi usado para testar a igualdade das medianas entre mais do que dois grupos distintos. O teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças entre as medianas de dois grupos e o teste χ^2 foi usado para avaliar diferenças em proporções em mais de 2 grupos de variáveis categóricas. O teste de Fisher foi usado para comparar dois grupos de variáveis binárias. Os níveis de GDF-15 foram comparados em diferentes graus de DDVE e diferentes categorias das razões médias de E/e' e o IVAE pelo teste de Jonckheere-Terpstra test. A correlação de postos de Spearman foi utilizada para identificar variáveis associadas com GDF-15. Foram construídos modelos de análise multivariada de covariância e de regressão logística, incluindo a variável mais preditiva para as variáveis dependentes. A análise de regressão linear foi aplicada para identificar fatores que estavam associados de forma independente com os níveis de GDF-15.

Resultados

Características dos pacientes

Incluímos 119 pacientes com FE normal (66 anos [59-73]) no estudo (45% do sexo feminino), 63% dos quais tinham DAC sem necessidade de revascularização. Os indivíduos foram classificados como tendo DDVE leve (grau I, $n = 61$), ICFEN (DDVE grau II ou III, $n = 38$) ou função diastólica

normal (FD normal, $n = 20$). Pacientes com ICFEN eram mais velhos, tinham média de classe funcional NYHA mais alta, valores de pressão arterial sistólica e média mais altos, FC de repouso mais baixa e maior probabilidade de ter diabetes, quando comparados com o grupo com FD normal $p < 0,005$ para todos). Um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado em 80 indivíduos, dos quais 35 (92%) apresentaram tolerância normal à glicose (TNG), 31 (26%) intolerância à glicose (IG) e 24 (20%) diabetes melito recém-diagnosticada. Vinte e nove pacientes tinham um histórico de diabetes melito tipo 2 (DMT2) antes da inclusão; assim, 53 (45%) indivíduos incluídos no estudo foram identificados como tendo DMT2. A síndrome metabólica (SM) foi diagnosticada em 51% dos pacientes de acordo com o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (ATP-III) revisado²¹. As características clínicas dos pacientes classificados de acordo com a presença ou ausência de DDVE ou ICFEN são mostradas na Tabela 1 e os dados laboratoriais e parâmetros de avaliação cardíaca estão listados na Tabela 2.

GDF-15 e função diastólica

No grupo de estudo como um todo, os níveis de GDF-15 estavam significativamente aumentados em pacientes com ICFEN (1,08 [0,88-1,30]), quando comparados com os pacientes com FD normal (0,60 [0,50-0,71], $p < 0,001$) ou DDVE leve (0,78 [0,62-1,04], $p < 0,001$). Além disso, os níveis plasmáticos de GDF-15 eram mais altos em indivíduos com DDVE leve, quando comparados a pacientes com função diastólica normal ($p = 0,003$, Figura 1). Ao excluir indivíduos com DAC, os níveis de GDF-15 permaneceram significativamente associados com a gravidade da disfunção diastólica (DD) ($p < 0,001$). Os níveis de GDF-15 estavam intimamente relacionados à classe funcional da *New York Heart Association* (NYHA). Em um modelo de regressão linear multivariado que incluía variáveis conhecidas como estando associadas com a presença de DDVE, idade ($\beta = 0,456$, $p < 0,001$) e presença de DDVE leve ou ICFEN ($\beta = 0,315$, $p = 0,001$) foram identificados como variáveis preditivas de níveis mais altos de GDF-15. Sexo feminino, presença ou ausência de DAC, IMC, histórico de DMT2, infarto do miocárdio prévio, massa muscular do VE e hipertensão não mostraram adição significativa ao modelo (r^2 ajustado = 0,39, $p < 0,001$ para o modelo em geral).

A relação entre os quartis de GDF-15 e as características clínicas ecocardiográficas e níveis de NT-pro-BNP é mostrada na Tabela 3. Aumentos nos quartis de GDF-15 estavam associados com FE mais alta, IVAE mais alto, razão média E/E' septal e E/E' mais alta e mais baixa E' septal, lateral e razão média E'. Além disso, os quartis de GDF-15 estavam associados com níveis mais altos de NT-pro-BNP. Particularmente entre a associação com os parâmetros ecocardiográficos da DD, os níveis de GDF-15 estavam significativamente aumentados no IVAE e razão média E/E', ambos indicativos de pressão de enchimento atrial esquerda elevada (Figura 2a e Figura 2b). Havia uma fraca correlação linear entre o IVAE ($r = 0,354$, $p < 0,001$) e a razão média E/E' com os níveis de GDF-15 ($r = 0,613$, $p < 0,001$).

Em contraste, os valores do strain longitudinal global (SLG), uma ferramenta bastante sensível para detectar

Tabela 1 - Características clínicas

	FD normal	DDVE leve	ICFEN	Valor de p ^a	Todos
Variáveis clínicas					
Idade (anos)	51 (48-58)	67 (60-72)	73 (66-77)	<0,001*	66 (59-73)
Sexo feminino, n (%)	7 (35)	27 (44)	20 (53)	0,426	54 (45)
IMC (kg/m ²)	26 (24-30)	28 (25-31)	27 (25-32)	0,2	27 (25-32)
Circunferência da cintura (cm)	98 (88-110)	107 (96-117)	104 (100-111)	0,96	104 (97-115)
Circunferência do quadril (cm)	98 (91-105)	109 (96-114)	105 (99-114)	0,176	104 (95-114)
PAS (mmHg)	123(110-130)	130(124-140)	133(130-140)	0,002*	130(120-140)
PAD (mmHg)	77(70-80)	80(72-86)	80(70-88)	0,111	80(70-86)
PAM (mmHg)	94 (83-96)	96 (92-101)	99 (93-103)	0,015*	96 (90-102)
Pressão de pulso	42 (40-50)	52 (48-60)	50 (46-70)	0,016*	50 (41-60)
FC repouso (bpm)	73 (68-80)	74 (65-80)	69 (65-77)	0,047*	72 (65-78)
DAC, n (%)	10 (50)	40 (65)	25 (66)	0,417	75 (63)
Histórico de IM, n (%)	5 (25)	11 (18)	12 (32)	0,299	28 (23)
Histórico de derrame, n (%)	0	2 (3)	3 (8)	0,339	5 (4)
Histórico de ACTP, n (%)	9 (45)	28 (46)	19 (50)	0,905	56 (47)
Classe NYHA média	1 (0.5-2)	2 (1-2)	2,5 (2-3)	<0,001*	2 (1-2)
Fatores de risco cardiovascular					
Hipertensão tratada	14 (70)	55 (92)	37 (98)	0,004*	106 (90)
Tabagismo, n (%)	8 (44)	8 (13)	7 (19)	0,013*	23 (20)
Histórico familiar de DAC	7 (35)	40 (66)	16 (43)	0,019*	63 (53)
Hiperlipidemia, n (%)	8 (40)	44 (72)	26 (68)	0,029*	78 (66)
Metabolismo de glicose					
TNG, n (%)	12 (60)	15 (25)	8 (21)		35 (29)
IG, n (%)	5 (25)	17 (28)	9 (24)	0,013*	31 (26)
DM T2 recém-detectada, n (%)	2 (10)	10 (16)	12 (32)		24 (20)
DM T2 conhecida, n (%)	1 (5)	19 (31)	9 (24)		29 (24)
Duração da DMT2 (anos)	2.5 (2-3)	5,5 (2-10)	14 (4-24,5)	0,076	5,5 (2,5-12,5)
Medicamentos					
Inibidor de ECA, n (%)	12 (60)	37 (61)	23 (61)	0,999	72 (61)
Bloqueador do receptor AT1, n (%)	0	11 (18)	12 (32)	0,014*	23 (20)
Diuréticos, n (%)	1 (%)	18 (30)	21 (55)	<0,001*	40 (34)
Bloqueador de Ca ²⁺ , n (%)	3 (15)	8 (13)	13 (34)	0,032*	24 (20)
β-bloqueador, n (%)	11 (55%)	41 (67)	34 (89)	0,009*	86 (72)
Terapia insulínica, n (%)	0	7 (14)	5 (16)	0,355	12 (13)
ADO, n (%)	1 (8)	12 (25)	3 (9)	0,109	16 (17)
Estatinas, n(%)	7 (35)	38 (62)	25 (65)	0,274	70 (59)
AAS, n (%)	10 (47)	51 (83)	29 (76%)	0,021*	90 (76)

Valores são expressos em medianas (variação interquartil) ou n (%). Teste de Mann-Whitney^a, teste Jonckheere-Terpstra, teste de Fisher ou teste χ^2 foram usados como apropriado, * estatisticamente significativa ($p < 0,05$). IMC - índice de massa corporal, PAS - pressão arterial sistólica, PAD - pressão arterial diastólica, DAC - doença arterial coronariana, RM - revascularização miocárdica, FD - função diastólica, ICFEN - insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal, IG - intolerância à glicose, DDVE - disfunção diastólica do VE, TNG - tolerância normal à glicose, FC - frequência cardíaca, PAM - pressão arterial média, ADO - antidiabéticos orais, ACTP - angioplastia coronariana transluminal percutânea, DMT2 - diabetes melito tipo 2.

disfunção sistólica leve, sem considerar a FE normal, não estavam associados com os níveis de GDF-15. Além disso, os parâmetros de geometria ventricular esquerda (índice de

massa do VE, espessura relativa da parede e índice de volume diastólico final do VE) não estavam relacionados aos níveis de GDF-15 (Tabela 3).

Tabela 2 - Dados laboratoriais e parâmetros de avaliação cardíaca de acordo com a função diastólica

	FD normal	DDVE leve	ICFEN	Valor de p ^a
Biomarcador				
GDF-15	0,60 (0,50-0,71)	0,78 (0,62-1,04)	1,08 (0,88-1,30)	<0,001*
NT-pro-BNP	98,5 (56,5-129,0)	96,0 (58,5-178,5)	525,5 (349,0-1,147,0)	<0,001*
Parâmetro de rotina				
Colesterol total (mg/dl)	182 (165-199)	195 (172-225)	198 (164-210)	0,483
LDL-colesterol (mg/dl)	103 (86-125)	111 (92-135)	110 (93-137)	0,495
HDL-colesterol (mg/dl)	51 (42-60)	53 (40-62)	46 (40-56)	0,201
Triglicérides (mg/dl)	133 (111-186)	146 (98-206)	161 (119-212)	0,120
Lp (a) (mg/dl)	7 (5-21)	15 (5-35)	14 (6-58)	0,180
TSH (mU/l)	1,3 (0,9-2,3)	1,4 (0,9-2,1)	1,3 (0,9-1,8)	0,784
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,7-0,9)	0,9 (0,8-1,1)	0,003*
PCRus	0,2 (0,1-0,5)	0,3 (0,1-0,6)	0,3(0,2-0,7)	0,248
HOMA-IR	1,14 (0,7-1,3)	1,6 (1,1-2,7)	1,8 (1,1-3,4)	0,019*
2h-PG (mg/dl)	126 (106-162)	142 (112-191)	170 (130-215)	0,016*
Hba1c (%)	5,7 (5,5-6,0)	6,1 (5,7-6,8)	6,2 (5,8-6,6)	0,015*
Função sistólica				
Fração de ejeção (%)	64 (61-69)	65 (61-70)	70 (63-74)	0,028 ^c
Smax (cm/s)	6,25 (5,65-6,75)	5,90 (5,05-7,15)	6,00 (5,30-6,80)	0,640
GLS (-,%)	20,3 (21,6-18,2)	19,4 (21,8-16,6)	18,4 (21,2-16,4)	0,205
Geometria do VE				
DDFVE (mm)	45 (43-48)	42 (39-47)	45 (42-51)	0,418
IMVE (g/m ²)	79 (63-93)	81 (69-107)	104 (80-135)	0,003 ^c
ERP	0,45 (0,40-0,48)	0,51 (0,46-0,67)	0,55 (0,44-0,63)	0,016 ^c
Função diastólica				
IVAE (ml/m ²)	25 (23-28)	29 (27-31)	42 (37-51)	<0,001 ^d
E (cm/s)	60 (60-75)	60 (50-70)	80 (70-100)	0,001 ^d
A (cm/s)	60 (50-70)	80 (70-90)	80 (70-90)	0,014 ^d
E/A ratio	1,2 (0,9-1,4)	0,8 (0,7-0,9)	1,1 (0,9-1,3)	0,148
E' septal (cm/s)	8,4 (7,6-9,3)	5,8 (5,1-6,7)	5,6 (4,4-6,2)	0,001 ^d
E' lateral (cm/s)	11,1 (10,4-13,0)	7,9 (7,0-9,0)	7,0 (5,4-8,2)	0,001 ^d
E' média	9,7 (9,1-11,0)	7,1 (6,0-7,9)	6,3 (5,2-7,3)	0,001 ^d
Razão septal E/E'	7,9 (7,2-8,6)	10,4 (8,5-12,2)	15,0 (12,3-17,2)	0,001 ^d
Razão E/E' média	6,7 (5,9-7,4)	8,8 (7,4-10,3)	13,2 (10,9-15,4)	0,001 ^d

* estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste de Jonckheere-Terpstra. A - velocidade diastólica tardia transmitral, FE - fração de ejeção, Smax - velocidade sistólica, FD - função diastólica, GLS - strain longitudinal global, AE - átrio esquerdo, E - velocidade diastólica precoce transmitral, E' septal - velocidade diastólica precoce do anel septal ao Doppler tecidual, E' lateral - velocidade diastólica precoce lateral ao Doppler tecidual, ICFEN - insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal, HOMA-IR - Modelo de Avaliação da Homeostase, PCRus - proteína C-reativa ultrasensível, DDFVE - diâmetro diastólico final do VE, Lp (a) - lipoproteína (a), VE - ventrículo esquerdo, IMVE - índice de massa muscular do VE, IVAE - índice de volume do átrio esquerdo; NT-proBNP - peptídeo natriurético pro-B N-terminal, GPP - glicose pós-prandial, ERP - espessura relativa da parede, Smax - velocidade sistólica.

GDF15 e teste hemodinâmico ortostático

Em um sub-estudo, o DCi foi medido através da técnica de reinalação de gás inerte, nas posições supina e ereta, como um modelo de alteração de carga ventricular. Em indivíduos com ICFEN, o DCi foi 1,96 [1,8-2,23] l/m² na posição ereta vs 1,90 [1,6-1,93] l/min em indivíduos com função diastólica normal ou DDVE leve. Após alteração na posição do corpo

de ereta para supina, o grupo com ICFEN apresentou aumento no DCi de 7% [3-16%], enquanto o grupo sem ICFEN apresentou aumento no DCi de 28% [23-16%], $p = 0,002$ (Figura 3a). A resposta do DCi plotada contra os quartis de GDF-15 é mostrada na Figura 3b. Os níveis de GDF-15 estavam negativamente correlacionados com a magnitude da resposta do DCi ($r = -0,67$, $p = 0,005$).

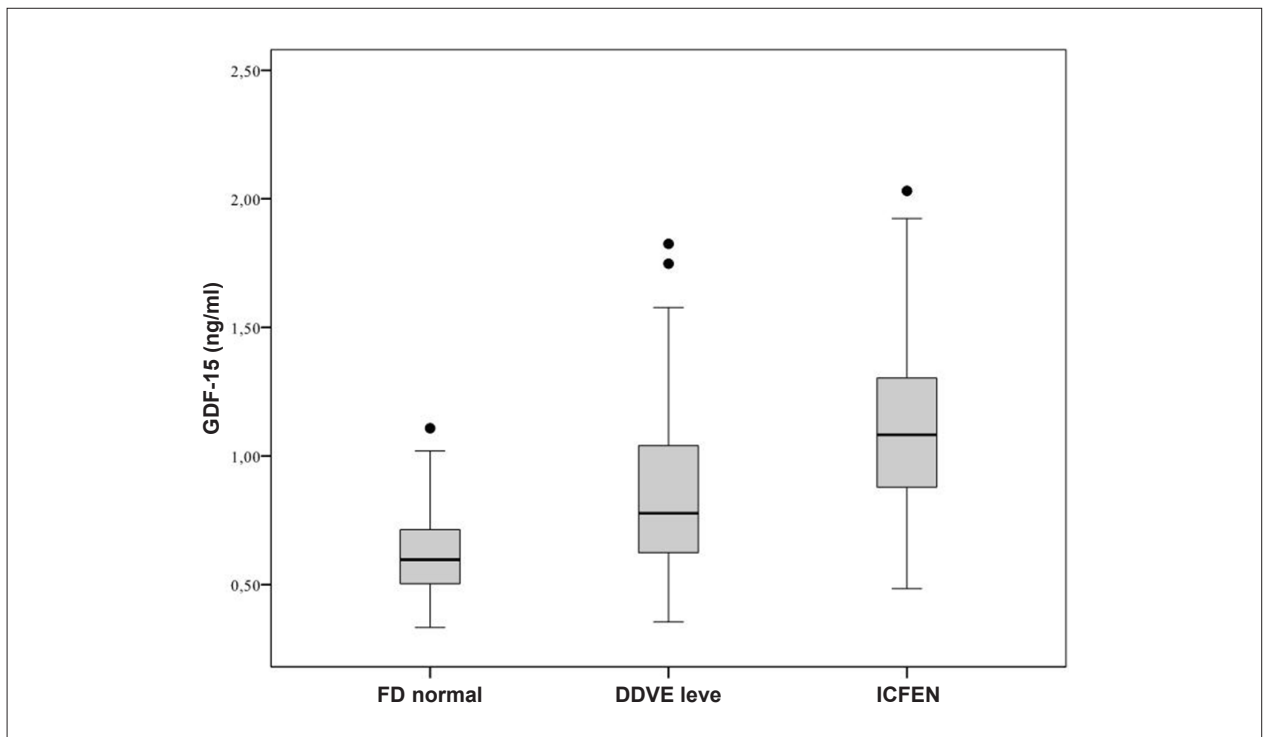


Fig. 1 - Níveis do Fator de Diferenciação de Crescimento-15 ou GDF-15 em pacientes com função diastólica normal, disfunção diastólica leve e insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal. Os níveis de GDF-15 são mostrados em box (percentil 25, mediana, percentil 75) e whisker plots e pontos fora da curva na parte superior são mostrados como pontos negros. FD - função diastólica, GDF-15 - Fator de Diferenciação de Crescimento-15, DDVE - disfunção diastólica ventricular esquerda.

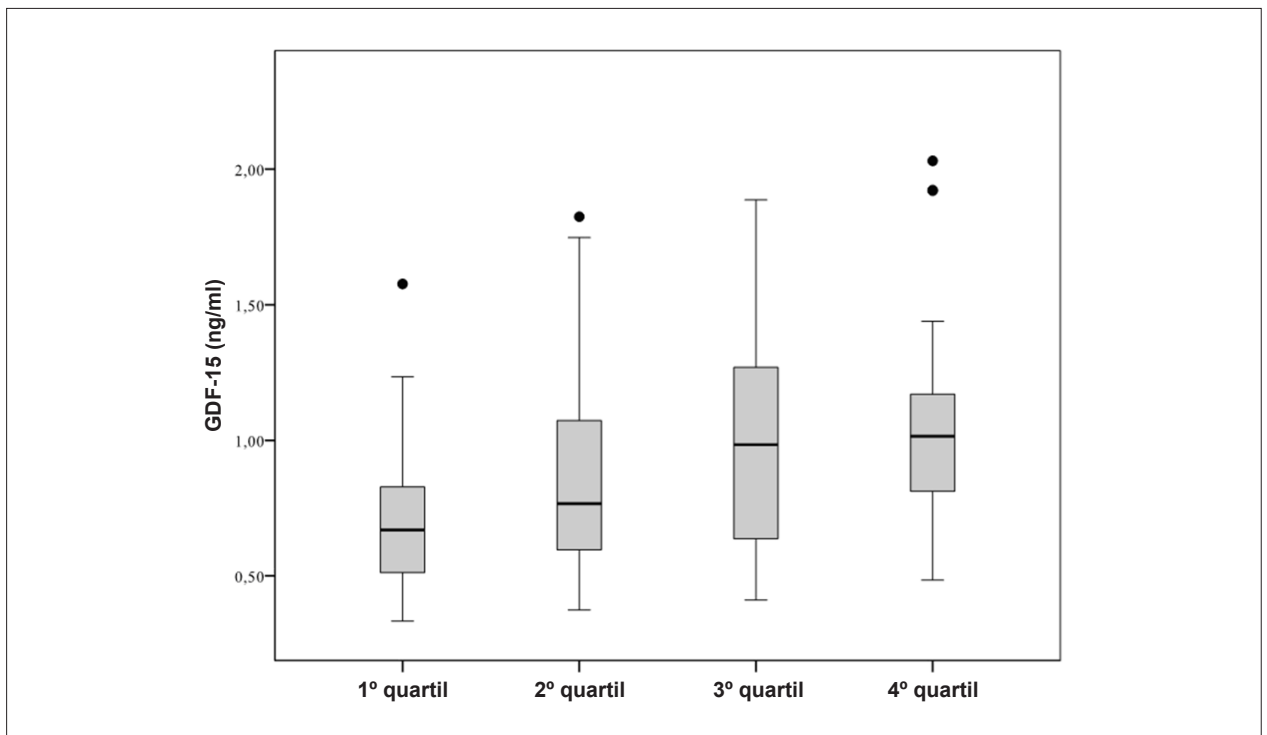


Fig. 2a - Níveis do Fator de Diferenciação de Crescimento-15 estratificados de acordo com quartis do índice de volume atrial esquerdo. Os níveis de GDF-15 são mostrados em box (percentil 25, mediana, percentil 75) e whisker plots e pontos fora da curva na parte superior são mostrados como pontos negros. GDF-15 - Fator de Diferenciação de Crescimento-15. O índice de volume atrial esquerdo no primeiro quartil variou de 19,3-26,7 ml/m² de área de superfície corporal (ASC); no segundo quartil, de 26,7 - 30,2 ml/m², no terceiro quartil de 30,2 - 37,5 ml/m² e no quarto quartil de 37,2 - 82,0 ml/m² ($p < 0,001$ no teste de Jonckheere-Terpstra).

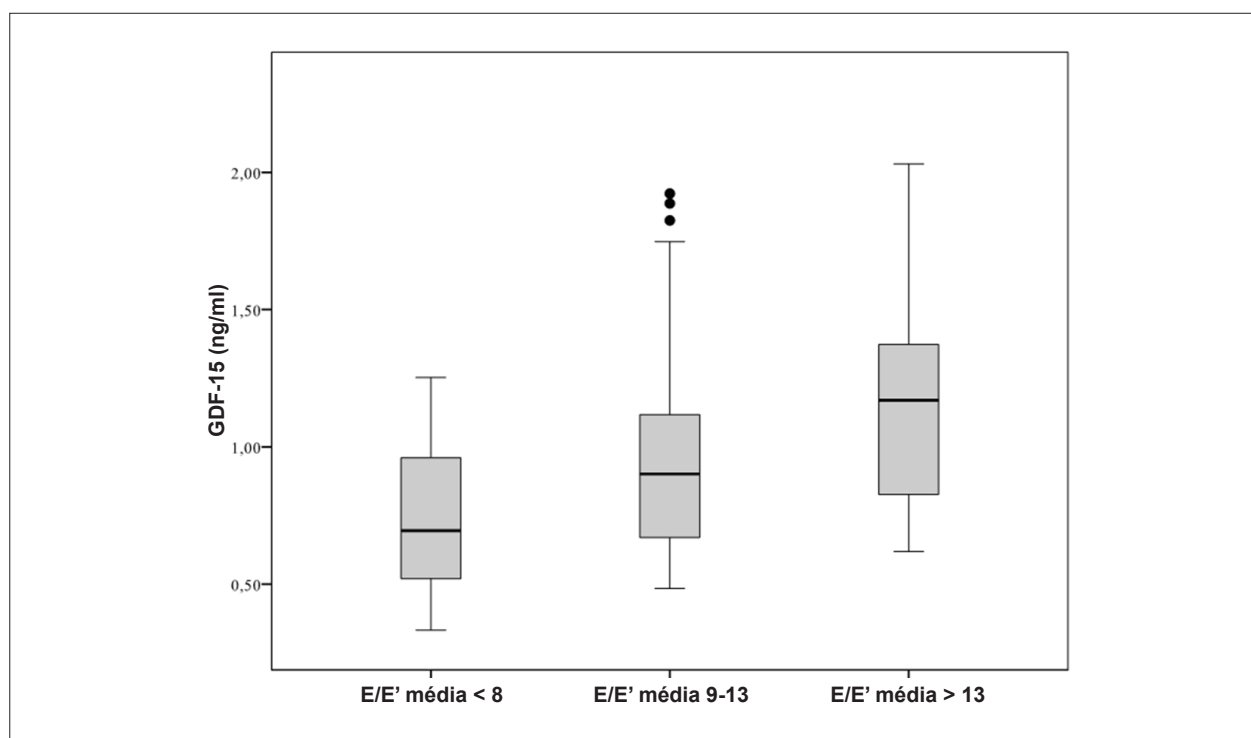


Fig. 2b - Níveis do Fator de Diferenciação de Crescimento-15 ou GDF-15 plotados contra a razão média E/E'. Os níveis de GDF-15 são mostrados em box (percentil 25, mediana, percentil 75) e whisker plots e pontos fora da curva na parte superior são mostrados como pontos negros ($p < 0$, para tendência por Jonckheere-Tepstra). GDF-15 - Fator de Diferenciação de Crescimento-15.

Discussão

Os níveis plasmáticos de Fator de Diferenciação de Crescimento-15 (GDF-15) estão associados com o diagnóstico de ICFEN e DDVE. Além disso, os níveis de GDF-15 aumentam com os graus mais graves de DDVE e podem diferenciar indivíduos com função diastólica normal e DDVE assintomática. Os níveis de GDF-15 se correlacionam com os critérios ecocardiográficos implementados nas diretrizes atuais para o diagnóstico e classificação de DDVE. Esse é o primeiro estudo a mostrar uma associação entre níveis de GDF-15 e resposta do DC à diferentes condições de pré-carga, servindo como um parâmetro funcional de reserva hemodinâmica.

Estudos experimentais mostraram que a expressão de GDF-15 significativamente aumenta no coração depois de várias formas de estresse, incluindo sobrecarga de pressão^{22,23}. Estudos animais mostraram que o GDF-15 promove efeitos protetores, anti-apoptóticos e anti-hipertroficados no coração²³. De acordo com o fato de que o GDF-15 é produzido por vários outros tipos de células além de cardiomiócitos (células endoteliais, adipócitos, macrófagos, células de músculo liso vascular), é provável que esse biomarcador integre informação de diferentes vias da doença, fornecendo conhecimento patofisiológico em pacientes com ICFEN. O promotor de GDF-15 em humanos contém dois sítios de ligação consenso p53 e dois Egr1²⁴. O aumento na expressão do p53 tem sido detectado em miocárdio humano com insuficiência e tem sido sugerido que ele tem um papel na transição de hipertrofia cardíaca para insuficiência cardíaca sistólica²⁵. Egr1 é induzido nas placas ateroscleróticas humanas²⁶ e é

um mediador de hipertrofia por sobrecarga de pressão em um modelo de camundongos²⁷. Assim, o GDF-15 parece ter funções cardioprotetoras; aquelas em ICS e níveis mais altos estão associados com desfechos cardiovasculares adversos. Por conseguinte, os níveis mais altos de GDF-15 em pacientes com estágios mais avançados de DDVE (ICFEN, DDVE grau II ou III) podem refletir uma resposta adaptada que é superior à severidade da doença de base. Como o GDF-15 prediz a mortalidade cardíaca em pacientes com DAC²⁸, infarto agudo do miocárdio²⁹ ou ICS¹³, o GDF-15 pode ser um futuro biomarcador em pacientes com ICFEN, provavelmente indicando prognóstico.

De acordo com as diretrizes atuais, os pacientes podem ser classificados como tendo ICFEN ou DDVE sem a necessidade de evidência objetiva de uma limitação hemodinâmica na tolerância ao exercício, como resultado do aumento nas condições de pré-carga ou pós-carga. É contraditório, na atual abordagem diagnóstica, que os principais sintomas de pacientes com ICFEN estejam relacionados à atividade física³⁰, enquanto o desempenho ventricular obtido em repouso não expresse de forma precisa a tolerância ao exercício e o estado sintomático dos pacientes com insuficiência cardíaca³¹. Consistente com o fato de que a expressão do GDF-15 seja ativada em resposta ao estresse²⁷, nossos dados mostraram uma correlação negativa significativa entre a magnitude da resposta do DCi às alterações na posição do corpo, de ereta para supina, que pode ser considerada um modelo de alteração de pré-carga. A associação da resposta do débito cardíaco reduzido ao estresse da pré-carga e aumento dos níveis de GDF-15 confirmaram a hipótese de que a resposta

Tabela 3 - Parâmetros de avaliação cardíaca de acordo com os níveis de GDF-15

	GDF-15 1º quartil	GDF-15 2º quartil	GDF-15 3º quartil	GDF-15 4º quartil	Valor de p*
Função sistólica					
FE (%)	65 (62-70)	63 (59-68)	65 (61-72)	70 (64-73)	0,021'
Smax (cm/s)	6,60 (5,70-7,15)	5,90 (5,30-7,00)	5,65 (5,00-6,50)	6,10 (5,10-6,90)	0,283
SLG (-,%)	19,0 (21,3-16,9)	18,9 (21,4-16,6)	18,9 (20,5-17,5)	19,0 (22,0-17,1)	0,956
Geometria do VE					
DDFVE (mm)	43 (41-47)	45 (41-49)	44 (39-50)	44 (41-48)	0,851
IMVE (g/m ²)	79 (64-96)	96 (72-108)	83,1 (71-127)	92 (67-117)	0,326
E	0,50 (0,40-0,60)	0,49 (0,44-0,62)	0,54 (0,45-0,63)	0,51 (0,45-0,69)	0,145
Função diastólica					
AE-índice (ml/m ²)	27 (25-30)	29 (24-34)	34 (28-40)	36 (30-46)	<0,001'
E (cm/s)	60 (60-70)	70 (60-70)	60 (50-70)	70 (60-90)	0,047'
A (cm/s)	70 (60-80)	80 (70-90)	80 (70-90)	80 (65-95)	0,129
Razão E/A	0,9 (0,8-0,9)	0,9 (0,8-1,0)	0,8 (0,7-1,2)	0,9 (0,7-1,2)	0,978
E' septal (cm/s)	6,8 (5,3-7,9)	6,1 (5,3-7,6)	5,8 (4,8-6,5)	5,7 (4,1-6,2)	0,002'
E' lateral (cm/s)	9,9 (8,2-10,9)	8,2 (6,9-10,5)	7,6 (7,0-8,6)	7,3 (5,6-8,8)	<0,001'
E' média	8,3 (7,0-9,6)	7,3 (6,1-8,7)	6,8 (6,0-7,7)	6,3 (5,0-7,3)	<0,001'
Razão E/E' septal	8,8 (8,0-11,4)	10,5 (8,5-12,7)	11,4 (8,3-14,1)	14,5 (11,5-17,1)	<0,001'
Razão E/E' média	7,4 (6,7-9,3)	9,0 (7,4-10,5)	9,4 (7,5-11,3)	12,1 (10,1-15,4)	<0,001'
Laboratorial					
NT-proBNP (pg/ml)	98 (64-189)	120 (90-253)	183 (65-502)	406 (117-773)	<0,001'

* estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste de Jonckheere-Terpstra. A - velocidade diastólica tardia transmitral, FE - fração de ejeção, SLG - strain longitudinal global, AE - átrio esquerdo, E - velocidade diastólica precoce transmitral, E'septal - velocidade diastólica precoce do anel septal ao Doppler tecidual, E' lateral - velocidade diastólica precoce lateral ao Doppler tecidual, VE - ventrículo esquerdo, DDFVE - diâmetro diastólico final do VE, IMVE - índice de massa muscular do VE, NT-proBNP - peptídeo natriurético pro-B N-terminal, ERP - espessura relativa da parede, Smax - velocidade sistólica. Os níveis de GDF-15 no primeiro quartil variaram de 0,37 - 0,93ng/ml, no segundo quartil de 0,93 - 1,28 ng/ml, no terceiro quartil de 1,28 - 2,02 ng/ml e no quarto quartil de 2,02 - 3,60 ng/ml ($p = 0,005$ no teste de Jonckheere-Terpstra).

adaptada da expressão do GDF é anulada pela gravidade da doença de base. Isso é reforçado particularmente pela correlação do GDF-15 e o IVAE, um parâmetro que indica anormalidades graves da função diastólica por um longo período de tempo. Um aumento no IVAE sem doença valvular mitral concomitante reflete um efeito cumulativo persistente de diferentes contribuidores para o desenvolvimento de DDVE e, dessa forma, é menos vulnerável a alterações intermitentes na pré-carga (por ex., estado de volume) ou pós-carga (por ex., pressão arterial). Alterações agudas nessas condições durante o diagnóstico ecocardiográfico pode levar à classificação errônea de anormalidades da função diastólica.

O achado de uma associação entre os níveis de GDF-15 e DDVE está em concordância com um estudo recente de Stahrenberg e cols.³² que avaliou a relação em um estudo com base na comunidade. Entretanto, há alguma preocupação em relação a questões metodológicas que podem ter influenciado os resultados apresentados nesse estudo interessante. Mais importante, não houve avaliação da presença da DAC através de testes de estresse não-invasivos ou angiografia coronariana. Como a DAC mostrou estar associada com a elevação dos níveis de GDF-15^{28,33} e DDVE³⁴, a falta de informação sobre a morfologia coronariana é uma fonte potencial de viés em direção ao aumento dos níveis plasmáticos de GDF-15 e em

direção ao aumento da prevalência e/ou gravidade da DDVE. De acordo com as incertezas sobre a presença de DAC, não foi obtida a média da razão E/E' das velocidades medial e lateral, como recomendado pelas diretrizes atuais¹⁰. Devido ao fato de alguns pacientes provavelmente apresentarem anormalidade de movimento regional da parede, o efeito da motilidade de segmentos adjacentes (tethering) podem ter sido uma possível fonte de viés. Além disso, os pacientes não foram submetidos a um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) para diabetes não-detectada, que tem sido associada com aumento nos níveis de GDF-15^{35,36} e a presença e gravidade da DDVE, especialmente em indivíduos com diabetes recém-diagnosticada no TOTG³⁷.

Em contraste, o presente estudo seguiu as atuais diretrizes para o diagnóstico de DDVE em indivíduos bem caracterizados para o grau de anormalidade dos níveis de glicose no plasma e morfologia coronariana. Dessa forma, fomos capazes de reforçar os dados de Stahrenberg e cols.³² em uma coorte diferente de pacientes com morfologia coronariana e estado metabólico conhecidos. Além disso, estendemos os achados até um parâmetro funcional hemodinâmico, pois fomos capazes de demonstrar uma associação entre os níveis de GDF-15 e a diminuição da resposta hemodinâmica em diferentes condições de pré-carga.

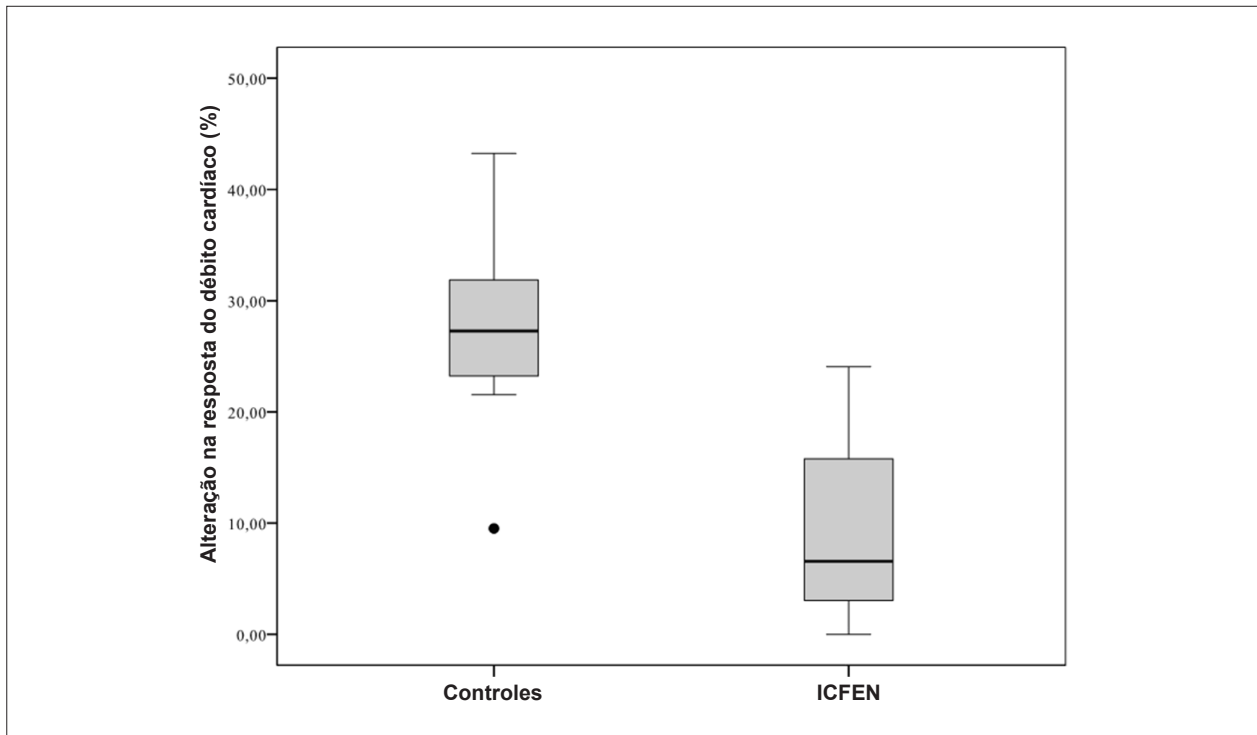


Fig. 3a - Alteração na resposta do débito cardíaco (DC) da posição ereta para supina. O eixo y mostra a alteração no índice de DC causada pelas alterações na posição do corpo de ereta para supina, medido pelas técnicas de reinalação de gás inerte. O índice de DC é apresentado como box (percentil 25, mediana, percentil 75) e whisker plots e pontos fora da curva na parte superior são mostrados como pontos negros. ICFEN - insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal.

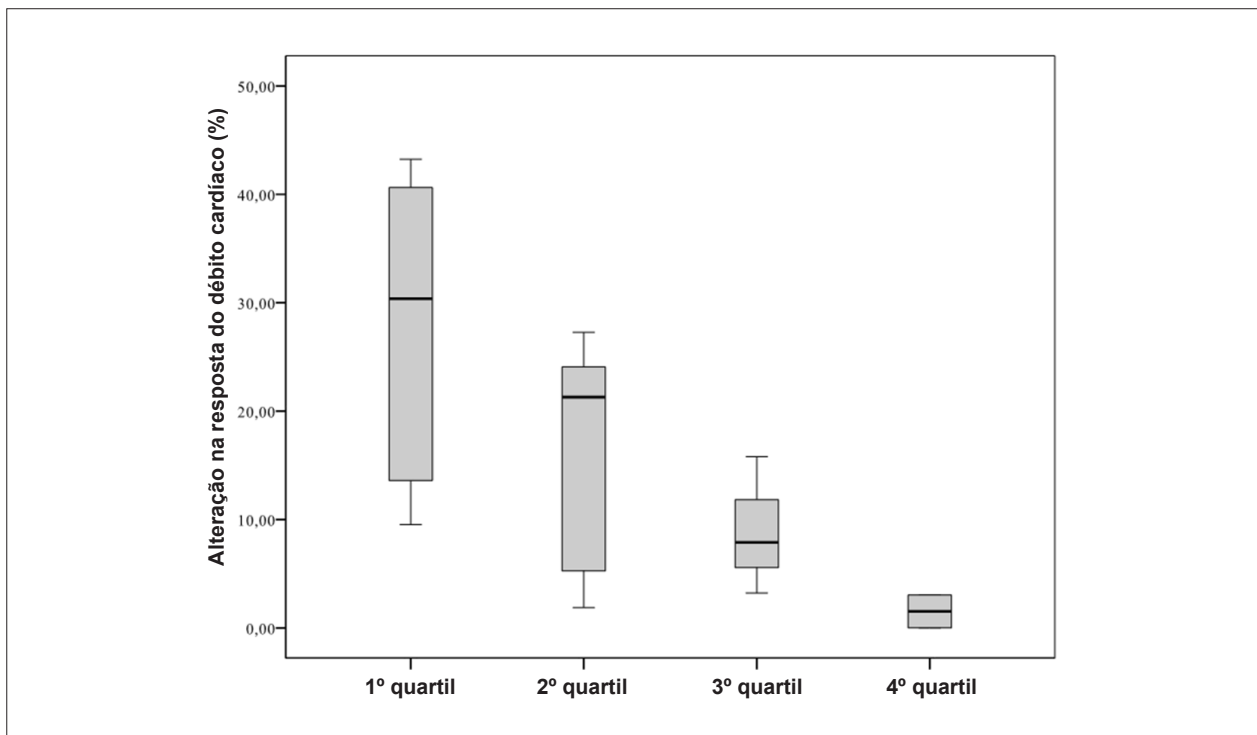


Fig. 3b - Alteração na resposta do débito cardíaco (DC) da posição ereta para supina, estratificada de acordo com os quartis de do Fator de Diferenciação de Crescimento-15 ou GDF-15. O eixo y mostra a alteração no índice de DC causada pelas alterações na posição do corpo de ereta para supina, medido pelas técnicas de reinalação de gás inerte. O índice de DC é apresentado como box (percentil 25, mediana, percentil 75) e whisker plots e pontos fora da curva na parte superior são mostrados como pontos negros. Os níveis de GDF-15 no primeiro quartil variaram de 0,33 - 0,83ng/ml, no segundo quartil de 0,83 - 1,13 ng/ml, no terceiro quartil de 1,13 - 1,54 ng/ml e no quarto quartil de 1,54 - 2,03 ng/ml ($p = 0,005$ no teste de Jonckheere-Terpstra).

Limitações

O número de pacientes, especialmente com FD normal em nossa coorte era relativamente pequeno, resultando em um limitado poder estatístico. Além disso, as taxas de DAC e fatores de risco cardiovascular eram altos nessa população de estudo. Assim, os presentes resultados podem não representar prontamente a população em geral. Além disso, os pacientes com ICFEN eram mais velhos do que aqueles com FD normal, uma fonte potencial de viés em direção ao aumento dos níveis plasmáticos de GDF-15. Entretanto, a associação entre a DDVE e os níveis de GDF-15 permaneceu significativa após o ajuste para DAC, idade, metabolismo da glicose e hipertensão como covariáveis nos modelos de regressão multivariada.

Embora o diagnóstico de DDVE tenha sido baseado em atuais diretrizes, recentemente publicadas, seu valor clínico ainda precisa ser validado prospectivamente.

Além disso, a taxa de pacientes recebendo tratamento antihipertensivo era maior no grupo com ICFEN. Entretanto, uma relação significativa de qualquer desses medicamentos com o aumento dos níveis plasmáticos de GDF-15 nunca

foram identificados. Finalmente, nosso desenho transversal de estudo não permite quaisquer conclusões sobre causalidade.

Conclusão

O GDF-15 é um novo e promissor biomarcador na ICFEN que está elevado em indivíduos com DDVE leve ou moderada a grave, independente da presença de DAC ou outros fatores de risco estabelecidos, frequentemente associados com ICFEN. Considerando o fato de que o GDF-15 parece ter funções cardioprotetoras, nossa hipótese é que níveis mais altos de GDF-15 podem refletir uma resposta adaptadora que é superada pela gravidade da doença subjacente. A incorporação de um biomarcador para ajudar no diagnóstico e previsão de risco na ICFEN pode aumentar a capacidade de identificação precisa e precoce dos pacientes com maior risco para complicações relacionadas à IC. Uma melhor caracterização dos pacientes com ICFEN pode permitir um uso mais efetivo de estratégias terapêuticas e de prevenção específicas. Mais estudos são necessários para determinar o valor do GDF-15 no diagnóstico e monitorização de terapia na IC diastólica.

Referências

- Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med.* 2006;355(3):260-9.
- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2006;355(3):251-9.
- Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC Jr, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA.* 2003;289(2):194-202.
- Mogelvang R, Sogaard P, Pedersen SA, Olsen NT, Marott JL, Schnohr P, et al. Cardiac dysfunction assessed by echocardiographic tissue Doppler imaging is an independent predictor of mortality in the general population. *Circulation.* 2009;119(20):2679-85.
- Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, et al. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J.* 2005;26(3):215-25.
- Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, et al. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2008;359(23):2456-67.
- Persson H, Lonn E, Edner M, Baruch L, Lang CC, Morton JJ, et al. Diastolic dysfunction in heart failure with preserved systolic function: need for objective evidence: results from the CHARM Echocardiographic Substudy-CHARMES. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(6):687-94.
- Hobbs FD, Roalke AK, Davis RC, Davies MK, Hare R. Prognosis of all-cause heart failure and borderline left ventricular systolic dysfunction: 5 year mortality follow-up of the Echocardiographic Heart of England Screening Study (ECHOES). *Eur Heart J.* 2007;28(9):1128-34.
- Paulus WJ, van Ballegoij JJ. Treatment of heart failure with normal ejection fraction: an inconvenient truth! *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(6):526-37.
- Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr.* 2009;10(2):165-93.
- Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AC, Bansal M, He XY, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11514-9.
- Kempf T, Horn-Wichmann R, Brabant G, Peter T, Allhoff T, Klein G, et al. Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay. *Clin Chem.* 2007;53(2):284-91.
- Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(11):1054-60.
- Kempf T, Wollert KC. Growth-differentiation factor-15 in heart failure. *Heart Fail Clin.* 2009;5(4):537-47.
- Rathmann W, Haastert B, Icks A, Lowel H, Meisinger C, Holle R, et al. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia.* 2003;46(2):182-9.
- Peterson LR, Waggoner AD, Schechtman KB, Meyer T, Gropler RJ, Barzilai B, et al. Alterations in left ventricular structure and function in young healthy obese women: assessment by echocardiography and tissue Doppler imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(8):1399-404.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, 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 Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18(12):1440-63.
- Clemensen P, Christensen P, Norsk P, Gronlund J. A modified photo- and magnetoacoustic multigas analyzer applied in gas exchange measurements. *J Appl Physiol.* 1994;76(6):2832-9.
- Agostoni PG, Wasserman K, Perego GB, Guazzi M, Cattadori G, Palermo P, et al. Non-invasive measurement of stroke volume during exercise in heart failure patients. *Clin Sci (Lond).* 2000;98(5):545-51.
- Saur J, Fluechter S, Trinkmann F, Papavassiliou T, Schoenberg S, Weissmann J, et al. Noninvasive determination of cardiac output by the inert-gas-rebreathing

- method--comparison with cardiovascular magnetic resonance imaging. *Cardiology*. 2009;114(4):247-54.
21. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
 22. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2006;98(3):351-60.
 23. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res*. 2006;98(3):342-50.
 24. Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. TGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):109-14.
 25. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007;446(7134):444-8.
 26. McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, Bush H Jr, et al. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2000;105(5):653-62.
 27. Buitrago M, Lorenz K, Maass AH, Oberdorf-Maass S, Keller U, Schmitteckert EM, et al. The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005;11(8):837-44.
 28. Kempf T, Sinning JM, Quint A, Bickel C, Sinning C, Wild PS, et al. Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: results from the AtheroGene study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(3):286-92.
 29. Khan SQ, Ng K, Dhillon O, Kelly D, Quinn P, Squire IB, et al. Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2009;30(9):1057-65.
 30. Kitzman DW, Higginbotham MB, Cobb FR, Sheikh KH, Sullivan MJ. Exercise intolerance in patients with heart failure and preserved left ventricular systolic function: failure of the Frank-Starling mechanism. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17(5):1065-72.
 31. Franciosa JA, Park M, Levine TB. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. *Am J Cardiol*. 1981;47(1):33-9.
 32. Stahrenberg R, Edelmann F, Mende M, Kockskamper A, Dungen HD, Scherer M, et al. Association of glucose metabolism with diastolic function along the diabetic continuum. *Diabetologia*. 2010;53(7):1331-40.
 33. Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, Lindahl B, Olofsson S, Allhoff T, et al. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;116(14):1540-8.
 34. Ohara T, Little WC. Evolving focus on diastolic dysfunction in patients with coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. 2010;25(6):613-21.
 35. Dostalova I, Roubicek T, Bartlova M, Mraz M, Lacinova Z, Haluzikova D, et al. Increased serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine-1 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(3):397-404.
 36. Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P. Plasma growth differentiation factor-15 independently predicts all-cause and cardiovascular mortality as well as deterioration of kidney function in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1567-72.
 37. Futh R, Dinh W, Bansemir L, Ziegler G, Bufe A, Wolfertz J, et al. Newly detected glucose disturbance is associated with a high prevalence of diastolic dysfunction: double risk for the development of heart failure? *Acta Diabetol*. 2009;46(4):335-8.