



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 380 738**

②1 Número de solicitud: 200901923

⑤1 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **24.09.2009**

③0 Prioridad: **20.10.2010 ES ES2010/070622**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.05.2012

⑦1 Solicitante/s: **Fundación para la Investigación
Biomédica del Hospital Gregorio Marañón
Doctor Esquerdo, 46
28007 Madrid, ES**

⑦2 Inventor/es:
**Guisasola Zulueta, María Concepción y
Dulín Iñiguez, Elena**

⑦4 Agente/Representante:
De Elzaburu Márquez, Alberto

⑤4 Título: **Procedimiento mejorado para evaluar el riesgo cardiovascular.**

⑤7 Resumen:

Procedimiento mejorado para evaluar el riesgo cardiovascular. La invención se refiere a un procedimiento que permite refinar el riesgo de un individuo de padecer un evento cardiovascular determinado inicialmente mediante la clasificación en un grupo de riesgo por la aplicación de un método que considera los factores de riesgo cardiovascular clásicos, tal como la carta de riesgo cardiovascular de las Sociedades Europeas. El procedimiento tiene en cuenta la posible influencia que puedan tener en la variación del riesgo cardiovascular los valores de homocisteinemia total, proteína Hsp70i intraleucocitaria y genotipo del gen hsp70-1, permitiendo la recalificación de su grupo de riesgo y, de ser necesario, el establecimiento de medidas preventivas y/o correctoras adecuadas para evitar un evento cardiovascular.

ES 2 380 738 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado para evaluar el riesgo cardiovascular.

5 Campo técnico

La invención se refiere al campo de la prevención de enfermedades, mediante la evaluación del riesgo de contraerla, desarrollarla o experimentar un empeoramiento fatal, con el fin de implantar medidas preventivas o correctoras. Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento mejorado para evaluar el riesgo cardiovascular y, particularmente, la futura ocurrencia de un evento cardiovascular.

Antecedentes de la invención

15 La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en los países desarrollados. En Estados Unidos, es causa del 50% del total de fallecimientos, porcentaje que es superior al de muertes ocasionadas por otras causas tales como cáncer (30%), enfermedad pulmonar (5%), accidentes, enfermedad hepática, suicidios, infecciones y otras causas diversas. La situación en Europa y Asia es similar. En España, aunque la tasa de mortalidad es menor, la enfermedad cardiovascular supone también la primera causa de muerte, al haber provocado un 32,5% del total de defunciones en 2006. Por ello, ha sido objeto de muchos estudios tanto para conocer las bases de la misma como para encontrar factores de riesgo que permitan identificar las personas con mayor riesgo de padecerla y posibilitar la aplicación de medidas correctoras y tratamientos antes de que se produzca un evento fatal.

25 El término “enfermedad cardiovascular” se utiliza a menudo para referirse a la enfermedad cardíaca. Sin embargo, el término es más amplio, ya que engloba cualquier enfermedad del corazón y los vasos sanguíneos. De ellas, más del 75% corresponden a alteraciones de la pared arterial. De hecho, la aterosclerosis, junto con la trombosis, suele ser la base de las enfermedades cardiovasculares que dan lugar a eventos cardiovasculares que pueden ser letales tales como la cardiopatía isquémica (angina e infarto de miocardio), insuficiencia cardíaca, arritmias, enfermedad vascular periférica o accidentes cerebro-vasculares (bien caracterizados por lesiones reversibles (isquémicas) o con muerte de tejido cerebral (infarto)). Así, eventos cardiovasculares como el infarto de miocardio o el ictus (accidente cerebrovascular súbito) pueden producirse por oclusión de las arterias coronarias o de la arteria cerebral.

35 Se entiende por “aterosclerosis” (AT) la formación focal de ateromas (depósitos de lípidos) en la capa íntima de las arterias. Con el tiempo, da lugar a las denominadas placas de ateroma, compuestas por depósitos de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, que obstruyen parcial o totalmente la luz arterial, pudiendo provocar, por ejemplo, isquemia cardíaca, por reducción del flujo sanguíneo que llega al miocardio. En la actualidad, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria difusa de la capa interna arterial, cuya lesión contiene células de sistema inmunológico capaces de causar y dirigir una respuesta inflamatoria. A menudo, la aplicación del término aterosclerosis se considera circunscrita a arterias de mediano y gran calibre. La arteriosclerosis, por su parte, es un término más genérico, que se refiere al engrosamiento y endurecimiento de las arterias, independientemente de su tamaño y de si el engrosamiento y endurecimiento se caracteriza por el depósito de lípidos en la pared arterial, por un engrosamiento proliferativo fibromuscular o endotelial (típico de las paredes de arterias de pequeño calibre y arteriolas) o por la calcificación de la capa media (arterias musculares).

45 El alto porcentaje de muertes causadas por enfermedades cardiovasculares ha llevado a que se hayan realizado muchos estudios para identificar cuáles son los factores de riesgo cardiovascular, es decir, aquellas condiciones que favorecen la ocurrencia de eventos cardiovasculares. La identificación de factores de riesgo cardiovascular se ha considerado desde hace tiempo muy importante, para diseñar estrategias de actuación sobre aquellos factores de riesgo que son modificables y prevenir o disminuir las probabilidades de padecer infartos, accidentes cerebro-vasculares y otras patologías graves que pueden provocar la muerte. En ese sentido, uno de los puntos de referencia es el denominado “*Framingham Heart Study*” (Kanell and McGee, 1979; Gordon and Kanell, 1982), que introdujo el término “factor de riesgo cardiovascular” para referirse al conjunto de rasgos, factores y características que predisponen al desarrollo de la aterosclerosis y la hipertensión. Los factores considerados en dicho estudio son considerados “factores de riesgo clásicos”, tales como edad, hipertensión, tabaco, diabetes e hipercolesterolemia. Posteriormente, se revisó el concepto de factor de riesgo, la utilidad de cada uno para prevenir la aparición de un evento cardiovascular modificando cada factor y su posible utilidad para clasificar a los individuos dentro de grupos de riesgo, publicándose el “*Task Force Report*” de la “*Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention*” (Wood *et al.*, 1998), informe en el que se incluyen recomendaciones para la prevención de eventos cardiovasculares dependiendo del grupo al que pertenezca cada individuo.

60 El riesgo absoluto de desarrollar una enfermedad cardiovascular en un período de tiempo, generalmente establecido en diez años, se estima basándose en la presencia de enfermedad coronaria previa y en la valoración conjunta de los valores de riesgo presentes. Se consideran individuos de alto riesgo aquellos que posean un riesgo absoluto superior al 20% (Wood *et al.*, 1998). El cálculo de riesgo en individuos asintomáticos se realiza sobre la presencia de factores de riesgo. Para ello existen diversas tablas, de entre las cuales las más utilizadas son las que están basadas en el seguimiento de la población del estudio de Framingham antes mencionado, destacando entre ellas las tablas directamente derivadas de dicho estudio (Wilson *et al.*, 1998) así como la tabla de riesgo coronario contenida en el “*Task Force Report*”, a la que se hace alusión a menudo como “*Task Force Chart*”, denominación que se utiliza también en la presente solicitud.

La versión española de la “Task Force Chart” se reproduce en la Fig. 1. Como se puede observar en ella, el procedimiento de clasificación tiene en cuenta la presencia o ausencia y grado de severidad de los factores de riesgo convencionales, tales como el sexo, la edad, estatus de fumador, tipo de vida, obesidad, presión arterial sistólica y colesterol total y cataloga a los individuos en categorías específicas para cada factor. Los datos obtenidos se trasladan a los cuadros reproducidos en la Fig. 1, en los que se integran todos esos factores y se clasifica al individuo en un grupo de riesgo según la categoría previa en la que había sido catalogado para cada factor individual.

A pesar de la gran utilidad del cuadro clasificatorio de la Fig. 1 y de las recomendaciones para el tratamiento de los individuos clasificados de acuerdo con ella, el estudio de factores de riesgo clásicos no llega a predecir exactamente un evento cardiovascular. Así, existe un elevado número de personas asintomáticas con alto riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular sobre las que no se realiza ningún control y que son identificados como individuos sobre los que debería haberse realizado un seguimiento cuidadoso cuando experimentan infartos.

Es por ello que se están buscando otros factores de riesgo con los que refinar la clasificación.

Uno de los posibles factores que ha adquirido un gran interés clínico es la concentración en sangre del aminoácido homocisteína (ácido α -amino- γ -tiobutírico), un intermediario en el metabolismo de aminoácidos sulfurados. Debido a que la homocisteína circula en la sangre en diferentes formas moleculares (como homocisteína libre reducida, formando dímeros entre sí o con la cisteína y, mayoritariamente, unida a proteínas, fundamentalmente a la albúmina), el parámetro que ha adquirido interés diagnóstico y clínico es la llamada homocisteína plasmática total, que es la suma de todas las formas moleculares en las que pueden encontrarse en la sangre, y al que se alude también en la presente solicitud como homocisteinemia total. Aunque existe controversia, los estudios realizados sobre la homocisteína plasmática total parecen indicar que el aumento de su concentración constituye un factor de riesgo vascular coronario, cerebral o periférico independiente de otros factores trombogénicos convencionales (Welch and Loscalzo, 1998; Wald *et al.*, 2002). Además, es un factor de riesgo fácilmente modificable con la administración de ácido fólico y vitaminas B₁₂ y B₆, por lo que se está tendiendo a incluirlo en el estudio de los pacientes que han sufrido un evento cardiovascular.

Dado que el aumento moderado de la homocisteína se considera debido a la disminución de la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo (homocisteína-S-metiltransferasa, cistationina- β -sintasa (CBS) y metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR: EC 1.5.1.20)), las mutaciones de dichas enzimas, especialmente en el gen humano de la MTHFR (cuya secuencia de referencia en la base de datos de NCBI es NM_005957.3), están siendo también objeto de estudio para dilucidar su potencial como posibles marcadores de riesgo de enfermedad coronaria. Especial atención ha recibido el polimorfismo 677C>T, que origina el cambio de alanina por valina en la posición 222 de la proteína, se presenta con elevada frecuencia en la población general (Frost *et al.*, 1995) y que da lugar a una variante de la enzima con sensibilidad térmica.

Uno de los mecanismos propuestos mediante los cuales la homocisteína podría causar daño vascular sería la inducción de estrés en el retículo endoplásmico, al provocar la acumulación de proteínas con errores de plegamiento en el lumen del mismo. Esto activaría la denominada respuesta de choque térmico, la principal reacción a la agresión ambiental y fisiopatológica, que conlleva el cese de la síntesis de muchas proteínas y la inducción de otras, entre las que destacan las llamadas proteínas de choque térmico (Hsp: *heat shock proteins*) y, entre ellas, la familia Hsp70. Numerosos estudios están evidenciando una asociación entre expresión y reactividad de proteínas de choque térmico e inducción de la respuesta inflamatoria que caracteriza el desarrollo de la aterosclerosis, por lo que estas proteínas están siendo también uno de los focos de atención en la búsqueda de marcadores de riesgo cardiovascular. La familia de las caperanas Hsp70 es una de las más estudiadas. Se trata de una familia de ATPasas muy conservadas que, como otras Hsps, se localizan habitualmente en el interior de la célula, aunque pueden encontrarse en forma soluble en plasma junto con anticuerpos anti-Hsp específicos, por lo que son consideradas por algunos moléculas inmunomoduladoras que pueden actuar como potentes autoantígenos. La evidencia acumulada sugiere que las Hsp70 proporcionan protección miocárdica (Radford *et al.*, 1996) y que, en lesiones avanzadas, se sobreexpresan en numerosas células, incluidos monocitos, macrófagos, células dendríticas y células del músculo liso.

También se ha prestado bastante interés a la familia de las HSP60, que parecen jugar un importante papel proaterogénico y que se han podido localizar en la lesión producida en la íntima, mientras que no ocurre así en las regiones sin lesión (Kol *et al.*, 1998). *In vivo*, la inmunización con la vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guerin) incrementa la aterosclerosis, habiéndose descrito un rápido incremento de anticuerpos circulantes anti-Hsp60 posterior a la inmunización (Lamb *et al.*, 2004). Sobre la base de la homología entre las Hsp60 microbiana y humana, el desarrollo de la respuesta inmune de las Hsp60 podría ser responsable del daño producido en la aterosclerosis.

Los polimorfismos de las Hsp, así como su concentración y la de sus anticuerpos específicos, han sido estudiadas como posibles factores de riesgo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, por considerarse que la aterosclerosis, como enfermedad inflamatoria crónica, induciría la síntesis de Hsps en el lugar de la lesión y en las células implicadas en la misma. De entre estas proteínas, la Hsp72 (conocida también como HSPA1A y como Hsp70i, por ser inducible por estrés), es una de las más estudiadas, entre otras razones porque, a pesar de ser una proteína intracelular, puede detectarse su presencia también en la circulación periférica de individuos normales. En humanos, está codificada por el gen *hsp70-1*, conocido también como *hsp72*, *hspa1*, *hspa1b* y *hspa1a* (referencia en GenBank: NT_007592.14), gen que se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21.3, junto a la zona correspondiente a la clase III del complejo mayor de histocompatibilidad. Las variantes de su secuencia, como las de otras proteínas de choque

ES 2 380 738 A1

térmico, parecen estar implicadas en diversas enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas, por lo que se está intentando establecer su posible relación con la aterosclerosis.

Los polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1* han sido objeto de diversos estudios para comprobar su utilidad como marcadores de riesgo cardiovascular. Así, por ejemplo, la solicitud de patente en EE.UU. US2005/089914, describe un método para determinar el riesgo de desarrollar arteriosclerosis e infarto de miocardio, así como la progresión de la enfermedad, analizando un juego de polimorfismos de distintos genes, entre los cuales se menciona el polimorfismo -110A>C (rs1008438) del promotor del gen *hsp70-1*.

He *et al.* (He *et al.*, 2009) también proponen el uso de este polimorfismo, junto con el polimorfismo +190G>C (rs1043618), como marcadores de riesgo de padecer enfermedad coronaria, mencionándose específicamente que el genotipo CC del polimorfismo que se localiza en +190 está asociado a riesgo significativamente alto de padecer la enfermedad.

En consonancia con las estrategias en las que se basan los estudios de Framingham, en la que se recomienda que los factores de riesgo cardiovascular deben considerarse en conjunción para mejorar la evaluación del riesgo y la eficacia de las medidas tomadas, muchos autores han considerado conveniente analizar las relaciones entre los nuevos marcadores de riesgo en estudio, así como su posible correlación con los factores de riesgo clásico y su utilidad para refinar las evaluaciones del riesgo obtenidas mediante su uso. En esa línea, el grupo de los autores de la presente invención ha realizado distintos trabajos buscando posibles correlaciones entre los marcadores de riesgo relacionados con la proteína de choque térmico Hsp70i (los polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1*, los niveles de la propia proteína o los niveles de anticuerpos específicos contra la misma presentes en suero), la homocisteinemia (tHcy) y factores que podrían tener relación con esta última (tales como la presencia o ausencia de mutaciones en el gen de MTHFR y el genotipo asociado a la misma) y las diferencias que pueden presentarse en las relaciones entre dichos factores según el grupo de riesgo de cada individuo resultante de la aplicación del cuadro de riesgo coronario de la *Task Force (Task Force Chart)*.

Así, por ejemplo, un resumen publicado en *Blood* (Dulin *et al.*, 2005) refleja los resultados de estudio epidemiológico en el que los autores analizaron la posible relación que pudiera existir entre la homocisteinemia (tHcy) y parámetros relacionados con la proteína de choque térmico Hsp70i: los anticuerpos anti-Hsp70 o los niveles de proteína Hsp70i presentes tanto en suero como en neutrófilos. Se analiza, además, la posible correlación con un marcador genómico, aunque relacionado con la propia homocisteína y no con la Hsp70i: la mutación 677C>T de la enzima MTHFR, que es el único polimorfismo considerado. Para analizar las correlaciones, los individuos en estudio se dividieron previamente en distintos grupos de riesgo determinados previamente por aplicación de la *Task Force Chart*, quedando clasificados en individuos sin riesgos (grupo G0), individuos con riesgo moderado ($\geq 10\%$) y que no presentaban enfermedad (grupo G1) e individuos con enfermedad aterosclerótica declarada (grupo G2). En función de dicha preclasificación, las correlaciones mencionadas en el documento son las siguientes:

- Inversa entre tHcy y Hsp70i en neutrófilos de mujeres G0 y hombres G1 homocigóticos tipo salvaje (CC) para la mutación 677C>T.
- Inversa entre tHcy y Hsp70i sérica en hombres G1 homocigóticos mutantes (TT) para la mutación 677C>T.
- Directa entre tHcy y proteína C reactiva en mujeres G1 heterocigóticas (CT) para la mutación 677C>T.
- Directa entre tHcy y colesterol en mujeres G0 homocigóticas mutantes (TT) para la mutación 677C>T.
- Directa entre tHcy e hipertensión arterial en hombres G0 heterocigóticos (CT) para la mutación 677C>T.

Los mismos autores han realizado otros estudios epidemiológicos sobre la relación entre la homocisteinemia y las proteínas de choque térmico, aunque los parámetros relacionados con la Hsp70i analizados varían. Así, otro estudio epidemiológico posterior realizado por los autores de la presente invención acerca del promotor del gen *hsp70-1*, la homocisteinemia y los polimorfismos de la MTHFR (Guisasola *et al.*, 2007) indica que la correlación entre los polimorfismos del gen *hsp70-1* y la homocisteinemia podría servir para identificar sensibilidades diferentes al desarrollo de la enfermedad vascular. Aunque diferencias en la nomenclatura de los polimorfismos podría dar lugar a otras conclusiones, el conocimiento de las secuencias de los polimorfismos del gen *hsp70-1* y su comparación con las secuencias flanqueantes de los mismos indica que los polimorfismos denominados -325A>C y -27G>C en la publicación que resume el estudio son los mismos polimorfismos denominados por otros autores -110A>C (rs1008438) y +190G>C (rs1043618). Con esta premisa, la integración de los datos obtenidos sobre la homocisteinemia y los polimorfismos de los genes de la MTHFR y *hsp70-1* según el grupo de riesgo al que pertenecía cada individuo en estudio lleva a las siguientes conclusiones:

- Los individuos heterocigóticos para los polimorfismos -110A>C y +190G>C del gen *hsp70-1* mostraban los valores de tHcy más elevados en todos los grupos.
- Los individuos heterocigóticos para la mutación 677C>T del gen de la MTHFR, pertenecientes a G1, mostraban los valores más altos de tHcy.

ES 2 380 738 A1

- Los individuos homocigóticos para cualquiera de las formas de 677C>T, es decir, tanto AA como CC, mostraban valores de tHcy más altos dentro del grupo G2.
- Los polimorfismos del gen *hsp70-1* no se coexpresan con la mutación 677C>T de MTHFR.
- No existe correlación entre la mutación 677C>T y los polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1*.

Con estos datos, se concluye que la presencia de los polimorfismos del gen *hsp70-1* en heterocigosis podría ser un factor de riesgo adicional para la arteriosclerosis, que podría servir para prescribir terapias preventivas. No se menciona, sin embargo ningún procedimiento detallado para aplicar esta conclusión a la evaluación del riesgo de la población ni los posibles cambios en la clasificación de los individuos a los que podría dar lugar la aplicación de estas conclusiones. La ausencia de correlación entre la mutación 677C>T y los polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1* dificulta el establecimiento de paralelismos y la extrapolación de interrelaciones entre los distintos grupos de parámetros considerados en los estudios cuyas conclusiones de han expuesto más arriba.

Los distintos estudios mencionados demuestran la importancia de algunos parámetros (homocisteinemia, niveles de proteínas de choque térmico, genotipos relacionados con los polimorfismos de los genes que codifican dichas proteínas...) en el riesgo de padecer eventos cardiovasculares, parámetros que parece importante tener en cuenta para realizar una evaluación lo más correcta posible del riesgo cardiovascular. En general, los estudios realizados consideran la influencia de cada parámetro de forma independiente o su posible relación con alguno de los parámetros de riesgo clásico. Parece, sin embargo, que el diseño de un método de evaluación del riesgo cardiovascular que fuera suficientemente fiable para paliar las deficiencias de los métodos actuales, no puede basarse en un único parámetro adicional, que complementa de forma individual las determinaciones realizadas en función de los parámetros de riesgo clásicos, sino que debería tener en cuenta no sólo un juego significativo de los distintos parámetros adicionales que han estado en estudio durante los últimos años, sino las interrelaciones entre ellos y con los factores de riesgo clásicos. Un método que no fuera diseñado siguiendo esos criterios no daría lugar a una adecuada evaluación del riesgo de cada individuo, manteniéndose la problemática actual, de individuos que sufren un evento cardiovascular grave, a menudo mortal, porque su clasificación incorrecta dentro de un determinado grupo de riesgo no ha permitido que se efectuara sobre ellos el adecuado seguimiento y tratamiento que podría haber facilitado la prevención del evento. No tener en cuenta el incremento de la gravedad de la situación que suponga un factor por la presencia o severidad de otro y las interrelaciones entre ellos daría lugar a ese tipo de situaciones. Por otra parte, la ignorancia de la influencia positiva que un factor puede tener en determinar la gravedad de otro o evaluar las interrelaciones entre ellos sin tener en cuenta la influencia que otros factores puedan tener en el grado de influencia de esos factores en el riesgo cardiovascular real, resultado de la interacción de todos ellos, podría igualmente dar lugar a la administración de tratamientos farmacológicos a individuos que realmente no los necesitaban, con el consiguiente gasto de recursos clínicos y tiempo de profesionales de la medicina en el seguimiento intensivo de un individuo que no requería, sometiendo además al individuo innecesariamente al riesgo de padecer los posibles efectos secundarios que los medicamentos recomendados puedan conllevar.

Preferiblemente, además, el método no sólo debería conjugar adecuadamente factores de riesgo clásico con factores nuevos, sino que los factores adicionales deberían seleccionarse de manera que el método de clasificación global fuera sencillo de aplicar en la práctica clínica, tanto por incluir parámetros sencillos de determinar con las técnicas disponibles actualmente en los laboratorios de análisis, como por estar basado en relaciones entre los distintos parámetros fáciles de evaluar y de clasificar fácilmente a los individuos en grupos para los que se puedan determinar fácilmente las decisiones a tomar sobre los posibles cambios a efectuar en su tratamiento o estilo de vida o sobre la falta de necesidad de efectuar cambio alguno.

Sin embargo, los datos disponibles en la actualidad dificultan el diseño de un método que cumpla con esas condiciones. El alto porcentaje de muertes debidas a eventos cardiovasculares y la extensión de dichas enfermedades, sin embargo, hacen muy importante la modificación de los métodos basados únicamente en los factores clásicos, para mejorar la clasificación de los individuos y aplicar las medidas preventivas adecuadas.

La presente invención proporciona una solución a ese problema.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para evaluar el riesgo de padecer un evento cardiovascular en los 10 años siguientes a la evaluación, que complementa las clasificaciones obtenidas al aplicar la *Task Force Chart* de riesgo coronario, considerando factores de riesgo adicionales (hiperhomocisteinemia, niveles de Hsp70i intraleucocitarios y polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1*) y las interrelaciones existentes entre ellos según el grupo de riesgo del individuo deducido a partir de los factores clásicos de riesgo cardiovascular.

La invención se basa en el establecimiento de interrelaciones entre los niveles celulares de la proteína de choque térmico Hsp70i, el polimorfismo -110A>C (rs1008438) del gen *hsp70-1* y el riesgo cardiovascular. En particular, en la presente solicitud se divulga que los niveles disminuidos de Hsp70i en PMN (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos) se asocia con el genotipo mutado del polimorfismo -110A>C y se confirma la existencia de una asociación

ES 2 380 738 A1

entre los niveles de Hsp70i en PMN y el desarrollo y pronóstico de la enfermedad coronaria: el aumento de Hsp70i en PMN protege del desarrollo de la aterosclerosis. Así, los niveles elevados de Hsp70 podrían reducir la adhesión plaquetaria en la inflamación. Se ha confirmado, además, que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo cardiovascular independiente, que se relaciona con la presencia del genotipo homocigótico mutado para 677C>T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

Estos hallazgos permiten complementar los estudios previos realizados, en los que no se consideraba la posible relación que podría existir entre los polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1* y los niveles de la proteína Hsp70i y la influencia que la interrelación entre esos parámetros podría tener en modificar el riesgo cardiovascular preevaluado a partir de la *Task Force Chart*, en función de la homocisteinemia que presente el individuo. Ninguno de esos estudios, además, sugerían que averiguar la posible relación entre esos parámetros pudiera tener ningún interés ni, menos aún, se sugería que pudiera o debieran buscarse relaciones adicionales entre los factores de riesgo cardiovascular analizados en cada estudio en particular o otros estudios para definir un procedimiento de evaluación del riesgo cardiovascular que refinara las clasificaciones obtenidas mediante la aplicación de procedimientos basados en factores de riesgo clásicos tales como las tablas de evaluación del riesgo cardiovascular de las Sociedades Europeas (*Task Force Chart*, reproducida en la Fig. 1).

La combinación de estos hallazgos con los hallazgos previos del grupo de los presentes inventores, referidos a las interrelaciones entre, por un parte, la homocisteinemia y Hsp70i en PMN y, por otra, la homocisteinemia y los genotipos del promotor *hsp70-1*, en ambos casos vinculadas al grupo de riesgo cardiovascular previamente deducido de la aplicación de la *Task Force Chart* de riesgo cardiovascular, han permitido la concepción y la definición de un método que afina la clasificación deducida de la aplicación de dicho cuadro clasificatorio. Esta reclasificación de los individuos permite la modificación de las medidas preventivas y/o correctoras aplicadas a los mismos, haciéndolas más adecuadas a la condición del individuo según la combinación de factores por los que está afectado.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular que comprende las etapas de:

- a) preclasificar al individuo como carente de riesgo vascular (grupo G0), sin enfermedad pero con riesgo vascular moderado ($\geq 10\%$) (grupo G1) o con enfermedad aterosclerótica declarada (grupo G2) a partir de los datos sobre su edad, sexo, estatus de fumador (fumador o no fumador), presión sanguínea sistólica y concentración de colesterol en sangre, aplicando la tabla de riesgo coronario de las Sociedades Europeas (*Task Force Chart*);
- b) determinar, a partir de una muestra de sangre extraída del individuo, los siguientes factores y la clasificación que corresponde al individuo de acuerdo con los valores obtenidos para ellos:
 - i. niveles de proteína Hsp70i intraleucocitaria, calculada a partir de los niveles detectados en los PMN (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos) presentes en la muestra de sangre, calificando al individuo como hipoproducción (L: baja producción), normoproducción (N: producción normal) o hiperproducción (H: producción alta) según el percentil al que pudiera adscribirse su concentración de acuerdo con los valores de un estudio estadístico poblacional previo correspondiente al grupo poblacional al que pertenezca el individuo, de tal forma que aquellos individuos con niveles inferiores al percentil 25 se califican como hipoproducción (L), aquellos con niveles comprendidos entre el percentil 25 y el percentil 75 se califican como normoproducción (N) y aquellos con niveles superiores al percentil 75, se clasifican como hiperproducción (H);
 - ii. niveles de homocisteína plasmática total, calificando al individuo como hipoproducción (L: baja producción), normoproducción (N: producción normal) o hiperproducción (H: producción alta) según el percentil al que pudiera adscribirse su concentración de acuerdo con los valores de un estudio estadístico poblacional previo correspondiente al grupo poblacional al que pertenezca el individuo, de tal forma que aquellos individuos con niveles inferiores al percentil 25 se califican como hipoproducción (L), aquellos con niveles comprendidos entre el percentil 25 y el percentil 95 se califican como normoproducción (N) y aquellos con niveles superiores al percentil 95 se clasifican como hiperproducción (H);
 - iii. genotipo del individuo con respecto al polimorfismo -110 A>C (rs1008438) del gen *hsp70-1*, considerando al individuo homocigótico salvaje (WT) si presenta en los dos cromosomas de la pareja la forma del polimorfismo considerada salvaje (AA), heterocigótico (HT) si presenta una forma distinta del polimorfismo en cada uno de los cromosomas de la pareja (AC), y homocigótico mutante (HM) si presenta en los dos cromosomas la forma del polimorfismo considerada como mutante (CC);
- c) calificar el riesgo del individuo de presentar un evento cardiovascular según la tabla adjunta, de acuerdo con la valoración que aparezca en la celda de riesgo a la que corresponda su grupo de riesgo según la tabla de riesgo coronario de las Sociedades Europeas (*Task Force Chart*), los niveles de producción de Hsp70i determinados a partir de PMN, el nivel de su homocisteína plasmática total (tHcy) y su genotipo para el polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1*:

ES 2 380 738 A1

TABLA 1

Tabla de aplicación del procedimiento de evaluación del riesgo vascular

GRUPO DE RIESGO SEGÚN LA TASK FORCE	GENOTIPO SEGÚN EL POLIMORFISMO -110 A>C DEL GEN HSP70-1										
	WT (AA)			HT (AC)				HM (CC)			
G2	Factor adicional	Hsp70i	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja
		tHcy	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta
	Riesgo		Medio	Elevado	Alto	Elevado	Alto	Alto	Elevado	Alto	Alto
G1	Factor adicional	Hsp70i	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja
		tHcy	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta
	Riesgo		Medio	Medio	Elevado	Medio	Elevado	Elevado	Medio	Elevado	Alto
G0	Factor adicional	Hsp70i	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja
		tHcy	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta
	Riesgo		Bajo	Bajo	Medio	Bajo	Medio	Medio	Bajo	Medio	Elevado

Para facilitar su uso, esta tabla de evaluación puede presentarse en un diseño análogo al de la *Task Force Chart*, en el que las celdas de la tabla presentan códigos de colores distintos para los diferentes grupos de riesgo. Dicha Tabla se presenta en la Fig. 2. Para facilitar la claridad de su comprensión en la presente solicitud, las celdas incluyen también diferentes entramados (líneas paralelas entre sí), de manera que las celdas de un mismo color presentan entramados en los que la inclinación de las líneas del entramado respecto a la vertical es también la misma, pero diferente de la inclinación del entramado de las celdas de un color diferente. Para la aplicación clínica, los entramados serían innecesarios, siempre y cuando la tabla se presentara en forma coloreada. Para evitar confusiones y facilitar la asociación de ideas, los colores elegidos para cada nivel de riesgo siguen el patrón utilizado en la *Task Force Chart* verde: bajo (entramado horizontal, perpendicular al eje más largo de las páginas); amarillo: medio (entramado vertical, paralelo al eje más largo de las páginas); naranja: elevado (entramado con líneas inclinadas respecto a los ejes horizontal y vertical de las páginas); rojo: alto (sin entramado de líneas).

En una posible realización de la invención, el estudio poblacional utilizado sería el estudio de los ensayos que se presentan más adelante en los Ejemplos de la presente memoria, de manera que la clasificación del individuo según su producción de Hsp70i en PMN se haría según los niveles reflejados a continuación:

<u>Percentiles</u>	<u>Clasificación</u>	<u>Hsp70i en PMNs</u>
25	Hipoproducción (Producción baja)	≤16,16 ng/mL
	Normoproducción (Producción normal)	> 16,16 ng/mL y <44,40 ng/mL
75	Hiperproducción (Producción alta)	≥44,40 ng/mL

En otra posible realización, complementaria a la anterior, el estudio poblacional utilizado para la valoración de la producción de homocisteína plasmática total sería también el estudio de los ensayos de la presente solicitud, de manera que se calificaría como hipoproducción aquellos individuos cuya concentración de homocisteína total en plasma fuera menor que 7 μmol/L y como hiperproducción aquellos cuya concentración fuera mayor que 10 μmol/L, siendo normoproducción aquellos que mostraran valores de concentración comprendidos en el intervalo de 7 μmol/L a 10 μmol/L, incluidos dichos valores.

En otra posible realización, alternativa a la anterior, la valoración de producción de homocisteína plasmática total se haría también en función del estudio estadístico presentado en la presente solicitud, pero teniendo en cuenta la segmentación por sexo, de manera que los individuos hiperproductores serían aquellos en los que la homocisteína total superara el valor de 11 μmol/L para mujeres y 13 μmol/L en hombres.

Dado que los polimorfismos -110A>C y +190G>C del gen *hsp70-1* parecen coexpresarse, podría considerarse equivalente la agrupación en función del genotipo asociado al segundo polimorfismo en lugar de al primero. Por ello, otra posible realización del procedimiento de la invención es aquella en la que el polimorfismo cuyo genotipo se analiza es el polimorfismo +190G>C del gen *hsp70-1* (rs1043618).

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la versión en español de las Tablas de Riesgo Coronario, propuestas por las Sociedades Europeas de Prevención de la Enfermedad Coronaria agrupadas bajo la denominación "Task Force", (*Task Force Chart*) para evaluar el riesgo de padecer un evento cardiovascular en los 10 años siguientes al momento de evaluación.

La Fig. 2 muestra una tabla de colores y entramados que sirve para la evaluación del riesgo de padecer un evento cardiovascular aplicando el procedimiento de la invención y las clasificaciones previas de los individuos según los parámetros tenidos en cuenta:

- Genotipo del polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1*: WT (individuos con genotipo AA: homocigóticos, con la forma salvaje del polimorfismo en los dos cromosomas de la pareja donde se presenta el gen *hsp70-1*); HT (individuos con genotipo AC: heterocigóticos, con una forma diferente del polimorfismo en cada uno de los cromosomas de la pareja); HM (individuos con genotipo CC: homocigóticos, con la forma mutante del polimorfismo en los dos cromosomas de la pareja);
- Hsp70i PMNs (clasificación según concentración de la proteína de choque térmico Hsp70i en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos): H: individuos hiperproductores, con producción alta de Hsp70i); N: individuos normoproductores, con producción normal de Hsp70i); L: individuos hipoproductores, con producción baja del Hsp70i);
- tHcy (clasificación según la concentración de homocisteína total en plasma); H: individuos hiperproductores, con producción alta de homocisteína total); N: individuos normoproductores, con producción normal de homocisteína total); L: individuos hipoproductores, con producción baja de homocisteína total);
- G2, G1, G0 (grupo de riesgo del individuo asignado previamente por aplicación de la *Task Force Chart* de la Fig. 1): G2: individuo con enfermedad aterosclerótica declarada; G1: individuo sin enfermedad pero con riesgo vascular moderado ($\geq 10\%$); G0: individuo carente de riesgo vascular;
- códigos de colores y entramados de cada celda (riesgo vascular del individuo en el que la combinación de los parámetros anteriores corresponde a una determinada celda de la tabla, según el color y entramado de la celda): verde: riesgo bajo (entramado horizontal, perpendicular al eje más largo de las páginas); amarillo: riesgo medio (entramado vertical, paralelo al eje más largo de las páginas); naranja: riesgo elevado (entramado con líneas inclinadas respecto a los ejes horizontal y vertical de las páginas); rojo: riesgo alto (sin entramado de líneas).

La Fig. 3 muestra los fragmentos de la secuencia del gen *hsp70-1* (*HSPA1A*) publicada en GenBank (referencia: NT_007592), donde se localizan los polimorfismos denominados -110A>C (panel A) y +190G>C (panel B) en la presente solicitud.

La Fig. 4 muestra el porcentaje que supone cada grupo de producción (hiperproductores (H): zona de los gráficos con relleno oscuro continuo; normoproductores (N): zona de los gráficos con relleno claro gris claro formando rayas horizontales, o hipoproductores (L): zona de los gráficos sin relleno) de Hsp70i en PMNs (HSP70 PMNs) en grupos de sujetos agrupados siguiendo distintos criterios:

- El panel A muestra el porcentaje que supone cada grupo de producción en cada uno de los grupos referidos al genotipo del polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1* (WT: las dos copias del gen presentan la forma salvaje del polimorfismo, AA; HT: individuos heterocigóticos, una copia del gen presenta la forma salvaje del polimorfismo y la otra la mutada; HM individuos homocigóticos en los que las dos copias del gen presentan la forma mutante del polimorfismo, CC);
- El panel B muestra el porcentaje que supone cada grupo de producción en cada uno de los grupos de riesgo cardiovascular (G0: sin factores clásicos de riesgo vascular (FRV)); G1: sujetos con riesgo vascular moderado; G2 sujetos con enfermedad aterosclerótica);
- El panel C muestra el porcentaje que supone cada grupo de producción en los grupos de sujetos obtenidos al agrupar por riesgo cardiovascular y genotipo del polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para evaluar el riesgo de padecer un evento cardiovascular en los 10 años siguientes a la evaluación, que complementa las clasificaciones obtenidas al aplicar la *Task Force Chart* de riesgo coronario (que resultan de la consideración de factores de riesgo cardiovascular clásicos), al considerar las variaciones en el riesgo que la conjunción de los valores correspondientes a factores de riesgo adicionales (hiperhomocisteinemia, niveles de Hsp70i intraleucocitarios y polimorfismos del promotor del gen *hsp70-1*) puedan suponer en el riesgo cardiovascular.

La invención se basa en la concepción de la aterosclerosis como enfermedad inflamatoria crónica, que induce la síntesis de proteínas de choque térmico (Hsp) en el lugar de la lesión y en las células implicadas en la misma, así como en la concepción de las Hsp como moléculas inmunomoduladoras que pueden actuar como potentes autoantígenos, cuyo reconocimiento por los linfocitos T desencadena una respuesta autoinmune implicada en la etiopatogenia inflamatoria de la aterosclerosis. En ese marco, los inventores concibieron la idea de que la expresión elevada de Hsp70i en relación con determinados polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70-1*, podría explicar la resistencia individual o de determinadas poblaciones ante determinados agentes estresantes ambientales o factores de riesgo vascular tales como la hiperhomocisteinemia, que parece inducir una situación de estrés oxidativo en el retículo endoplásmico. Por ello, decidieron estudiar la influencia de los polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70-1* sobre la proteína de choque térmico Hsp70i en relación con los factores de riesgo cardiovascular clásico (preclasificando para ello a los individuos utilizando la *Task Force Chart*) y con factores de riesgo de consideración más reciente, como la homocisteinemia. Para comprobar la influencia global que los resultados obtenidos podrían tener en la determinación del riesgo cardiovascular real del individuo, decidieron verificar y completar los datos sobre relación entre homocisteinemia y niveles del Hsp70i, por un lado, y sobre homocisteinemia y polimorfismos del gen *hsp70-1*, por otro, en función de los grupos de riesgo, y ver las posibilidades que la integración de los datos podría dar para establecer un método de evaluación del riesgo de sufrir un evento cardiovascular que refinara la clasificación obtenida mediante la consideración de los factores de riesgo clásico, especialmente si esa consideración se hacía mediante la aplicación de la *Task Force Chart* de riesgo coronario. Al igual que en los estudios previos complementarios del mismo grupo de investigadores, el estudio se realizó sobre una población que quedó dividida en tres grupos de riesgo: G0 (ausencia de factores de riesgo clásico), G1 (riesgo superior al 10%, sin signos de enfermedad) y G2 (enfermedad aterosclerótica declarada).

El estudio de los niveles intraleucocitarios de Hsp70i se realizó en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, que son leucocitos de 12 a 15 μm de diámetro, que poseen un núcleo lobulado y que contienen en su citoplasma tanto gránulos movilizables intracelulares, del tipo lisosomal o secretorio, como organillos exocíticos de almacenamiento (vesículas secretoras), que actúan como reservorio de proteínas y proporcionan a los neutrófilos la capacidad de responder a diversos cambios en su entorno, lo que dispara procesos estrechamente regulados, tales como la migración y la adherencia a los tejidos inflamados, la liberación de proteínas citotóxicas y proteolíticas y especies reactivas de oxígeno implicadas en la defensa del huésped, así como la fagocitosis. Se consideran parte de la primera línea de reconocimiento y defensa ante agresiones externas, con capacidad de responder ante dichas agresiones y modular la respuesta frente a las mismas. Al haberse relacionado con las Hsp tanto en procesos de reparación como de autoprotección frente a especies reactivas de oxígeno, se consideró interesante realizar un análisis de su contenido en Hsp70i bajo diferentes condiciones fisiológicas, tales como el genotipo del promotor *hsp70-1*.

Los estudios referentes a la Hsp70i y su relación con otros factores se complementaron comprobando también los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes y los niveles séricos de Hsp70i.

La invención se basa en la confirmación de la existencia de una asociación entre los niveles de Hsp70i intraleucocitaria y el desarrollo y pronóstico de la enfermedad coronaria: el aumento de la Hsp70i intraleucocitaria protege del desarrollo de la aterosclerosis. Los niveles elevados de Hsp70i podrían reducir la adhesión plaquetaria en la inflamación. Así, el fenotipo hiperproductor de Hsp70 intracelular se consideraría protector de la enfermedad.

Se ha observado, además, que los niveles disminuidos de Hsp70i en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) se asocian con el genotipo mutado de los polimorfismos -110A>C y +190G>C (polimorfismos que parecen coexpresarse). Además, se ha observado que los individuos del grupo G1 (riesgo cardiovascular moderado) presentan los mayores niveles de Hsp70i en PMN, siendo las mujeres las que presentan los niveles más altos. Los varones del G2 presentan los valores más bajos de Hsp70i en PMN, por lo que éstos tendrían peor pronóstico cuando desarrollen la enfermedad.

Los individuos homocigóticos mutantes para el polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1* (al igual que los individuos homocigóticos mutantes para el polimorfismo -677C>T del gen de la MTHFR) se consideran sujetos con mayor riesgo vascular, ya que en ellos se demuestra correlación entre el aumento de la homocisteinemia total con un aumento de los anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, en respuesta a la síntesis de Hsp70 producida como consecuencia del posible daño vascular.

El aumento de Hsp70i en PMN en sujetos del G0 (ausencia de factores de riesgo clásicos) podría ser indicativo de inicio de agresión celular, con posible aumento de riesgo vascular. Por su parte, los individuos hipoproductores de Hsp70i intracelular pertenecientes al grupo G1, tendrían mayor riesgo.

Del estudio se desprende también que las Hsps circulantes no aportan información como marcador de riesgo cardiovascular, ya que parece que no tienen relevancia clínica en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, pero, sin embargo, podrían reflejar el balance entre las Hsp70 secretadas por arterias sanas y las Hsp70 secretadas por la placa de ateroma. Esto parece ser compatible con la correlación inversa detectada en el grupo G1 entre Hsp70i en PMN y anticuerpos anti-Hsp70 circulantes.

Todos estos hallazgos llevaron a la conclusión de que el fenotipo de Hsp70i y, concretamente, la Hsp70i intraleucocitaria, junto con el genotipo del promotor del gen *hsp70-1*, podrían utilizarse como factor pronóstico de predicción de la evolución de la enfermedad. La conjunción de estos factores con el estudio de la homocisteinemia total (tHcy)

ES 2 380 738 A1

permitiría la identificación de modificaciones en la situación del riesgo del individuo con respecto a las identificadas mediante la consideración de los factores de riesgo clásico.

Por ello, estos hallazgos se combinaron con conclusiones derivadas de estudios previos y confirmadas en el estudio origen de la presente invención, particularmente, con las siguientes:

- La hiperhomocisteinemia se considera factor de riesgo vascular independiente y se relaciona con la presencia del genotipo homocigótico mutante para el polimorfismo 677C>T del gen del metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).
- Los individuos con factores de riesgo vascular presentan valores de homocisteinemia superiores a los individuos del grupo sin factores de riesgo cardiovascular (G0), con significación estadística.
- Los individuos homocigóticos mutantes (TT) para el polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR presentan niveles de homocisteinemia superiores a los individuos heterocigóticos o los homocigóticos para la forma salvaje del polimorfismo (CC), sin que alcance significación estadística. La frecuencia del genotipo TT para la 677C>T en los grupos de riesgo vascular moderado (G1) y con enfermedad (G2) es significativamente superior que en el grupo sin riesgo vascular (G0). Los niveles de homocisteinemia total aumentan con la edad exclusivamente en los individuos heterocigotos (CT) para la 677C>T.
- Los individuos TT para el polimorfismo 677C>T presentan los niveles más altos de homocisteinemia total y de Hsp70i intraleucocitaria.
- Los sujetos con riesgo cardiovascular moderado (G1) presentan la menor concentración de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes y existe correlación estadísticamente significativa ($p<0,01$) con los niveles de homocisteinemia.
- Los sujetos del G2 presentan niveles más bajos de Hsp70i circulantes y, en consecuencia, niveles más altos de anticuerpos anti-Hsp70.
- Los varones tienen tendencia a presentar Hsp70 séricas superiores a las mujeres en todos los grupos de riesgo, especialmente en el G2.
- El polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1* se coexpresa con el polimorfismo +190G>C del mismo gen.

La conjunción de todos estos hallazgos ha llevado a los autores de la invención a concebir el procedimiento mejorado de evaluación del riesgo de padecer un evento cardiovascular, especialmente en los 10 años siguientes al momento de la evaluación, que se esquematiza en la Fig. 2. Dicho procedimiento afina la clasificación obtenida mediante la aplicación de la *Task Force Chart* de riesgo coronario, al tener en cuenta, además de los factores de riesgo clásico, la morbilidad añadida debida a factores adicionales como son el genotipo que presente el individuo para el polimorfismo -110A>C, los valores de la homocisteinemia y la concentración intraleucocitaria de la proteína Hsp70i, particularmente la concentración determinada a partir de los PMN. Se trata, además, de un procedimiento sencillo de comprender y aplicar, que hace uso tanto de los factores clásicos de riesgo cardiovascular como de parámetros adicionales fáciles de determinar, a partir de una muestra de sangre, con los procedimientos y aparatos disponibles en la actualidad para la práctica clínica: la homocisteinemia total, la concentración de Hsp70i en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, y el genotipo del individuo con respecto al polimorfismo -110A>C del promotor del gen *hsp70-1*.

Dado que el polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1* parece coexpresarse con el polimorfismo +190G>C del mismo gen, la aplicación del método de la invención podría realizarse igualmente considerando el polimorfismo +190G>C en lugar del polimorfismo -110A>C.

La aplicación de esta tabla ayuda a definir con mayor precisión el riesgo vascular y con, ello facilita la prevención tanto del desarrollo de enfermedades cardiovasculares como de eventos cardiovasculares fatales, permitiendo la aplicación de medidas preventivas o correctoras adecuadas. La observación de la tabla de la Fig. 2 permite observar que sujetos que según la *Task Force Chart* carecen de riesgo vascular (G0), tras reclasificarlos con el método de la invención, pueden tener un riesgo vascular medio si son bajos productos de Hsp70i intraleucocitaria y tienen niveles altos de homocisteinemia, y riesgo elevado si además son homocigóticos mutantes para el polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1*. De esta manera, un sujeto sano, sin factores de riesgo vascular clásicos (G0), que fuera hiperhomocisteinémico, pasaría a ser de riesgo medio si la concentración de Hsp70i en PMN fuera elevada, tanto en el caso de presentar un genotipo salvaje (AA) como heterocigótico (AC) para el polimorfismo 110A>C del promotor del gen *hsp70-1*, siendo recomendable introducir un tratamiento con, por ejemplo ácido fólico, para intentar reducir esas cifras; si esa misma situación se diera en un sujeto homocigótico mutante (CC) para ese mismo polimorfismo, su seguimiento debería ser más exhaustivo, para plantearse la necesidad de implantar tratamientos adicionales, tales como posibles tratamientos preventivos de la agregación plaquetaria, por tratarse de un paciente con riesgo elevado que, aunque su clasificación según los factores clásicos no lo indicara así. La situación sería similar en un sujeto sin aterosclerosis declarada, pero con un riesgo $\geq 10\%$ según los parámetros clásicos: en caso de presentar hiperhomocisteinemia y Hsp70i intraleucocitaria baja, habría que implementar las medidas preventivas: estricto control del perfil lipídico (aumentando incluso la dosis

de estatinas), administración de ácido fólico, ser riguroso con el ejercicio físico y el control de peso, administración de antiagregantes plaquetarios y controles periódicos más estrictos con realización de electrocardiogramas, posiblemente con ergometría. Con los pacientes con aterosclerosis declarada y/o existencia de algún evento cardiovascular previo, el tratamiento y el seguimiento debe ser exhaustivo; sólo la situación en la que se conjugaran homocisteinemia baja, Hsp70i intraleucocitaria alta y genotipo salvaje para el polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1* permitiría relajar el seguimiento y tratamiento.

En cuanto al tratamiento antiagregante a utilizar, como sucede habitualmente, la elección del fármaco más adecuado dependerá de la familiaridad de cada médico con el fármaco y la evaluación del cociente riesgo/beneficio que ese fármaco pueda suponer según los efectos secundarios que pueda causar en el individuo. Puede elegirse, por ejemplo, entre los más utilizados, como son ácido acetilsalicílico, ticlopidina y clopidogrel, siendo el ácido acetilsalicílico el más ampliamente utilizado, a dosis de aproximadamente 100 mg diarios. Pero la administración de este fármaco por vía oral estaría contraindicada, por ejemplo, en pacientes con antecedentes de úlcera gástrica, por lo que, en esos casos, sería preferible optar por otros.

La utilidad de la tabla y la importancia de su aplicación queda ilustrada por el caso concreto de uno de los pacientes incluidos en el estudio, que reunía todos los factores de riesgo (hiperhomocisteinemia, baja producción de Hsp70i y homocigoto mutante para el polimorfismo -110A>C del gen *hsp70-1*: considerando factores de riesgo clásico, su médico le retiró la antiagregación; unos meses después, sufrió un infarto cerebral a la edad de 44 años. Su neurólogo ha considerado conveniente reintroducir la antiagregación, tal como aconsejaba su clasificación por aplicación de la tabla de riesgo de la presente invención y, en el momento de redactar la presente solicitud, el paciente está asintomático.

El procedimiento se ha deducido a partir de los datos obtenidos en un grupo poblacional concreto. Es por ello que, para evitar ligeras variaciones debidas en la producción de homocisteína plasmática total y, principalmente, de proteína Hsp70i intraleucocitaria, debidas no sólo a variaciones específicas en las condiciones entre grupos poblacionales, sino a variaciones en las concentraciones detectadas debidas a diferencias en los métodos de determinación empleados, el procedimiento de evaluación del riesgo vascular se ha definido de forma general con referencia a un estudio estadístico específico realizado para el grupo poblacional al que pertenezcan los individuos que se vayan a evaluar, definiendo las condiciones de “hiperproductor”, “normoproducción” e “hipoproducción” en función de la pertenencia de los valores concretos determinados para ese individuo a determinados percentiles de la distribución estadística obtenida para el grupo poblacional de que se trate. Debe quedar claro, sin embargo, que el concepto de “grupo poblacional” puede ser universal, y que los valores que marcan los límites entre los percentiles considerados en la definición general del procedimiento pueden ser sustituidos por valores establecidos por estudios poblaciones extensivos, que marquen un límite que determine la hiperproducción y un límite para la hipoproducción.

La invención se explica ahora con más detalle mediante los Ejemplos y Figuras que se exponen a continuación.

Ejemplos

Los ensayos descritos en los siguientes Ejemplos se llevaron a cabo con los siguientes materiales y métodos:

- Población del estudio

La población estudiada incluye personas voluntarias, trabajadores (activos o no) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Los criterios de inclusión establecidos en el estudio fueron:

- 1) personas de ambos sexos, de edad comprendida entre los 40 y 60 años, y
- 2) que otorgan su consentimiento informado. El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación y la Comisión de Ética de la Investigación Clínica del Centro.

Los criterios de exclusión aplicados fueron:

- Mujeres gestantes o lactantes.
- Sujetos con infección sistémica en los últimos tres meses.
- Sujetos que presenten:
 - Enfermedad oncológica o se hallen en tratamiento radio/quimioterápico.
 - Enfermedad autoinmune (artritis reumatoide, lupus eritematoso, sarcoidosis).
 - Trastornos endocrinos (excepto diabetes).

ES 2 380 738 A1

- Enfermedad hepática.
- Insuficiencia renal, glomerulonefritis.
- Trastorno cardíaco congénito.
- Enfermedad oncohematológica.

5

10 En un período de 5 meses, se reclutaron 106 voluntarios, estratificada por sexo. Todos ellos cumplían los criterios de inclusión establecidos en el estudio.

15 Así mismo, se incluyeron en el estudio 5 pacientes con patología vascular (3 mujeres y 2 varones), 3 de ellos ingresados en el hospital y los otros 2 pacientes ambulantes en seguimiento extra hospitalario, a los que se detectó una hiperhomocisteinemia moderada en el momento del estudio. Tras la entrevista se incorporan al estudio 4 miembros de la familia de uno de los pacientes, 3 de los cuales presentan edades comprendidas entre 30 y 40 años. Uno de ellos había sufrido un evento cardiovascular 2 años antes. Todos los pacientes y familiares otorgaron el consentimiento informado.

20 El estudio se realiza sobre un total de 115 personas, 58 mujeres y 57 varones.

Con todos ellos se llevó a cabo una entrevista en la que se realizó anamnesis y encuesta epidemiológica, que incluía edad, antecedentes médicos personales y familiares, tratamientos y aparición o presencia de enfermedad aguda o crónica. Se tomó presión arterial y se realizó la extracción de sangre para las determinaciones analíticas correspondientes.

25

- Clasificación de la población en estudio

30 El índice de riesgo coronario de los individuos participantes se obtuvo considerando la presencia o ausencia y grado de severidad de cada uno de los factores de riesgo convencionales, teniendo en cuenta el sexo, la edad, estatus de fumador, tipo de vida, obesidad, presión arterial sistólica y colesterol total. La Tabla que se presenta a continuación recoge los criterios establecidos para catalogar a los individuos en función de cada factor individual:

35

TABLA 2

Clasificación de la población según factores de riesgo clásicos

40

<i>Se considera situación de</i>	<i>Criterio</i>
<i>HIPERCOLESTEROLEMIA</i>	<i>Colesterol > 200 mg/dl</i>
	<i>LDL-colesterol > 115 mg/dl</i>
	<i>HDL-colesterol < 40 mg/dl</i>
<i>HIPERTRIGLICERIDEMIA</i>	<i>Triglicéridos > 180 mg/dl</i>
<i>HIPERGLUCEMIA</i>	<i>Glucosa ayunas: 90-120 mg/dl</i>
	<i>Post prandial: 130-160 mg/dl</i>
<i>HIPERTENSION ARTERIAL</i>	<i>> 140 / 90 mm Hg</i>
<i>ESTATUS de FUMADOR</i>	<i>n° cigarillos/día: 0 (0)</i>
	<i>n° cigarillos/día: 1-10 (1)</i>
	<i>n° cigarillos: 10-20 (2)</i>
<i>ALCOHOL</i>	<i>Ingesta: <40 g/día (+)</i>
	<i>40-80 g/día (++)</i>
	<i>>80 g/día (+++)</i>

55

60 En particular, el 71,3% de la población en estudio se definió como no fumador, el 15,7% fumaba 1-10 pitillos/día y el 13,0% declaró fumar 10-20 pitillos/día. En cuanto a la ingesta de alcohol, el 53,0% manifestó no ingerir alcohol, el 39,1% declaró una ingesta de alcohol menor que 40 gramos/día, el 7,0% ingería 40-80 gramos/día y el 0,9% ingería más de 80 gramos de alcohol diarios.

65 Tras la aplicación de la carta de riesgo coronario reproducida en la Fig. 1, los individuos participantes en el estudio quedaron clasificados en los siguientes tres grupos:

- Grupo 0 (G0): Incluye aquellos sujetos sin ningún factor de riesgo vascular.

ES 2 380 738 A1

- Grupo 1 (G1): Incluye los sujetos con factores de riesgo vascular moderado ($\geq 10\%$) y que no presentan enfermedad.
- Grupo 2 (G2): Incluye los sujetos con enfermedad aterosclerótica declarada.

5

- Obtención y manejo de muestras de sangre. Estudio bioquímico

10 Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción, preferiblemente tras doce horas de ayuno, para que sean válidas para el estudio bioquímico. Se estableció el volumen y tipo de muestra (suero o plasma) necesario para las determinaciones analíticas previstas, y se extrajeron:

- 5 ml de sangre recogidos sobre tubo con gel separador para obtención de suero y estudio bioquímico que incluye los siguientes analitos: Colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos y glucosa.
- 2 ml de sangre recogidos sobre tubo con EDTA (anticoagulante) para medición de homocisteína total plasmática.
- 2 ml de sangre recogidos sobre tubo con EDTA para extracción de ADN y estudio de polimorfismos de la metilentetrahidrofolato reductasa.
- 2 ml de sangre recogidos sobre tubo seco para medición de: RCP, Hsp70i y anticuerpos anti HSP70 y anti-HSP60 en suero.
- 10 ml de sangre recogidos sobre tubo con EDTA, para el aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos por gradiente.

25

30 Las muestras obtenidas para el estudio bioquímico, se enviaron al Servicio de Bioquímica, siguiendo las indicaciones establecidas por éste y se procesaron dentro de la rutina diaria, sin que se requiera precauciones especiales en la preanalítica. Sin embargo, se cumplieron los requisitos específicos de preanalítica para las siguientes determinaciones:

- Los tubos conteniendo las muestras de sangre obtenidas para la medición de homocisteína, se trasladaron en frío al laboratorio. El tiempo transcurrido desde la extracción de sangre hasta la separación del plasma por centrifugación, no superó los 60 minutos. El plasma se almacenó a -40°C hasta su cuantificación.
- Las muestras obtenidas para el aislamiento de PMN se trasladaron de inmediato al laboratorio de Biología Celular para proceder a su extracción, no siendo necesario su transporte en frío. El tiempo transcurrido desde la obtención de sangre hasta la extracción en el laboratorio fue inferior a 30 minutos.

40

45 Para la realización del estudio bioquímico, se obtuvo el suero de las muestras por centrifugación, dividiéndolo en alícuotas. Una de las alícuotas se envió al laboratorio de Bioquímica, donde se efectuó la medición de: colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos y glucosa, utilizando para ello el analizador Roche/Hitachi MODULAR ANALYTICS SWA (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España). Otra alícuota se congeló a -70°C para posibles comprobaciones y análisis posteriores.

- Medición de homocisteína plasmática total

50

La cuantificación de los niveles de homocisteína total en plasma (tHcy) se realizó mediante un procedimiento analítico de cromatografía líquida de alta resolución, utilizando reactivos BioRad, en condiciones adaptadas y estandarizadas en el laboratorio. Las condiciones cromatográficas fueron:

55

- Cromatógrafo Kontron (bomba, inyector automático, horno de columna).
- Columna de fase reversa C18 de 70 mm x 3,2 mm (BioRad: Cat. No. 195-4076).
- Detector fluorescente SF-25, Kontron (Em:385 nm y Ex:515 nm).
- Fase móvil (BioRad: Cat.No. 195-4077), en un sistema isocrático con un flujo de 0,8 ml/min.

60

65 La cuantificación de homocisteína total en plasma, requiere liberar previamente la fracción de homocisteína unida a proteínas, lo que se realizó mediante reducción con trialquilfosfina. Se utilizó un método con derivatización precolumna y añadiendo estándar interno.

ES 2 380 738 A1

5 A 25 μl de calibrador (Cat No 195-4082), controles y plasmas, se añadieron 50 μl de estándar interno (Cat.No. 195-4084), 25 μl de trialquilfosfina (Cat.No.195-4081) y 25 μl de 4-(aminosulfonil)-7-fluorobenceno-2-oxa-1,3-diazol (ABD-F), como derivatizante (Cat.No. 195-4079). Se incubó 5 min a 50°C. Después de enfriar, se añadieron 50 μl de tricloroacético, para precipitación de proteínas y se centrifugó (12000 rpm, 15 min., 4°C). 20 μl del sobrenadante obtenido se inyectaron en el cromatógrafo.

10 El tiempo de desarrollo del cromatograma es de 5 min. Este sistema es capaz de separar glutation, cisteína (Cys), el estándar interno (IS), homocisteína (Hcy) y el dipéptido cisteína-glicina (Cys-Gly). El tiempo de retención de la Hcy es de 2,44 min. El estudio de imprecisión incluyó controles (BioRad: Cat.No. 195-4085) a dos niveles de concentración de tHcy (C1=9,8 y C2=33,0 $\mu\text{mol/L}$) y se calcularon los %CV (coeficientes de variación porcentuales) intra e interanálisis.

15 Se realizó también un test de paralelismo, para el cálculo de la inexactitud, preparando diluciones sucesivas (1:1) con fase móvil a partir del control alto (38,5 mmol/L).

La concentración de tHcy de muestras y controles se calcula según la formula:

$$20 \quad [\text{tHcy}]_{\text{muestra}} = \text{Factor tHcy} \times \text{relación área pico (tHcy / IS)}_{\text{muestra}}$$

$$25 \quad \text{Factor tHcy} = \frac{[\text{Hcy}]_{\text{calibrador}} \mu\text{mol/L}}{\text{relación área pico (tHcy / IS)}_{\text{calibrador}}}$$

donde "IS" es el estándar interno.

30 - Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN)

35 El aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos se realizó mediante un procedimiento de separación en gradiente. El proceso se realizó en condiciones de esterilidad, manipulando las muestras en campana de flujo laminar. Todos los materiales empleados deben ser debidamente tratados para evitar posibles degradaciones debidas a proteasas. Para ello, en tubos de centrifuga estériles (NUNC), se añadieron 3,5 mL de Polymophprep™ (NYCOMED: ref LYS 3702), con una $\sigma = 1,113 \pm 0,001$ g/ml a 20°C, sobre el que se depositaron lentamente 5 ml de sangre. La preparación se centrifugó a 450-500 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta centrifugación, los elementos formes de la sangre se separan por gradiente, quedando los eritrocitos en el fondo y, por encima de ellos, dos bandas más claras, de las que la banda inferior corresponde a los PMN.

40 Se recogió la banda inferior y se depositó sobre una solución tampón fosfato PBS (17.11 mM NaCl, 0.335 mM KCl, 0.44 mM KH_2PO_4 , 1.016 mM Na_2HPO_4 pH=7,2), y se volvió a centrifugar a 400 g durante 5 min. El precipitado obtenido con los PMNs se resuspendió en 100 μL de tampón de ruptura RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$ y pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$).

50 Para la obtención de la fracción soluble, los lisados celulares se homogenizaron mediante 40 pases de homogenizador Kontes y se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Se recogió el sobrenadante y se guardó a -70°C hasta su posterior procesamiento. Para determinar la viabilidad de los PMNs, se empleó el test de exclusión del azul tripán.

55 El contenido en proteínas de la fracción soluble se valoró por el método de microensayo de Lowry, utilizando el kit comercial para valoración de proteínas de BioRad (Alcobendas, Madrid). La curva de calibración se preparó a partir de una solución de albúmina en un intervalo de 0-10 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras de PMNs se diluyeron hasta una conseguir una concentración proteica constante de 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$.

60 - Cuantificación de proteínas Hsp70i intraleucocitarias y séricas

La cuantificación de los niveles de Hsp70i intraleucocitarias y séricas se realizó mediante un enzimoimmunoanálisis tipo "sándwich" comercial (Stressgen, StressXpress™ EKS-700, Hsp70 ELISA Kit), en microplaca recubierta de anticuerpo monoclonal anti-Hsp70, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

65 Se preparó una curva de calibración con 5 puntos, partiendo de un estándar de [Hsp70i] = 10 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo un intervalo de 0,78-50 ng/mL, así como un blanco de reacción. Se pipetearon por duplicado 100 μl de los estándares, muestras de suero (diluidas 1:5) y muestras de PMNs diluidas a un contenido proteico de 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. La Hsp70i circulante se une al anticuerpo monoclonal formando un complejo que queda fijado a la microplaca. La adición de an-

ES 2 380 738 A1

ticuerpos policlonales de conejo específicos contra estas proteínas y un sustrato de tetrametilbenzidina genera un color azul de intensidad proporcional a la cantidad de Hsp70i de cada muestra. La reacción se para añadiendo H_2SO_4 2N. La intensidad de color producido, se leyó a una longitud de onda de 450 nm (referencia 540-570 nm). La concentración de Hsp70i de las muestras, expresada en ng/ml, se obtiene por interpolación en la curva estándar bilogarítmica, de las absorbancias obtenidas en las muestras desconocidas.

- Cuantificación de anticuerpos anti-Hsp70 o anti-Hsp60 circulantes

La cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 o anti-Hsp60 en suero se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial (Stressgen, StressXpress™, EKS-750 Anti-Human Hsp70 (IgG/IgM/IgA) ELISA Kit o Anti-human Hsp60 (total) ELISA Kit), en microplaca recubierta de Hsp70 ó Hsp60 humana recombinante, capturando, respectivamente, los anticuerpos anti-HSP70 ó anti-HSP60 presentes en el suero. La detección de los anticuerpos anti-HSP70 ó anti-HSP60 capturados, se realizó mediante la adición de un anticuerpo policlonal específico para IgG, IgA y IgM, conjugado con peroxidasa (Anti-Human GAM-HRP Conjugate). El ensayo se desarrolló utilizando un sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) que produce un color azul, proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HSP70 o anti-HSP60 capturados. El desarrollo del color se paró añadiendo solución ácida, lo que da lugar a un color final amarillo.

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se preparó una curva de calibración con 6 puntos, con las siguientes particularidades según el anticuerpo a determinar:

a) en el caso del anti-HSP70, partiendo de un estándar de Anti-HSP70 de concentración 10 $\mu\text{g/mL}$ proporcionado por el fabricante, obteniendo un intervalo de 31,25-1000 ng/mL;

b) en el caso del anti-HSP60, partiendo de un estándar de Anti-HSP60 humano de concentración 2,5 $\mu\text{g/mL}$ proporcionado por el fabricante, obteniendo un intervalo 7,81-250 ng/mL.

También se preparó un blanco de reacción.

Se pipetearon por duplicado 100 μL de los estándares y muestras de suero (diluidas 1:1000) y se incubó 2 horas a T^a ambiente. Tras un lavado de la microplaca, se añadieron 100 μL del anticuerpo policlonal específico de IgA, IgG, IgM conjugado con peroxidasa y se incubó de nuevo 1 hora a T^a ambiente. Se lavó y se añadieron 100 μL del sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó durante 15 minutos en oscuridad, y se paró la reacción por adición de H_2SO_4 2N. La medida de la absorbancia producida se realizó a 450 nm (referencia 540-570 nm). La concentración de anticuerpos anti-Hsp70 o anti-Hsp60 de las muestras, expresada en $\mu\text{g/mL}$, se obtuvo por interpolación en la curva estándar de las absorbancias obtenidas en las muestras desconocidas.

La familia de las proteínas Hsp70 contiene varias proteínas, altamente relacionadas cuyo tamaño oscila entre 66 kDa y 78 kDa. Concretamente, la proteína de choque térmico inducible por estrés Hsp72 ó Hsp70i es una de ellas, con alta homología de secuencia con el resto. Debido a la alta homología de secuencia entre las Hsp70 y las características del kit utilizado para identificar anticuerpos dirigidos contra la ella, los anticuerpos detectados mediante este método se denominarán, de forma genérica, “anti-Hsp70”.

- Extracción de ADN a partir de sangre y PMNs

La extracción de ADN se realizó utilizando el Kit comercial “High pure PCR Template Preparation” (Roche. Cat.No. 11796828011), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este reactivo está preparado para la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de material de diferentes muestras.

En un tubo eppendorff se depositaron 200 μL de sangre, que se incubaron con 40 μL de proteinasa K y 200 μL de tampón TL, durante 10 min a 72°C. Se añadieron 100 μL de isopropanol, se mezcló bien y se transfirió a un tubo con filtro y se centrifugó 1 minuto a 8.000 x g. Se desechó el filtrado y sobre el contenido de ADN (retenido en el filtro), se añadieron 500 μL de tampón inhibidor, [guanidina-HCl 5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 6,6 (25°C)], preparado con etanol para obtener la concentración final. Se centrifugó 1 minuto a 8.000 x g, procediendo de igual manera a lo descrito anteriormente. Tras 2 lavados del filtrado, éste se centrifugó durante 10 segundos a 13.000 x g para optimizar el rendimiento de la extracción. Finalmente el filtrado se depositó sobre un nuevo tubo eppendorff de 1,5 mL, se añadieron 200 μL de tampón de elución previamente calentado a 70°C y se centrifugó 1 min a 8.000 x g. El ADN obtenido se congeló a -40°C hasta su uso.

También se procedió a la extracción de ADN de los PMNs, aislados y congelados a -70°C, según se describe en el apartado “Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN)”, utilizando el Kit High puré PCR template Preparation (Roche. Cat.No. 11 796 828 011), de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

La concentración final de ADN se determinó espectrofotométricamente: en una cubeta de cuarzo de 1 ml de volumen, añadir 990 μL de agua y 10 μL de la preparación de ADN genómico.

ES 2 380 738 A1

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{\text{DO260} \times 100 \times 50}{1000}$$

5

Las muestras se alicuotearon y conservaron a -80°C.

10 - Estudio molecular del polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR

El polimorfismo involucra el cambio de una citosina (C) por timina (T) en la posición 677 (677C>T), en el exón 4 del gen. Esto se traduce en un cambio de alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína. El estudio molecular se realizó por PCR-RFLP y por PCR a tiempo real.

15

a) PCR-RFLP

20 El procedimiento utilizado para la detección del polimorfismo 677C>T, requiere la amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para la MTHFR, sobre el que se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base. El cambio de una base C por T, genera un sitio de restricción para *Hinf*I. El fragmento estudiado tiene una longitud de 209 pb.

25

Básicamente: 0,5-2,0 μg de ADN genómico se amplificaron con 50 ng de los siguientes cebadores:

F-C677T (+): 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' (directo) (SEQ ID NO:1).

30

R-C677T (-): 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' (inverso) (SEQ ID NO:2).

35

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL , con la composición siguiente: 5 μL de tampón TAE 10X (*Tris-HCl* 10 mM, pH 8.3), 5 μL de tampón TAE 10X (*Tris-HCl* 10 mM, pH 8.3), 2,5 μL Cl_2Mg 50 mM, 0,4 μL dNTPs 100 mM, 0,5 μL F-C677T (+), 0,5 μL F-C677T (-), 3,0 μL ADN, 37,2 μL H_2O desionizada, 0,5 μL TAQ Polimerasa (1,25 U).

Las condiciones de PCR en termociclador i-Cycler de BioRad son:

40

1) Desnaturalización inicial a 94°C, 2 min.

2) 40 ciclos de: Desnaturalización: 94°C, 30 seg; Anillamiento: 62°C, 30 seg.; Extensión: 72°C, 30 seg.

45

3) Extensión final: 72°C, 10 min.

4) Final mantenido a 4°C hasta retirar PCR.

50

La digestión del producto de PCR, se llevó a cabo con la enzima de restricción *Hinf*I. La PCR genera un producto de 198 pb, de forma que si existe la mutación tiene un sitio de restricción para *Hinf*I, originándose dos fragmentos de 175 pb y 23 pb.

55

La electroforesis se realizó sobre gel de agarosa al 4%, y la visualización de las bandas se realizó con bromuro de etidio, identificando las bandas mediante transiluminador de UV.

b) PCR a tiempo real

60 Se realizó una PCR a tiempo real, con el sistema LightCycler (LC) de Roche Applied Science, en un termociclador de alta velocidad, que dispone de una cámara térmica en la que la temperatura de ciclación se alcanza rápidamente ya que el sistema utiliza aire, de forma que se produce una temperatura más homogénea que en un termociclador convencional y se logra una exactitud en la rampa de Tª de $\pm 0,3^\circ\text{C}$. El sistema permite variar 20°C/segundo.

65

La PCR se llevó a cabo en capilares de borosilicato con capacidad para 20 μl de muestra. El protocolo utilizado es el denominado FRET (*Fluorescent Resonance Transfer*), en el que un fluoróforo donante, excitado por luz externa ($\lambda=530$ nm), emite luz que es absorbida por un segundo fluoróforo próximo a él (aceptor), el cual emite luz a una longitud de onda diferente del donante ($\lambda=640$ nm), siendo el sistema capaz de medir esta luz. El protocolo se basa en la utilización de sondas de hibridación.

ES 2 380 738 A1

Básicamente, después del anillamiento (apareamiento) de los cebadores al ADN desnaturalizado, se realiza la hibridación en el ADN de dos sondas distintas y próximas entre sí, de forma que una esté marcada en su extremo 3' (flouróforo donante) y la otra esté marcada en su extremo 5' (fluoróforo aceptor). Una vez excitado el fluróforo donante, se produce la transferencia de luz, la excitación del fluoróforo aceptor y la correspondiente emisión de luz que se recoge en un fotodiodo. La emisión de luz será directamente proporcional al número de ciclos de PCR y a la cantidad de ADN. El procedimiento permite monitorizar la amplificación en tiempo real y monitorizar los cambios en la temperatura de fusión de las sondas utilizadas si existe una mutación. Para ello una de las sondas utilizadas debe cubrir la zona en la que se encuentra la mutación. Si no existe mutación, la sonda híbrida perfectamente y su temperatura de fusión será más alta que cuando exista la mutación, ya que al existir un desapareamiento la temperatura de fusión del híbrido formado es menor. Todas las reacciones se realizan en el mismo capilar sin necesidad de abrirlo, lo que disminuye el riesgo de contaminación.

El análisis molecular se realizó utilizando la mezcla Roche FastStar^{PLUS} Master, que contiene la Taq polimerasa, Mg²⁺ (Roche Cat.) y el kit LihgtMix[®] human MTHFR C677T (TIB MOLBIOL Cat.-No. 40-0095-16), que contiene los cebadores y sondas específicas de la mutación 677C>T.

Se amplificó un fragmento de 233 pb y los fragmentos de PCR resultantes se analizaron con sondas de hibridación marcadas con LightCycler[®] Red 640. La identificación de los distintos genotipos se realizó mediante el análisis de las curvas de fusión, en referencia a las TM específicas. El genotipo CC (WT) presenta una TM=63,0°C, mientras que el genotipo TT (HM) presenta una TM=54,5°C.

Brevemente, cada vial conteniendo las sondas y cebadores liofilizados, para 16 reacciones, se reconstituyó con 66 µL de H₂O grado PCR y se mantuvo a -20°C hasta su utilización. Los volúmenes utilizados por cada reacción se resumen a continuación:

<u>Componente</u>	<u>Volumen(µl)</u>
Agua grado PCR	7,0
Master Mix	4,0
Cebadores y Sondas	4,0
ADN	5,0
<u>Total:</u>	20 µl

Así, en un tubo eppendorff se preparó el volumen necesario de la mezcla que contiene la Taq polimerasa, Cl₂Mg, cebadores y sondas, completando con H₂O, teniendo un volumen final de 15 µL por muestra, que se depositaron en los capilares específicos del sistema LC, mantenidos a T^a de 0-4°C. Sobre la mezcla de reacción, se pipetearon 5 µL de ADN de muestras, control positivo (heterocigoto) y control negativo (H₂O), para asegurar que no existieran amplificaciones inespecíficas.

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, de acuerdo con el siguiente protocolo:

<u>Ciclo del Programa</u>	<u>Desnaturalización</u>		
Ciclos	1		
Temperatura Objetivo(°C)	95		
Tiempo Incubación (seg)	600		
RatioTemperaturaTransicion (°C/seg)	20		
Modo Adquisición	Ninguno		
<u>Ciclo de Programa</u>	<u>PCR- Amplificación</u>		
Ciclos	45		
Modo análisis	Cuantificación		
Temperatura Objetivo	Segmento	Segmento	Segmento
	1	2	3
Temperatura Objetivo (°C)	95	55	72
Tiempo Incubación (seg)	5	10	15
RatioTemperatura Transicion (°C/seg)	20.0	20.0	20.0
Modo Adquisición	Ninguno	Simple	Ninguno

ES 2 380 738 A1

<u>Programa de Ciclos</u>		<u>Fusión</u>		
Ciclos		1		
Modo de Análisis		Curvas de Fusión (<i>Melting</i>)		
	Temperatura Objetivo	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
	Temperatura Objetivo (°C)	95	40	73
	Tiempo Incubación (seg)	20	20	0
	Ratio Temperatura Transición (°C/seg)	20	20	0.2
	Modo Adquisición	Ninguno	Ninguno	Continuo

<u>Programa de Ciclos</u>		<u>Enfriar</u>
Ciclos		1
Modo Análisis		Ninguno
Temperatura Objetivo (°C)		40
Tiempo Incubación (seg)		30
Ratio Temperatura Transición (°C/seg)		20
Modo de adquisición		Ninguno

El procedimiento de la PCR tuvo una duración de 20-30 min. El análisis de las curvas de fusión se realizó tomando la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura, lo que permite identificar el genotipo homocigoto normal o salvaje (*wild type*, WT), en el que se obtiene un solo pico a temperatura de fusión $TM=63,0^{\circ}C$, frente al genotipo homocigoto mutado (HM), para el que se obtiene un pico a $TM=54,5^{\circ}C$. En el estado de heterocigoto se obtendrán dos curvas cuya TM corresponderán con los genotipos WT y HM.

- *Secuenciación de la región reguladora del gen hsp70-1 (HSPA1A, NT_007592)*

A) Amplificación de la región reguladora

Un fragmento de 1053 pb, que comprende el promotor, la región flanqueante 5' del gen *hsp70-1* y parte de la región codificante, se amplificó mediante PCR a partir del ADN genómico aislado de los PMNs de cada uno de los individuos sujetos a estudio. Dada la longitud del fragmento, éste se secuenció en dos fragmentos, y después se acoplaron las dos subsecuencias obtenidas. Para ello se utilizaron cebadores específicamente diseñados a partir de la secuencia publicada (GenBank, NT_007592), tal y como se recogen en la Tabla siguiente, en la que se resumen las secuencias utilizadas y sus propiedades. Los cebadores se han diseñado para conseguir una temperatura de fusión o *melting* (TM) similar, de forma que el contenido de bases de adenina y timina (A+T) y de guanina y citosina (G+C) sea similar en todos los cebadores.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 380 738 A1

TABLA 3

Cebadores de amplificación de la región reguladora del gen hsp70-1

5

10

15

20

25

30

Cebador	Secuencia	Propiedades
F1 (Directo)	5' ACTGCACAACCGGGGTCCCC 3' (SEQ ID NO:3)	G+C: 14 (14*4 = 56) A+T : 6 (6*2 = 12) Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
R1 (Inverso)	5' AGTCGTCACGGAGACCCGCC 3' (SEQ ID NO:4)	G+C: 14 A+T : 6 Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
F2: (Directo)	5' GGCGGCACTCTGGCCTCTGA 3' (SEQ ID NO:5)	G+C : 14 A + T : 6 Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
R2C (Inverso)	5' GGCCATGCCGGTTCCTGCT 3' (SEQ ID NO:6)	G+C: 14 A+T: 6 Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
R2D (Inverso)	5' GCCAGTGCTTCATGTCCGAC 3' (SEQ ID NO:7)	G+C: 12 A+T: 8 Temperatura <i>melting</i> (TM): 64° (PCR: Annealing, 64°)

35

El diseño de los cebadores permite obtener la secuencia completa del promotor, desde el nucleótido situado en posición 22641002 del gen, donde se aparea el cebador directo F1, hasta el nucleótido en posición 22642055, donde se aparea el cebador inverso R2D, de forma que queda comprendida la secuencia flanqueante y parte de la región codificante. Con estos cebadores, el procedimiento seguido fue:

40

a) Se realizó una primera PCR con la pareja de cebadores F1 (directo) y R2D (inverso), para amplificar el fragmento de 1053 pb.

b) A partir de este primer fragmento, se realizaron otras cinco reacciones de PCR, cada una con las siguientes parejas de cebadores: F1/R1; F1/R2C; F2/R1; F2/R2C; F2/R2D.

45

Con ello se obtienen cinco fragmentos de diferente tamaño, todos ellos incluidos dentro del rango de análisis para el secuenciador automático utilizado (450-500 pb). A partir de ellos se obtienen cinco subsecuencias, que se solapan entre ellas y que permiten el análisis completo del fragmento F1R2D (1053 pb).

50

La PCR para la amplificación de los fragmentos correspondientes se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l, siguiendo las instrucciones del kit High fidelity PCR Master, (Roche, ref 2-140-314), utilizando la "Master Mix" (Promega, ref M7502). Para ello, se pipetearon en un tubo eppendorff 50 μ l de la mezcla (master mix) que contiene la Taq polimerasa y Cl_2Mg , 1 μ l de cada uno de los cebadores, 7,35 μ l de ADN (aprox 400 ng) y se completó hasta 100 μ l con H_2O .

55

Las PCRs se llevaron a cabo según las condiciones siguientes:

1) Desnaturalización inicial: 95°C, 2 min.

60

2) 40 ciclos de: desnaturalización: 94°C, 30 seg; *annealing* (anillamiento o apareamiento): 62°C, 30 seg; extensión: 72°C, 45 seg.

3) extensión final 72°C, 7 min.

4) final mantenido a 4°C hasta retirar PCR.

65

El producto amplificado se purificó utilizando el kit de purificación de productos de PCR (Roche): High Pure PCR Product Purification Kit (Ref 1 732 676).

ES 2 380 738 A1

Una vez realizada la PCR, se cuantificaron los productos amplificados aplicando una alícuota sobre un gel de agarosa al 0,6%, con patrones de pesos moleculares, que contenían una cantidad conocida de ADN.

5 B) Secuenciación y análisis de la secuencia

La secuenciación automática se realizó en secuenciador de 16 capilares ABI PRISM 3100 en la Unidad de Secuenciación del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón". Se utilizó el método de Sanger de terminación de cadena, mediante el kit comercial BigDye Terminador Sequencing (Applied Biosystems), en el cual los dideoxirribonucleótidos terminadores están marcados con compuestos fluorescentes (A: dicloro (R6G); C: dicloro (ROX); dicloro (R110); T: dicloro (TAMRA)). Los productos obtenidos de las reacciones se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, cuya parte inferior es iluminada por un rayo láser, de forma que al pasar los distintos fragmentos marcados se excitan y producen fluorescencia, que se recoge un detector con filtros de distintas longitudes de onda, conectado a un software que convierte el orden de las moléculas fluorescentes, según su longitud de onda, en una secuencia lineal de ADN que se almacena en un CD para su posterior análisis.

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR, se editaron utilizando el software específico Chromas 2, adquirido a tal efecto. Este mismo software se usó para ensamblar las secuencias parciales resultantes de cada carrera, lo que permitió determinar la secuencia completa del producto amplificado. Las secuencias problema se comparan con la secuencia de la región genómica correspondiente publicada en GenBank (NT_007592) cuyo código de acceso es gi: 51465675. Los resultados de este análisis permiten identificar polimorfismos de un único nucleótido y, en el presente caso, donde los polimorfismos ya son conocidos, averiguar la forma del polimorfismo que aparece en cada una de las copias del gen de un individuo, cada una de las cuales corresponderá a una de los cromosomas del par conocido como cromosoma 6.

25

- Cálculo de la frecuencia alélica de los polimorfismos

La frecuencia alélica relativa para los polimorfismos estudiados, se obtiene considerando los valores absolutos de los genotipos obtenidos en la población estudiada, dividiendo por el número total de observaciones, aplicando principios de la herencia monogénica. Así la frecuencia relativa de dos alelos N (Normal) y M (Mutado) se calcula:

30

$$35 \quad \text{Frecuencia alelo N } (p) = \frac{\text{N}^\circ \text{ Casos N/N } \times 2 + \text{N}^\circ \text{ Casos N/M}}{\text{N}^\circ \text{ Casos Total } \times 2}$$

$$40 \quad \text{Frecuencia alelo M } (q) = \frac{\text{N}^\circ \text{ Casos M/M } \times 2 + \text{N}^\circ \text{ Casos N/M}}{\text{N}^\circ \text{ Casos Total } \times 2}$$

45

La probabilidad de que un individuo tenga un genotipo determinado (esperado) en el locus NM, depende de la frecuencia de los alelos N y M, obteniendo la probabilidad para:

50 $N/N = p \times p$; $M/M = q \times q$; $N/M = (p \times q) + (p \times q)$ de forma que las frecuencias de las tres combinaciones alélicas será: $p^2 + 2pq + q^2$.

El hecho de que los genotipos se distribuyan en proporción a las frecuencias de alelos individuales en una población y permanezcan constantes de generación en generación constituye el principio básico de la genética poblacional (Ley de Hardy-Weinberg).

55

- Análisis estadístico

Para variables cuantitativas se realizó la comparación de medias para muestras independientes, mediante la prueba T, para un intervalo de confianza del 95%, con un valor de significación de $p < 0,05$. En el caso de existir tres categorías, se llevó a cabo la comparación de medias con la prueba ANOVA de un factor, para comparaciones múltiples "post hoc", con corrección de Bonferroni, para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Para variables cualitativas o variables cuantitativas con bajo tamaño muestral y dos categorías, se realizó la comparación de medias entre 2 muestras independientes mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Witney, para un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación de 0,05 (bilateral). En el caso de existir tres categorías se llevó a cabo la prueba para varias muestras independientes de H de Kruskal-Wallis.

65

ES 2 380 738 A1

Se realizaron correlaciones bivariadas para variables cuantitativas obteniéndose el coeficiente de correlación de Pearson, con prueba de significación bilateral, con nivel de significación de 0,05 (bilateral).

Para variables cualitativas o cuantitativas de bajo tamaño muestral se realizaron correlaciones no paramétricas bivariadas obteniéndose el coeficiente de correlación Rho de Spearman, con prueba de significación bilateral.

Se calculó la razón de prevalencias mediante tablas de contingencia 2x2, obteniendo como estadísticos χ^2 y el exacto de Fischer. Se realizaron comparaciones logísticas.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS v:12.0 para Windows XP.

- Ejemplo 1

Población estudiada: Distribución de la misma y Niveles de los parámetros en estudio

1.1. Análisis descriptivo de la población estudiada

Tal como se ha comentado previamente, el estudio incluye una muestra de 115 sujetos, con una edad media de $48,57 \pm 6,77$ ($x \pm SD$) años, seleccionados de forma aleatoria y estratificada por sexo. No existen diferencias significativas para la variable edad (mujeres: media de 49,12 años; hombres: media de 48,00) entre ambos grupos ($p=0,523$).

Todos los sujetos en estudio, a excepción de los pacientes con enfermedad cardiovascular conocida, son sujetos *a priori* sanos. Sin embargo, tras aplicar la carta de riesgo coronario *Task Force Chart*, los sujetos participantes en el estudio, quedaron distribuidos de la siguiente manera:

- En el G0, sin factores de riesgo vascular (NO FRV), se incluyeron un total de 76 individuos (66,1% de la población en estudio), de los que 44 (57,9%) son mujeres y 32 (42,1%) varones.
- En el grupo G1, con factores de riesgo moderado (FRV Moderado), se incluyeron un total de 29 sujetos (25,2% de la población en estudio), 9 de ellos mujeres (31,0%) y 20 varones (69,0%).
- En el grupo G2, con enfermedad declarada, quedaron incluidas 10 personas (8,7% de la población en estudio), 5 mujeres y 5 varones.

La Tabla que se presenta a continuación recoge las frecuencias y distribución encontradas al agrupar por grupo de riesgo y sexo. Las diferencias de frecuencias con respecto al sexo encontradas entre los G0 y G1, son estadísticamente significativas ($p=0,042$), de forma que las mujeres se clasifican mayoritariamente en el grupo G0.

TABLA 4

Frecuencia de casos por grupo de riesgo y edad, agrupada por sexo

Grupo de Riesgo		Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Edad	s
G0	NO FRV	mujer	44	57,9	48,64	5,4
		varón	32	42,1	46,03	4,1
		Total	76	100,0		
G1	FRV MODERADO	mujer	9	31,0	51,78	5,8
		varón	20	69,0	49,60	10,2
		Total	29	100,0		
G2	ENFERMEDAD	mujer	5	50,0	48,60	12,8
		varón	5	50,0	54,20	2,68
		Total	10	100,0		

Los 5 pacientes y los 4 sujetos miembros de la familia incluidos en el estudio, quedaron clasificados de la siguiente forma: 6 de ellos (4 mujeres y 2 varones) se incluyeron en el G2, mientras que los 3 restantes (1 mujer, 2 varones) quedaron incluidos en el G1.

Como consecuencia del estudio, se instauró tratamiento preventivo en 15 individuos identificados como pertenecientes al G1, a los que se les ha ofrecido seguimiento clínico. Esto corrobora la idea del desconocimiento del estado de salud cardiovascular de gran parte de la población.

ES 2 380 738 A1

1.2. Valores de los parámetros analizados: homocisteinemia

Las características analíticas del procedimiento utilizado, para la medición de homocisteína total expresada en $\mu\text{mol/L}$, se resumen a continuación:

TABLA 5

Características del procedimiento de medida de homocisteína total

Intervalo de medición (Linealidad)	1,2-40	
Límite de detección ([] mínima medible)	1,2	
	Nivel I (9,8)	Nivel II (38,5)
Imprecisión intraserie (%CV)	6,7	4,2
Imprecisión interserial (%CV)	8,6	7,5
Valores de referencia	Hombres	Mujeres
	P ₉₅ =13	P ₉₅ =11

Para establecer los valores de referencia, se recogieron muestra de sangre de forma anónima no relacionable, de un grupo control de 107 donantes sanos (53 varones y 54 mujeres), con un rango de edad comprendido entre 18 y 64 años. La tabla siguiente describe los datos obtenidos en la población de donantes sanos:

TABLA 6

Estadística sobre los valores de homocisteinemia en la población sana

Hcy (HPLC)	Sexo	N	Mín.	Máx.	Media	Mediana	s	Z de K-S	P ₉₅
	Mujer	54	2,78	16,86	6,36	5.68	2,36	1,466	11.10
	Varón	53	4,08	18,95	8,27	8.10	2,91	1,737	13.37

El test de ajuste a la normalidad de Kolmogorov-Smirnov demuestra que la tHcy no se ajusta a una distribución normal en ninguno de los grupos. El valor de tHcy, por encima del cual se considera situación de hiperhomocisteinemia, quedó establecido como percentil 95, para cada grupo, siendo de [tHcy]=11 $\mu\text{mol/L}$ para mujeres y [tHcy]=13 $\mu\text{mol/L}$ para varones. Aplicando el punto de corte establecido por sexo, se observa que las mujeres presentan una frecuencia de hiperhomocisteinemia (13,8%) superior a los hombres (8,8%) mientras que, en la población total, la prevalencia de hiperhomocisteinemia es del 11,3%.

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de homocisteína obtenidos NO se ajustan a una distribución normal (Z=1.753, p=0.004), presentando una concentración media de 8,46 $\mu\text{mol/L}$.

TABLA 7

Prueba de Kolmogorov-Smirnov en la población en estudio

Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global		115	4	36	8,46	3,669	1,753	0,004*
Sexo:	mujer	58	4	13	7,72	2,25	1,485	0,024*
	varón	57	5	36	9,21	4,59	1,703	0,006*

El cálculo de la significación asintótica bilateral, para la variable de agrupación "sexo", indica que existen diferencias significativas para los niveles de homocisteína total entre ambas poblaciones, con un nivel de significación de p=0,053. Los varones presentan niveles de homocisteína total superiores al grupo de las mujeres, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Esto se confirma con la prueba T de comparación de medias (p=0,029).

ES 2 380 738 A1

También se analizó la distribución de valores de homocisteinemia total por grupo de riesgo vascular, tal como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 8

Distribución de tHcy por grupos de riesgo vascular

Homocisteína (µmol/L)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0	NO FRV	76	4	12	7,68	1,98	1,518	0,020*
G1	FRV MODERADO	29	4	36	9,76	5,87	1,499	0,022*
G2	ENFERMEDAD	10	6	18	10,60	3,80	0,515	0,953

La prueba KRUSKAL-WALLIS (Chi-cuadrado: 8,209; G1: 2; significación asintótica: 0,016) arroja diferencias estadísticamente significativas entre grupos con nivel de significación ($p=0,016$). La prueba de Mann-Whitney demostró las diferencias entre los grupos G0:G1 ($p=0,056$) y G0:G2 ($p=0,014$). El análisis de Bonferroni lo confirmó ($p=0,024$ y $p=0,047$).

Así, al segmentar por grupo de riesgo vascular, se demuestra que en los grupos con factores de riesgo vascular moderado (G1) y de enfermedad declarada (G2) la prevalencia de hiperhomocisteinemia es significativamente mayor (Chi-cuadrado: 0,03; Fisher: 0,04) que en el grupo sin factores de riesgo (G0), la prevalencia de hiperhomocisteinemia (5,3%) es similar a la descrita en la población general.

Estos datos corroboran la hipótesis que considera la hiperhomocisteinemia como factor independiente de riesgo vascular.

1.3. Valores de los parámetros analizados: Hsp70i en PMNs

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la medición de Hsp70i intraleucocitaria, determinada a partir de leucocitos neutrófilos polimorfonucleares y expresada en ng/mL, se resumen a continuación:

TABLA 9

Características del procedimiento analítico de Hsp70i en PMNs

Intervalo de medición (Linealidad)	0,78-50
Límite de detección ([] mínima medible)	0,40
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	0-64

Obtenidos los valores por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados, expresados en ng/µg de proteína, cuantificada por Lowry, los valores estadísticos obtenidos en la población analizada son los siguientes:

TABLA 10

Datos estadísticos de Hsp70i en PMNs de la población en estudio

Hsp70i PMN (ng/µg proteína)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global		115	2,62	160,75	31,39	21,63	1,066	0,206
Sexo	mujer	58	4,64	74,91	32,33	18,96	0,741	0,642
	varón	57	2,62	160,75	30,44	24,18	1,022	0,248
Gru po	G0: NO FRV	76	2,62	74,63	29,68	17,59	0,812	0,524
	G1: FRV MODERADO	29	5,67	160,75	36,43	31,37	0,914	0,373
	G2: ENFERMEDAD	10	7,92	54,28	29,82	13,32	0,504	0,961

ES 2 380 738 A1

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de Hsp70i en PMNs obtenidos se ajustan a una distribución normal ($Z=1,066$, $p=0,206$), presentando una concentración media de 31,39 ng/ μ g proteína. En cuanto a la distribución por sexos, aunque no existen diferencias significativas para los niveles de Hsp70i en PMN entre ambas poblaciones ($p=0,641$), las mujeres presentaban niveles más altos que los varones.

En cuanto a la distribución por grupo de riesgo vascular, el grupo G1 presenta los niveles más elevados de Hsp70 intraleucocitarios, siendo superiores a los del grupo G0 sin factores de riesgo. La prueba de KRUSKAL-WALLIS demostró que no existían diferencias significativas entre los grupos. La prueba de ANOVA y el análisis de Bonferroni lo confirmaron. El aumento de Hsp70i intracelular en el grupo G1 no se asocia con otros factores de riesgo vascular clásicos como sexo, hipercolesterolemia, hipertensión o diabetes.

El hecho de que en el grupo de individuos con enfermedad declarada (G2) se produzca una disminución de Hsp70i podría indicar que, en situación de enfermedad, el sistema de producción de Hsp70i intracelular se agotaría.

1.4. Valores de los parámetros analizados: Hsp70i en suero

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la medición de Hsp70i sérica, expresada en ng/mL, se resumen a continuación:

TABLA 11

Características del procedimiento analítico de Hsp70i sérica

Intervalo de medición (Linealidad)	0,34-6,25
Límite de detección ([] mínima medible)	0,30
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	$P_{95} = 3,93$

Obtenidos los valores por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados, los valores estadísticos obtenidos en la población analizada son los siguientes:

TABLA 12

Datos estadísticos de Hsp70i sérica de la población en estudio

Hsp70i sérica (ng/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global	115	0,19	7,54	1,65	1,04	1,612	0,011*
Sexo							
mujer	58	0.19	4.03	1.56	0.91	1.036	0.233
varón	57	0.33	7.54	1.75	1.16	1.378	0.045*
Gru po							
G0: NO FRV	76	0.19	4.22	1.60	0.92	1.192	0.117
G1: FRV MODERADO	29	0.57	7.54	1.70	7.39	0.379	0.045*
G2: ENFERMEDAD	10	0.31	2.73	1.42	0.76	0.495	0.967

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de Hsp70i en suero obtenidos no se ajustan a una distribución normal ($Z=1,612$, $p=0,011$), presentando una concentración media de 1,65 ng/mL.

En cuanto a la distribución por sexos, aunque no existen diferencias significativas para los niveles de Hsp70i circulantes entre ambas poblaciones ($p=0,347$), los varones presentaban niveles más altos que las mujeres.

En cuanto a la distribución por grupo de riesgo vascular, el grupo G1 presenta los valores más altos, de importancia biológica relevante. La prueba KRUSKAL-WALLIS (Chi-cuadrado: 1,124; G1: 2; sig. Asintótica: 0,570) demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos. ANOVA y el análisis de Bonferroni lo confirmaron.

Los datos recogidos en la Tabla 12 reflejan una situación similar a la anterior (Hsp70i en PMNs), de manera que los niveles más bajos de Hsp70i séricas se presentan en el grupo de riesgo vascular G2. Esto parece ser compatible con la hipótesis de que el aumento de la expresión de Hsp70i intracelular provocaría su movilización hacia la membrana

ES 2 380 738 A1

celular, produciéndose la salida de la célula, de tal manera que la concentración de Hsp70 circulantes podría reflejar el balance entre su secreción por arterias sanas y su degradación por las proteasas ateroscleróticas, constituyen un probable indicador de la situación intracelular. Así, los individuos con enfermedad aterosclerótica tendrían los valores más bajos de Hsp70i sérica.

1.5. Valores de los parámetros analizados: Anticuerpos anti-Hsp70i

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-Hsp70i, expresados en $\mu\text{g/mL}$, se resumen a continuación:

TABLA 13

Características del procedimiento analítico de anti-Hsp70

Intervalo de medición (Linealidad)	31,25-1000
Límite de detección ([] mínima medible)	6,79
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	255-1205

Obtenidos los valores por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados, los valores estadísticos obtenidos en la población analizada son los siguientes:

TABLA 14

Datos estadísticos de anticuerpos anti-Hsp70i de la población en estudio

Hsp70i sérica (ng/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global	115	201.53	1632,41	593,43	271,63	1,013	0,256
Sexo							
mujer	58	201.53	1450.12	601.01	266.44	0.931	0.351
varón	57	234.30	1632.41	585.72	278.98	0.835	0.488
Gru							
G0: NO FRV	76	201.53	1358.05	599.00	262.26	0.860	0.450
G1: FRV MODERADO	29	234.30	1632.41	574.86	312.91	1.039	0.231
G2: ENFERMEDAD	10	267.91	1180.60	604.95	235.18	0.783	0.573

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores de anticuerpos anti-Hsp70i obtenidos se ajustan a una distribución normal ($Z=1,013$, $p=0,256$), presentando una concentración media de $593,43 \mu\text{g/mL}$.

En cuanto a la distribución por sexos, no existen diferencias significativas entre ambas poblaciones ($p=0,764$ según la prueba T).

En cuanto a la distribución por grupo de riesgo vascular, la prueba de KRUSKAL-WALLIS (Chi-cuadrado: 0,951; gl: 2; sig. Asintótica: 0,622) demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos. ANOVA y el análisis de Bonferroni lo confirmaron.

Los datos obtenidos son compatibles con la hipótesis de que, al aumentar los niveles de Hsp70 séricas, ejercerían como autoantígenos, provocando la síntesis de anticuerpos anti-Hsp70. Según los datos de la Tabla 14, al aumentar las Hsp70 séricas, aumentaría la formación de complejos antígeno-anticuerpo, disminuyendo los niveles de anticuerpos circulantes, situación que reflejaría lo que sucede en el grupo G1. Lo contrario ocurriría en G0 y G2 donde, aunque por razones opuestas, la formación de complejos sería menor, dado que los niveles de Hsp70 séricas serían menores, aumentando los niveles de anti-Hsp70 circulantes.

ES 2 380 738 A1

1.6. Valores de los parámetros analizados: Anticuerpos anti-Hsp60

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-Hsp60, expresados en $\mu\text{g/mL}$, se resumen a continuación:

TABLA 15

Características del procedimiento analítico de anti-Hsp60

Intervalo de medición (Linealidad)	7,81-250
Límite de detección ([] mínima medible)	2,88
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	$P_{95} = 168$

Obtenidos los valores por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados, los valores estadísticos obtenidos en la población analizada son los siguientes:

TABLA 16

Datos estadísticos de anti-Hsp60 de la población en estudio

Hsp70i sérica (ng/mL)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global		115	10,01	346,50	61,44	59,31	2,207	0,000**
Sexo	mujer	58	10,01	346,50	66,97	61,75	1,447	0,030*
	varón	57	13,78	308,55	55,80	56,71	1,973	0,001**
Grupo	G0: NO FRV	76	10,01	346,50	69,41	68,26	1,712	0,006**
	G1: FRV MODERADO	29	11,15	155,57	47,42	36,05	1,378	0,045**
	G2: ENFERMEDAD	10	23,67	54,42	41,43	9,05	0,470	0,980

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores de anticuerpos anti-Hsp60 obtenidos no se ajustan a una distribución normal ($Z=2,207$, $p=0,000$), presentando una concentración media de $61,44 \mu\text{g/mL}$.

En cuanto a la distribución por sexos, aunque se observa que el grupo de mujeres presenta valores mayores que el grupo de varones, no existen diferencias significativas entre ambas poblaciones ($p=0,119$ según la prueba de la U de Mann Whitney).

En cuanto a la distribución por grupo de riesgo vascular, se observa que el grupo G2 presenta los niveles más bajos. La prueba de KRUSKAL-WALLIS (Chi-cuadrado: 3,067; gl: 2; sig. Asintótica: 0,216) arroja diferencias próximas a la significación estadística. La U de Mann Whitney demostró que las diferencias se producen entre G0:G1 ($p=0,091$). La prueba ANOVA confirmó lo anterior.

1.7. Valores de los parámetros analizados: polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR

Los análisis de PCR del ADN de la población en estudio, con posterior digestión con la enzima de restricción *Hinf I*, así como la confirmación mediante PCR en tiempo real, proporcionaron los siguientes datos sobre la distribución del polimorfismo en la población y las frecuencias y distribución alélica observadas:

ES 2 380 738 A1

TABLA 17

Distribución del SNP 677C>T del gen de la MTHFR

Población	Frecuencia alélica		Distribución alélica		Genotipo			Observado/Esperado		
	p(C)	q(T)	C(CC+CT)	T(CT+TT)	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Total N=115 (100%)	0,58	0,42	135 (58,69%)	95 (41,30%)	42 (36,5%)	51 (44,3%)	22 (19,1%)	1,0	0,9	1,0
Mujeres N=58	0,61	0,39	71(61,20%)	45(38,79%)	23 (39,7%)	25 (43,1%)	10 (17,2%)	1,06	0,90	1,13
Varones N=57)	0,56	0,44	64(56,14%)	50(43,85%)	19 (33,3%)	26 (45,6%)	12 (21,1%)	1,06	0,92	1,08
G0 N=76	0,62	0,38	95(62,50%)	57(37,50%)	29 (38,2%)	37 (48,7%)	10 (13,2%)	0,99	1,03	0,91
G1 N=29	0,51	0,49	30(51,72%)	28(48,27%)	10 (34,5%)	10 (34,5%)	9 (31,0%)	1,32	0,69	1,29
G2 N=10	0,50	0,50	10(50,0%)	10(50,0%)	3 (30,0%)	4 (40,0%)	3 (30,0%)	1,20	0,80	1,20

De acuerdo con todo esto, el 44,3% de la población analizada presenta el polimorfismo en heterocigosis, porcentaje superior al observado para el estado salvaje, homocigótico normal (genotipo CC), que se presenta en el 36,5% de la población. La distribución de genotipos encontrada está en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

El 21,1% de los varones son homocigótico mutantes, frente al 17,2% del grupo de mujeres, aunque la diferencia no alcanza significación estadística ($p=0,389$).

La frecuencia de aparición del genotipo TT es más alta en los grupos con factores de riesgo moderado y enfermedad (G1 y G2), que en el grupo sin factores de riesgo (G0), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Chi-cuadrado=5,167, $p=0,027$ y prueba exacta de Fisher $p=0,043$).

1.8. Valores de los parámetros analizados: polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70-1*

El análisis molecular del fragmento de 1053 pb que comprende el promotor y la región flanqueante de 5' del gen *hsp70-1* (gi:51465675), mediante secuencias ensambladas, permitió la identificación de 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). A continuación se describen los datos obtenidos para los dos que aparecían con mayor frecuencia: -110A>C (rs1008438; nucleótido en el gen: 22641459) y +190G>C (rs1043618; nucleótido en el gen: 22641758). Como se ha comentado, estos polimorfismos recibieron las denominaciones de -326A>C y -27G>C en trabajos previos de los autores de la invención. Por ello, para evitar errores, la Fig. 3 muestra los fragmentos de la secuencia del gen *hsp70-1* donde se encuentran dichos polimorfismos.

Los datos concretos de frecuencia y distribución obtenidos fueron:

TABLA 18

*Frecuencia de polimorfismos del gen *hsp70-1**

-110 A>C	Frecuencia	%	+190 G>C	Frecuencia	%
WT (AA)	42	36,5	WT (GG)	42	36,5
HT (AC)	52	45,2	HT (GC)	53	46,1
HM (CC)	21	18,3	HM (CC)	20	17,4
Total	115	100	Total	115	100

ES 2 380 738 A1

Se observa que los polimorfismos -110A>C y +190G>C se coexpresan en todos los casos menos en uno, por lo que el estudio de su influencia sobre otros parámetros se realizó a partir de ese momento conjuntamente. Ambos polimorfismos se presentan en heterocigosis en el 45,2% y 46,1% de la población, respectivamente. Los datos de frecuencia y distribución del polimorfismo -110A>C, según los distintos grupos, fueron los siguientes:

TABLA 19

Frecuencia y distribución del polimorfismo -110A>C del gen hsp70-1

Población	Frecuencia alélica		Distribución alélica		Genotipo			Observado/Esperado		
	p(C)	q(T)	A(AA+AT)	C(AC+CC)	AA	AC	CC	AA	AC	CC
Total N=115	0,59	0,41	136 (59,13%)	94 (40,86%)	42 (36,5%)	52 (44,3%)	21 (19,1%)	1,04	0,93	1,08
Mujeres N=58	0,63	0,37	73 (62,93%)	43(37,06%)	23 (39,6%)	27 (46,5%)	8 (13,8%)	1,00	1,00	1,00
Varones N=57	0,55	0,45	63(55,26%)	51(44,73%)	19 (33,3%)	25 (43,8%)	13 (22,8%)	1,10	1,13	1,12
G0 N=76	0,60	0,40	92(60,52%)	60(39,47%)	31 (40,8%)	30 (39,5%)	15 (19,7%)	1,13	0,82	1,23
G1 N=29	0,59	0,41	34(58,62%)	24(41,37%)	9 (31,0%)	16 (55,2%)	4 (13,8%)	0,89	1,14	0,82
G2 N=10	0,50	0,50	10(50,0%)	10(50,0%)	2 (20,0%)	6 (60,0%)	2 (20,0%)	0,80	1,20	0,80

Al analizar la frecuencia de aparición del polimorfismo, agrupado por sexo, se observa que el 22,8% de los varones presentan en homocigosis la mutación (HM), frente al 13,8% del grupo de mujeres, aunque la diferencia no alcanza significación estadística.

Al fragmentar por grupo de riesgo, se observa que en el grupo G0, sin factores de riesgo vascular, el genotipo CC (HM) aparece con la menor frecuencia (19,7%), mientras que el genotipo salvaje AA (*wild type*) y el genotipo AC (HT) aparecen en porcentajes similares (40,8% y 39,5%), aunque las diferencias no alcanzan significación estadística.

- Ejemplo 2

Verificación en la población en estudio de la relación entre homocisteinemia y otros parámetros

Se realizó un análisis similar al de los apartados 1.2 a 1.6 anteriormente expuestos, para comprobar posibles correlaciones, anteriormente sugeridas, entre homocisteinemia y proteínas de choque térmico y entre homocisteinemia y el polimorfismo 677C>T del gen que codifica la MTHFR, así como entre dicho polimorfismo y los parámetros relacionados con las proteínas de choque térmico (anticuerpos anti-Hsp70 y niveles de Hsp70i intraleucocitaria y sérica). Se comentan los resultados obtenidos

2.1. Relación entre homocisteinemia y proteínas de choque térmico

El análisis de la población global (Rho de Spearman) demostró que no existe correlación entre los niveles de homocisteína total en plasma (tHcy) y la Hsp70i, tanto intraleucocitaria como sérica. Sí se encontró una correlación directa, próxima a la correlación estadística entre tHcy y anticuerpos anti-Hsp70 circulantes ($p=0,076$).

Al agrupar por sexo, tampoco se encontró correlación entre tHcy y los niveles de Hsp70i, ya fuera intraleucocitaria o sérica. Tampoco se encontró correlación con los anticuerpos anti-Hsp70 circulantes.

Analizada la población por factores de riesgo vascular, se observó que en el G1 existía correlación positiva ($p=0,004$) entre los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes y tHcy, especialmente en el grupo de los varones (Coeficiente de correlación=0,558*, $p=0,011$, $n=20$).

ES 2 380 738 A1

2.2. Relación entre homocisteinemia y polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR

Siguiendo el mismo esquema de análisis, se analizó la posible influencia de la presencia/ausencia del polimorfismo 677C>T en los niveles circulantes de homocisteína total. Los datos obtenidos para la población total se presentan a continuación:

TABLA 20

Niveles de tHcy agrupados por genotipo del SNP 677C>T

tHcy					
677C>T	N	Mín	Máx	Media	s
WT (CC)	42	5	13	8,17	2,083
HT (CT)	51	4	18	7,86	2,592
HM (TT)	22	5	36	10,41	6,602

Los sujetos homocigóticos mutantes para el polimorfismo 677C>T, presenta los niveles de homocisteinemia más altos, mientras que el grupo de heterocigotos, presenta los niveles más bajos. Al comparar los grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Chi-cuadrado: 3,778, gl=2, Sig. Asintótica: 0,151) se demostró la existencia de diferencias próximas a la significación estadística (p=0,151). Al aplicar la U de Mann-Whitney, se demostró que las diferencias (p=0,058) se producen entre los grupos HT y HM para la 677C>T. La prueba de ANOVA (p=0,019) y la comparación de Bonferroni (p=0,018) confirmaron las diferencias encontradas.

Al segmentar la población por genotipos y sexo, y aplicar la prueba de Mann-Whitney, se demostraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,003) para la tHcy entre ambos sexos, cuando la mutación está presente en homocigosis (677C>T: HM), siendo superiores en varones.

TABLA 21

Niveles de tHcy agrupados por genotipo del SNP 677C>T y sexo

tHcy						
677C>T	Sexo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	mujer	23	5	13	8,17	2,51
	varón	19	5	10	8,16	1,46
HT	mujer	25	4	12	7,56	2,31
	varón	26	5	18	8,15	2,85
HM	mujer	10	5	9	<u>7,10</u>	1,19
	varón	12	6	36	<u>13,17</u>	7,98

Al segmentar por genotipo y grupo de riesgo vascular, se observó un aumento de los niveles de tHcy con la presencia de factores de riesgo, tanto en los sujetos WT, como en los sujetos HT. Al aplicar Kruskal-Wallis se demostraron diferencias próximas a la significación estadística para ambas situaciones (WT:p=0,197 y HT:p=0,088). La prueba de Mann-Whitney confirmó que las diferencias se producen de forma significativa entre los sujetos HT que pertenecen a los grupos G0:G2 (p=0,032) y G1:G2 (p=0,084), mientras que en los sujetos WT las diferencias entre G0:G2 (p=0,115) están próximas a la significación estadística. Al analizar con Anova de un factor con corrección de Bonferroni, las diferencias se demostraron en todos los casos y alcanzaron significación estadística. WT: G0:G2 p=0,030 y HT: [(G0:G2 p=0,007) y (G1:G2 p=0,044)].

ES 2 380 738 A1

TABLA 22

tHcy agrupada por genotipo del SNP 677C>T y grupo de riesgo

tHcy						
677C>T	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	29	5	11	7,79	1,780
	G1=FRV MODERADO	10	5	11	8,40	2,011
	G2=ENFERMEDAD	3	7	13	11,00	3,464
HT	G0=NO FRV	37	4	12	7,46	2,142
	G1=FRV MODERADO	10	4	12	7,90	2,470
	G2=ENFERMEDAD	4	9	18	11,50	4,359
HM	G0=NO FRV	10	5	12	8,20	2,044
	G1=FRV MODERADO	9	6	36	13,33	9,407
	G2=ENFERMEDAD	3	6	14	9,00	4,359

2.3. Influencia del polimorfismo 677C>T sobre proteínas de choque térmico y anticuerpos (anti-Hsp70 y anti-Hsp60)

Se realizó el mismo análisis que en los puntos anteriores. A continuación se muestran los datos encontrados para la población global:

TABLA 23

Parámetros relacionados con las Hsp según el genotipo del SNP 677C>T

	677C>T	N	Mín.	Máx.	Media	s
Hsp70i PMNs	WT	42	4,64	74,91	30,96	18,01
	HT	51	2,62	67,83	29,03	17,68
	HM	22	5,67	160,75	37,70	33,27
Hsp70i suero	WT	42	0,43	7,54	1,90	1,30
	HT	51	0,19	3,65	1,42	0,75
	HM	22	0,57	4,03	1,72	0,99
AntiHsp70	WT	42	234,30	1450,12	629,27	302,17
	HT	51	236,35	1632,41	572,13	281,81
	HM	22	201,53	884,10	574,38	170,69
AntiHsp60	WT	42	11,15	308,55	76,34	70,53
	HT	51	10,01	346,50	54,26	55,35
	HM	22	13,78	155,57	49,62	37,11

Aunque no existen diferencias significativas entre grupos, los sujetos HM para 677C>T, presentan los valores más altos de Hsp70i intraleucocitaria y las menores concentraciones de anticuerpos circulantes anti-Hsp60, mientras que los sujetos HT, son los que presentan menor concentración de Hsp70 séricas e intraleucocitarias.

Al segmentar la población por sexo y genotipo y aplicar la prueba de Mann-Whitney se demostraron diferencias muy próximas a la significación entre ambos sexos en los niveles de Hsp70i intraleucocitarias en el grupo WT y en los niveles de anticuerpos anti-Hsp60 en el grupo HM para la 677C>T. Los datos específicos se muestran a continuación:

TABLA 24

Niveles de anti-Hsp60 y Hsp70i en PMN agrupados por genotipo de 677C>T y sexo

C677T	Sexo	Hsp70 en PMN	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	mujer		23	4,64	74,91	36,01	20,21
	varón		19	6,98	59,76	24,86	12,97
HT	mujer		25	4,96	67,83	29,57	18,41
	varón		26	2,62	58,37	28,51	17,29
HM	mujer		10	5,78	54,63	30,80	17,76
	varón		12	5,67	160,75	43,45	42,14
C677T	Sexo	Anti-Hsp60	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	mujer		23	11,15	294,47	72,43	62,29
	varón		19	17,77	308,55	81,09	80,91
HT	mujer		25	10,01	346,50	61,32	67,83
	varón		26	18,33	217,88	47,47	40,14
HM	mujer		10	16,61	155,57	68,55	47,25
	varón		12	13,78	54,42	33,84	14,33

Se aprecia que las mujeres WT (genotipo CC) presentan niveles de Hsp70 PMNs mayores que los varones WT ($p=0,067$, Mann-Whitney), siendo la diferencia casi significativa, mientras que las mujeres HM (genotipo TT) arrojan valores más altos de anticuerpos anti-Hsp60 que los varones HM ($p=0,056$, Mann-Whitney).

Al segmentar por grupo de riesgo vascular, se encontraron los siguientes resultados para los niveles de Hsp70i en PMNs:

TABLA 25

Niveles de anti-Hsp60 y Hsp70i en PMN agrupados por genotipo de 677C>T y y grupo de riesgo

Hsp70 PMNs						
677C>T	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	29	4,64	74,63	28,84	17,37
	G1=FRV MODERADO	10	9,38	74,91	34,34	20,89
	G2=ENFERMEDAD	3	25,08	54,28	40,22	14,62
HT	G0=NO FRV	37	2,62	63,66	29,16	17,59
	G1=FRV MODERADO	10	7,07	67,83	32,33	20,34
	G2=ENFERMEDAD	4	7,92	31,18	19,59	9,91
HM	G0=NO FRV	10	5,78	62,64	34,03	19,41
	G1=FRV MODERADO	9	5,67	160,75	43,33	49,08
	G2=ENFERMEDAD	3	28,61	41,21	33,06	7,06

Se observa que los individuos HT para la 677C>T, pertenecientes al G2, presentan los valores más bajos de Hsp70 intraleucocitaria, aunque no se demuestra diferencias significativas. Para el resto de variables estudiadas (Hsp70 séricas y anticuerpos anti-Hsp70 o anti-Hsp60), al segmentar por grupo de riesgo vascular, no se ha demostrado influencia de la presencia/ausencia del polimorfismo 677C>T.

2.4. Influencia de los SNPs del gen *hsp70-1* en la homocisteinemia total

El análisis realizado, mostrado en la Tabla siguiente, permite observar que, en la población global, el grupo HT presenta los valores más altos, mientras que los HM para cualquiera de los dos polimorfismos presenta los valores más bajos de homocisteína.

TABLA 26

Influencia de los SNPs del gen hsp70-1 en la homocisteinemia

<i>tHcy</i>					
-110 A>C, +190 G>C	N	Mín.	Máx	Media	s
WT	42	4	18	8,19	2,70
HT	52	5	36	8,96	4,62
HM	21	5	14	7,76	2,42

El análisis estadístico demostró que no existían diferencias significativas en la población general por genotipo, ni tampoco al segmentar por sexo y grupo de riesgo vascular.

- Ejemplo 3

Influencia de los polimorfismos del gen hsp70-1 en los parámetros relacionados con las proteínas de choque térmico

3.1. *Influencia de los polimorfismos -110A>C y +190G>C en la Hsp70i intraleucocitaria*

Tal como se mencionó en el Ejemplo 1, la baja frecuencia de otros polimorfismos detectados en la zona en estudio del gen *hsp70-1* hizo preferible restringir el análisis a los polimorfismos -110A>C y +190G>C que, por coexpresarse, se tratan conjuntamente.

Como en los casos anteriores, en primer lugar, se procedió a agrupar los niveles de Hsp70i intraleucocitaria (determinada en PMNs) según el genotipo de los sujetos respecto a los polimorfismos más frecuentes del gen *hsp70-1*.

TABLA 27

Hsp70i en PMNs según el genotipo de los SNPs del gen hsp70-1

<i>Hsp70iPMNs (ng/ug proteína)</i>					
-110 A>C y +190 G>C	N	Mín	Máx	Media	s
WT	42	4,64	74,63	32,64	18,02
HT	52	2,62	160,75	32,66	26,52
HM	21	7,07	48,36	25,76	12,93

En el conjunto de la población, los sujetos que presentan los polimorfismos -110A>C y +190G>C en homocigosis, presentan los valores más bajos de Hsp70 intraleucocitaria, que aunque no alcanza significación estadística (Kruskal-Wallis: $p=0,434$), constituye una importante significación biológica.

TABLA 28

Hsp70i en PMNs agrupado por SNPs del gen hsp70-1 y sexo

<i>Hsp70iPMNs (ng/ug proteína)</i>						
-110 A>C y +190 G>C	Sexo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	mujer	23	4,64	74,63	32,12	20,39
	varón	19	10,26	59,76	33,28	15,19
HT	mujer	27	4,96	74,91	32,77	20,11
	varón	25	2,62	160,75	32,55	32,50
HM	mujer	8	19,18	48,36	31,47	10,77
	varón	13	7,07	45,74	22,24	13,26

ES 2 380 738 A1

Los datos de la Tabla anterior indican que, al segmentar la población por genotipo y sexo, se observan diferencias próximas a la significación (U Mann Witney $p=0,070$) entre ambos sexos, en el grupo que presentan en homocigosis la mutación.

TABLA 29

Hsp70i en PMNs agrupado por SNPs del gen hsp70-1 y grupos de riesgo

<i>Hsp70i</i>PMNs (ng/ug proteína)						
-110A>C, +190G>C	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	4,64	74,63	32,51	19,44
	G1=FRV MODERADO	9	22,10	58,37	35,08	14,34
	G2=ENFERMEDAD	2	16,16	31,18	23,67	10,62
HT	G0=NO FRV	30	2,62	62,64	27,13	17,62
	G1=FRV MODERADO	16	5,67	160,75	41,93	39,83
	G2=ENFERMEDAD	6	23,11	54,28	35,59	12,07
HM	G0=NO FRV	15	11,79	48,36	28,91	13,11
	G1=FRV MODERADO	4	7,07	25,19	17,49	7,82
	G2=ENFERMEDAD	2	7,92	29,36	18,64	15,10

Al segmentar la población por genotipo y grupo de riesgo vascular, se demostró que la menor [Hsp70i] intra-leucocitaria en el grupo HM para -110A>C y +190G>C ocurre debido a los sujetos con factores de riesgo vascular de los grupos G1 y G2 que, aunque no alcanza diferencias significativas, tiene importancia biológica. Los sujetos heterocigóticos para ambos SNPs alcanzan las mayores concentraciones.

TABLA 30

Hsp70i en PMNs agrupado por SNPs del gen hsp70-1, grupos de riesgo y sexo

-110A>C, +190G>C	Grupo	Sexo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	G0=NO FRV	mujer	19	4,64	74,63	30,99	21,31
		varón	12	10,26	59,76	34,92	16,67
	G1=FRV MODERADO	mujer	3	33,04	54,34	44,58	10,76
		varón	6	22,10	58,37	30,33	14,20
	G2=ENFERMEDAD	mujer	1	16,16	16,16	16,16	
		varón	1	31,18	31,18	31,18	
HT	G0=NO FRV	mujer	18	4,96	54,63	26,28	16,49
		varón	12	2,62	62,64	28,41	19,87
	G1=FRV MODERADO	mujer	5	10,17	74,91	52,51	25,36
		varón	11	5,67	160,75	37,12	45,18
	G2=ENFERMEDAD	mujer	4	25,08	54,28	37,31	13,28
		varón	2	23,11	41,21	32,16	12,79
HM	G0=NO FRV	mujer	7	19,18	48,36	32,92	10,75
		varón	8	11,79	45,74	25,41	14,65
	G1=FRV MODERADO	mujer	1	21,29	21,29	21,29	
		varón	3	7,07	25,19	16,22	9,06
	G2=ENFERMEDAD	varón	2	7,92	29,36	18,64	15,16

ES 2 380 738 A1

3.2. Influencia de los polimorfismos -110A>C y +190G>C en la Hsp70i sérica

Considerando la población global, la concentración de Hsp70i sérica no se ve afectada por la forma en la que se presentan los polimorfismos, presentando valores similares en los 3 grupos. Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis, se demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,861$).

TABLA 31

Hsp70i sérica según el genotipo de los SNPs del gen hsp70-1

<i>Hsp70i suero (ng/mL)</i>					
-110 A>C, +190 G>C	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	42	0,19	7,54	1,67	1,29
HT	52	0,23	4,03	1,66	0,95
HM	21	0,33	2,95	1,61	0,66

Al segmentar la población por genotipo y sexo, no se observaron diferencias estadísticamente significativa entre grupos para la [Hsp70i] sérica.

Por el contrario, al segmentar la población por genotipo y grupo de riesgo vascular, se observa, tal como se muestra en la tabla siguiente, que la menor [HSP70i] sérica se presenta en el grupo G2 *wild type* (WT) para los polimorfismos (AA ó GG), pero que no alcanza significación estadística, debido probablemente al pequeño tamaño muestral.

TABLA 32

Hsp70i sérica según el genotipo de los SNPs del gen hsp70-1 y el grupo de riesgo

<i>Hsp70i suero (ng/mL)</i>						
-110A>C, +190G>C	Grupo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	0,19	4,22	1,55	0,91
	G1=FRV MODERADO	9	0,57	7,54	2,30	2,15
	G2=ENFERMEDAD	2	0,31	0,89	0,60	0,41
HT	G0=NO FRV	30	0,23	4,03	1,78	1,03
	G1=FRV MODERADO	16	0,59	3,33	1,43	0,84
	G2=ENFERMEDAD	6	0,77	2,73	1,66	0,80
HM	G0=NO FRV	15	0,33	2,95	1,67	0,68
	G1=FRV MODERADO	4	0,96	2,66	1,42	0,82
	G2=ENFERMEDAD	2	1,34	1,76	1,55	0,29

3.3. Influencia de los polimorfismos -110A>C y +190G>C en los anticuerpos anti-Hsp70i circulantes

TABLA 33

[Anti-Hsp70i] circulantes según el genotipo de los SNPs del gen hsp70-1

<i>Anticuerpos anti-Hsp70i circulantes ($\mu\text{g/mL}$)</i>					
-110A>C, +190G>C	N	Mín	Máx	Media	S
WT	42	234,30	1061,59	554,49	209,74
HT	52	201,53	1632,41	591,72	279,81
HM	21	251,30	1450,12	675,54	347,08

Los sujetos que presentan la forma menos común de ambos polimorfismos, en homocigosis (HM) presentan los valores más altos de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, dato que, aunque no alcanza significación estadística (Kruskal-Wallis $p=0,481$), es de clara significación biológica.

Al segmentar por genotipo y grupo de riesgo vascular, se observa que los valores más bajos de anticuerpos anti-Hsp70 se encontraron en el grupo WT (forma más común del polimorfismo en homocigosis: AA ó GG) para ambos polimorfismos, con diferencias próximas a la significación estadística (Kruskal-Wallis: $p=0,159$), a excepción del grupo G2 en HM que presentó el valor menor.

TABLA 34

[Anti-Hsp70i] circulantes según el genotipo de los SNPs del gen *hsp70-1* y el grupo de riesgo

<i>Ac. anti-Hsp70 circulantes ($\mu\text{g/mL}$)</i>						
-110A>C, +190G>C	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	303,71	1061,59	587,93	218,49
	G1=FRV MODERADO	9	234,30	669,22	437,07	154,52
	G2=ENFERMEDAD	2	460,86	668,28	564,57	146,66
HT	G0=NO FRV	30	201,53	1358,05	561,40	270,68
	G1=FRV MODERADO	16	245,72	1632,41	617,20	311,84
	G2=ENFERMEDAD	6	513,39	1180,60	675,40	256,77
HM	G0=NO FRV	15	251,30	1339,63	697,07	317,47
	G1=FRV MODERADO	4	307,33	1450,12	715,55	520,59
	G2=ENFERMEDAD	2	267,91	600,11	434,01	234,90

3.4. Influencia de los polimorfismos -110A>C y +190G>C en los anticuerpos anti-Hsp60 circulantes

TABLA 35

[Anti-Hsp60] circulantes según el genotipo de los SNPs del gen *hsp70-1*

<i>Anticuerpos anti-Hsp60 circulantes ($\mu\text{g/mL}$)</i>					
-110A>C, +190G>C	N	Mín	Máx	Media	S
WT	42	10,01	217,88	54,19	42,84
HT	52	11,15	346,50	64,63	61,47
HM	21	16,61	308,55	68,02	80,46

Los sujetos homocigóticos mutantes (HM) para los SNPs presentan la mayor concentración de anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, mientras que la menor concentración corresponde al grupo WT, sin que alcance diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis: $p=0,887$).

Al segmentar por genotipo y sexo, se observa que las mujeres presentan concentraciones circulantes de anticuerpo anti-Hsp60 superiores al grupo de varones, cuando ambos SNPs están presentes en heterocigosis (HT) y especialmente en homocigosis (HM), pero que no alcanza significación estadística, lo que habrá que confirmar con un tamaño muestral mayor.

TABLA 36

[Anti-Hsp60] circulantes según genotipo de los SNPs del gen *hsp70-1* y sexo

<i>Anticuerpos anti-Hsp60 circulantes ($\mu\text{g/mL}$)</i>						
-110A>C, +190G>C	Sexo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	mujer	23	10,01	150,55	54,46	40,27
	varón	19	19,42	217,88	53,87	46,89
HT	mujer	27	11,15	346,50	72,85	67,52
	varón	25	13,78	253,43	55,75	54,16
HM	mujer	8	16,61	294,47	83,10	89,89
	varón	13	17,77	308,55	58,73	76,36

ES 2 380 738 A1

Al segmentar por grupo de riesgo vascular, se observa que la mayor concentración de anticuerpos circulantes se encuentra en el G0 sin factores de riesgo vascular, independiente del genotipo para los SNPs, pero que en el grupo de HT arroja diferencias más marcadas (Kruskal-Wallis: $p=0,221$).

TABLA 37

[Anti-Hsp60] circulantes según el genotipo de los SNPs del gen hsp70-1 y el grupo de riesgo

Anticuerpos anti-Hsp60 circulantes ($\mu\text{g/mL}$)						
-110A>C, +190G>C	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	10,01	217,88	58,43	47,79
	G1=FRV MODERADO	9	22,88	97,59	44,01	22,98
	G2=ENFERMEDAD	2	23,67	44,89	34,28	15,00
HT	G0=NO FRV	30	12,65	346,50	76,98	72,43
	G1=FRV MODERADO	16	11,15	155,57	50,18	44,07
	G2=ENFERMEDAD	6	33,97	54,42	41,40	7,71
HM	G0=NO FRV	15	16,61	308,55	76,99	93,53
	G1=FRV MODERADO	4	17,77	87,74	44,05	30,32
	G2=ENFERMEDAD	2	46,48	50,81	48,64	3,06

- Ejemplo 4

Influencia de los polimorfismos del gen hsp70-1 en la relación entre proteínas choque térmico (Hsps y anticuerpos anti-Hsps) y homocisteinemia

En este ejemplo se analizó la posible influencia que los polimorfismos -110A>C y +190G>C pudieran tener en las relaciones entre la homocisteinemia y los parámetros analizados para las proteínas de choque térmico (concentración sérica e intraleucocitaria de Hsp70i y anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60).

Sólo se presentan aquellas correlaciones que alcanzan significación estadística, así como las que implican interés biológico.

4.1. Población global

Aunque no se demuestra en la población global correlación entre los niveles de anticuerpos anti-Hsp60 y tHcy, al agrupar por genotipo se observa correlación inversa en el grupo que presenta la mutación en heterocigosis y que alcanza significación estadística.

TABLA 38

Rho de Spearman para correlación entre tHcy y anti-Hsp60 por genotipo del SNP -110A>C del gen hsp70-1

		-110A>C	-110A>C:	-110A>C:
		WT	HT	HM
<i>Rho de Spearman</i>		tHcy	tHcy	tHcy
Anti-Hsp60	Coeficiente de correlación	-,106	,115	-,366**
	Sig. (bilateral)	,257	,469	,008
	N	115	42	52
				21

4.2. Agrupado por sexo

Se realiza correlación bivariada entre tHcy total y los niveles de Hsp70i intraleucocitaria y sérica, y niveles de anticuerpos circulantes anti-Hsp70 y anti-Hsp60 agrupado por genotipo (zona sombreada de la tabla) y sexo.

TABLA 39

Rho de Spearman para correlación entre tHcy y anti-Hsp60 por genotipo del SNP -110A>C del gen hsp70-I, para varones

Varón			-110 A>C: WT	-110 A>C: HT	-110 A>C: HM
<i>Rho de Spearman</i>		tHcy	tHcy	tHcy	tHcy
AntiHsp60	Coefficiente de correlación	-,152	,023	-,540**	,396
	Sig. (bilateral)	,260	,925	<u>,005</u>	,181
	N	57	19	25	13

** La correlación es significativa al nivel 0,0001 (bilateral)

Se observa que la correlación obtenida en la población global, entre [tHcy] y anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, se produce a expensas del grupo de los varones heterocigotos para la mutación -110A>C, con alta significación estadística.

4.3. Por grupo de riesgo vascular

Se realiza correlación bivariada entre tHcy total y los niveles de Hsp70i intraleucocitaria y sérica, y niveles de anticuerpos circulantes anti-HSP70 y anti-Hsp60 en la población agrupada por riesgo vascular y genotipo (zona sombreada de la tabla) Se obtiene el coeficiente Rho de Spearman. Se presentan las tablas de los grupos con significación estadística

TABLA 40

Rho de Spearman para correlación entre tHcy y anti-Hsp70 por genotipo del SNP -110A>C del gen hsp70-I, en el grupo G1 de riesgo vascular

G1=FRV MODERADO			-110 A>C: WT	-110 A>C: HT	-110 A>C: HM
<i>Rho de Spearman</i>		tHcy	tHcy	tHcy	tHcy
AntiHsp70	Coefficiente de correlación	,522(**)	,433	,538(*)	,800
	Sig. (bilateral)	<u>,004</u>	,233	<u>,032</u>	,200
	N	29	9	16	4

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Analizada la población por genotipo y factores de riesgo vascular, se observa correlación estadísticamente significativa ($p=0,004$) entre [tHcy] y [anti-Hsp70] circulantes, que alcanza significación ($p=0,032$) en el grupo HT para el polimorfismo -110A>C del gen hsp70-I.

4.4. Por grupo de riesgo vascular, sexo y -110A>C

Se ha realizado correlaciones no paramétricas para obtener las posibles relaciones entre tHcy y proteínas de choque térmico, teniendo en cuenta el grupo de riesgo vascular, sexo y presencia del polimorfismo -110A>C. Se han encontrado las correlaciones que se indican en la siguiente Tabla:

ES 2 380 738 A1

TABLA 41

Rho de Spearman para correlación entre Hsps y [tHcy], segmentado por grupo de riesgo vascular, sexo y SNP -110A>C

Grupo	Sexo	-110 A>C			Hsp70i PMNs	Hsp70 suero	Anti-Hsp70	Anti-Hsp60
G0	mujer	WT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,068	-,377	,198	,266
				Sig. (bilateral)	,783	,111	,416	,270
	N	19	19	19	19			
		HM	tHcy	Coefficiente de correlación	-,698	-,239	,551	-,257
				Sig. (bilateral)	,081	,606	,200	,578
	N	7	7	7	7			
	varón	HT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,018	,504	-,211	-,307
				Sig. (bilateral)	,956	,095	,511	,331
N	12	12	12	12				
G1	varón	WT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,759	,030	,516	,638
				Sig. (bilateral)	,080	,954	,295	,173
N	6	6	6	6				
		HT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,155	,274	,662(*)	-
				Sig. (bilateral)	,649	,415	,026	,690(*)
N	11	11	11	11				

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Como se puede observar, se encontraron las siguientes correlaciones:

➤ Directa entre [tHcy] y [anti-Hsp70] circulantes en varones del G1 que son HT para la -110A>C (AC), n=11 (p=0,026).

➤ Inversa entre [tHcy] y [anti-Hsp60] en varones del G1 y HT para-110A>C, n=11 (p=0,019).

- Ejemplo 5

Relación entre proteínas de choque térmico y anticuerpos anti-Hsps en la aterosclerosis

En este ejemplo se intentó analizar si en la enfermedad vascular existe un componente inmunológico que incluya reactividad de las Hsps.

Como en el Ejemplo anterior, sólo se presentan aquellas correlaciones que alcanzan significación estadística, así como las que implican interés biológico.

5.1. Población global

TABLA 42

Rho de Spearman para correlación entre parámetros de la Hsps

<i>Rho de Spearman</i>		AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	-,093	-,228(*)
	Sig. (bilateral)	,323	,014
	N	115	115
Hsp70 suero	Coefficiente de correlación	-,174	-,031
	Sig. (bilateral)	,064	,740
	N	115	115

**La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).*

Al estudiar la influencia de los polimorfismos, se demuestra correlación inversa, estadísticamente significativa (p=0,005) entre [Hsp70i] intraleucocitaria y anticuerpos anti-Hsp60, a expensas del grupo HT para el polimorfismo -110A>C.

TABLA 43

Rho de Spearman para correlación entre Hsp70i en PMN y anti-Hsps

SNPs	<i>Rho de Spearman</i>	AntiHsp70	AntiHsp60
-110A>C:HT	Hsp70i PMNs Coeficiente de correlación	-,020	-,383(**)
	Sig. (bilateral)	,888	,005
	N	52	52

*** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

5.2. Agrupado por sexos

En el grupo de mujeres se observa una correlación inversa, estadísticamente significativa; (p=0,002) entre [Hsp70] intracelular y anticuerpos circulantes anti-Hsp60.

TABLA 44

Rho de Spearman para correlación entre Hsp70i en PMN y anti-hsp60, por sexo (mujer)

<i>Mujer</i>		AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	-,396(**)
	Sig. (bilateral)	,002
	N	58

*** La correlación es significativa al nivel 0,001 (bilateral).*

Al segmentar la población por sexo y genotipo -110A>C, tal como se observa en la Tabla siguiente, se demuestran las siguientes correlaciones:

- En el grupo de los varones: Inversa y significativa (p=0,019) entre [Hsp70] sérica y anticuerpos anti-Hsp60 en el grupo WT.

- En el grupo de las mujeres: 1) inversa y significativa (p=0,001) entre [Hsp70] en PMNs y anticuerpos circulantes anti-Hsp60, en el grupo HT y 2) inversa y significativa (p=0,021) entre [Hsp70] séricas y [anti-Hsp60] en el grupo HM.

ES 2 380 738 A1

TABLA 45

-110 A>C	Sexo	<i>Rho de Spearman</i>		AntiHsp60
WT	varón	Hsp70i suero	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,533* <u>,019</u> 19
HT	mujer	Hsp70i PMNs	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,617(*) <u>,001</u> 27
HM	mujer	Hsp70i suero	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,786(*) <u>,021</u> 8

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

5.3. Por grupo de riesgo vascular

Tal como se puede ver en las tablas siguientes, en la mayoría de las situaciones se observa una correlación inversa entre anticuerpos anti-Hsp60 y Hsp70 PMNs.

TABLA 46

<i>G0: NO FRV</i>		Hsp70i PMNs	Hsp70 suero	Anti Hsp70	Anti Hsp60
AntiHsp70	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,093 ,425 76	-,149 ,198 76	1,000 . 76	,251(*) <u>,029</u> 76
<i>G1: FRV MODERADO</i>		Hsp70i PMNs	Hsp70 suero	Anti Hsp70	Anti Hsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	1,000 . 29	,131 ,498 29	-,245 ,201 29	-,323 <u>,087</u> 29
<i>G2: ENFERMEDAD</i>		Hsp70i PMNs	Hsp70 suero	Anti Hsp70	Anti Hsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	1,000 . 10	,576 ,082 10	,588 <u>,074</u> 10	-,285 ,425 10

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

TABLA 47

-110 A>C	Grupo	<i>Rho de Spearman</i>		Hsp70i PMNs	Anti Hsp70
WT	G1=FRV MODERADO	Anti-Hsp60	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,750* <u>,020</u> 9	
HT	G0=NO FRV	Anti-Hsp60	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N		,497(**) <u>,005</u> 30

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

ES 2 380 738 A1

5.4. Por grupo de riesgo vascular y sexo

Se presentan los resultados obtenidos para Hsp70 y anticuerpos anti-Hsp70, al segmentar por grupo de riesgo y sexo, así como las correlaciones que alcanzan significación estadística.

TABLA 48

Hsp70i intracelular y sérica por grupo de riesgo vascular y sexo

Grupo	Sexo	N	Hsp70 PMNs				Hsp70 suero			
			Min.	Máx.	Media	s	Min	Máx	Media	s
NO FRV (G0)	mujer	44	4,64	74,63	29,37	17,91	,19	4,03	1,59	95
	varón	32	2,62	62,64	30,10	17,41	,33	4,22	1,77	87
FRV MODERADO (G1)	mujer	9	10,17	74,91	46,40	21,30	,90	3,33	1,58	76
	varón	20	5,67	160,75	31,95	34,51	,57	7,54	1,75	1,61
ENFERMEDAD (G2)	mujer	5	16,16	54,28	33,08	14,89	,31	2,40	1,25	86
	varon	5	7,92	41,21	26,55	12,27	,89	2,73	1,60	70

Las mujeres pertenecientes a grupos de riesgo vascular (G1 y G2) presentan niveles de Hsp70 intracelulares superiores a los varones, especialmente en el G1 para las que la diferencia alcanza significación estadística ($p=0,048$ U Mann-Whitney). Sin embargo en el grupo sin riesgo vascular no se observa diferencias.

A lo largo de los grupos de riesgo vascular, las mujeres presentan niveles de Hsp70 circulantes inferiores a los varones, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística.

Con respecto a los niveles de anticuerpos circulantes, las mujeres de los grupos de riesgo G1 y G2, presentan niveles de anticuerpos anti-Hsp70 superiores a los varones, lo que es más relevante en el G2, sin que existan diferencias significativas. Sin embargo para los anticuerpos anti-Hsp60 esta tendencia se invierte en el grupo de enfermedad G2, de forma que las mujeres presentan niveles inferiores a los varones, aunque no hay diferencias significativas.

TABLA 49

Anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60 por grupo de riesgo y sexo

Grupo	Sexo	N	Anticuerpos Anti-Hsp70				Anticuerpos Anti-Hsp60			
			Mín	Máx	Media	s	Mín	Máx	Media	s
NO FRV (G0)	mujer	44	201,53	1358,05	590,83	251,65	10,01	346,50	72,97	66,94
	varón	32	251,30	1339,63	610,23	279,88	18,26	308,55	64,53	70,80
FRV MODERADO (G1)	mujer	9	265,46	1450,12	606,85	343,42	11,15	155,57	52,75	46,70
	varón	20	234,30	1632,41	560,47	306,48	13,78	128,50	45,02	31,27
ENFERMEDAD (G2)	mujer	5	460,86	1180,60	680,09	293,06	33,97	46,00	39,76	5,59
	varón	5	267,91	668,28	529,82	156,38	23,67	54,42	43,09	12,09

Al segmentar los grupos de riesgo vascular de acuerdo al sexo, se observa las siguientes correlaciones estadísticamente significativas:

ES 2 380 738 A1

TABLA 50

Rho de Spearman para correlación entre Hsps según sexo y riesgo

<i>Mujer y G1: FRV MODERADO</i>		Hsp70i PMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coeficiente de correlación	1,000	,167	-,417	-,817(**)
	Sig. (bilateral)	.	,668	,265	<u>,007</u>
	N	9	9	9	9
Hsp70 suero	Coeficiente de correlación	,167	1,000	-,833(**)	-,100
	Sig. (bilateral)	,668	.	<u>,005</u>	,798
	N	9	9	9	9
<i>Mujer y G2: ENFERMEDAD</i>		Hsp70i PMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coeficiente de correlación	1,000	,900(*)	,900(*)	-,500
	Sig. (bilateral)	.	<u>,037</u>	<u>,037</u>	,391
	N	5	5	5	5
<i>Varón y G2: ENFERMEDAD</i>		Hsp70i PMNs	Hsp70isero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70 suero	Coeficiente de correlación	,100	1,000	-,800	,900(*)
	Sig. (bilateral)	,873	.	,104	<u>,037</u>
	N	5	5	5	5

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la población sin factor de riesgo, no se demuestra correlación entre [Hsp70i] intraleucocitaria y los restantes parámetros relacionados con las Hsps.

Las mujeres del G1 demuestran correlación significativa a nivel 0,01.

- Ejemplo 6

Estudio epidemiológico de la relación de la Hsp70i y sus anticuerpos en la aterosclerosis según el genotipo de los SNPs del gen hsp70-1. Comparación con el SNP 677C>T

6.1. *Clasificación de los individuos según la producción de Hsp70i*

Para verificar la posible relación entre la producción de Hsp70i y la protección frente a la aterosclerosis y los eventos cardiovasculares relacionados, se clasificó a los individuos, de acuerdo a la distribución poblacional “no normal” de Hsp70, obteniendo los percentiles P₂₅, P₅₀, P₇₅, de forma que aquellos individuos con niveles inferiores el P25 serían “hipo” productores, aquellos con niveles incluidos en el intervalo P₂₅-P₇₅, serán “normo” productores y aquellos con niveles superiores al P₇₅, se clasifican como “hiper” productores. Esto se hizo para poder relacionar adecuadamente la producción con la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados en el promotor del gen *hsp70-1* y el resto de los parámetros en estudio. La tabla siguiente recoge los valores obtenidos y su clasificación.

TABLA 51

Concentración de Hsp70i intracelular y sérica en los distintos percentiles

		Clasificación	Hsp70 PMNs	Hsp70 suero
N (Nº sujetos)	Válidos		115	115
Percentiles	25	HIPOPRODUCTOR	16,16	,91
	50	NORMOPRODUCTOR	28,61	1,47
	75	HIPERPRODUCTOR	44,40	2,25

6.2. Influencia de los polimorfismos del gen *hsp70-1* en la producción de Hsp70i y anticuerpos anti-Hsp

Observando la Tabla 27, se encuentra que, en la población estudiada, los individuos homocigotos mutados (HM) para los polimorfismos -110A>C y +190G>C, presentan los valores más bajos de Hsp70i en PMNs, siendo los varones HM del grupo G1 los que presentan niveles más bajos. Estos sujetos tendrían un potencial riesgo vascular más elevado que los aquellos WT o HT para los SNPs.

Las mujeres HT del G1 presentan los valores más altos de Hsp70i en PMNs, por lo que se podría pensar que el estado de portador constituye una situación protectora.

Completando el análisis, los individuos HM presentan los niveles más altos de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes.

Al analizar la relación entre la presencia/ausencia de los SNPs con el % de expresión de Hsp70 en PMNs, se observa que % de hiperproductores de Hsp70i en PMNs es menor cuando la mutación -110A>C está en homocigosis, como se recoge en la Fig. 4A.

Por tanto la presencia de las formas consideradas mutantes de los polimorfismos -110A>C y +190G>C en homocigosis, constituiría un factor de riesgo añadido.

Por lo que se refiere a los anticuerpos anti-Hsp60, no se ha podido demostrar ninguna relación entre los niveles de anticuerpos circulantes y la presencia/ausencia de los SNPs del promotor del gen *hsp70*. Sin embargo los niveles de anti-Hsp60 parecen estar relacionado con la enfermedad, ya que los menores valores se observan en el grupo G2 de enfermedad aterosclerosis. Parece pues que los anticuerpos anti-Hsp60 no se modifican por mutaciones en genes diferentes del que codifica para su proteína y que sus valores están en relación sólo con la presencia de la enfermedad.

Sin embargo, existe una correlación inversa y estadísticamente significativa ($p=0,019$) entre los niveles circulantes de anticuerpos anti-Hsp60 y tHcy, en el grupo de varones HT para la -110A>C del G1, según se observa en la Tabla 41. Si se considera la HT (heterocigosis) como situación protectora, los varones del G1 en situación de \uparrow tHcy, \downarrow anti-Hsp60, \uparrow anti-Hsp70, que presenten valores: más altos de Hsp70i en PMNs, tendrían mejor pronóstico.

Por tanto, desde el punto de vista de evaluación de riesgo vascular, la peor situación sería: varón del G1 ó G2, HM para -110A>C, hipoproducción de Hsp70i PMNs, hiperhomocisteinémico, con niveles de anticuerpos anti-Hsp70 elevados y niveles de anticuerpos anti-Hsp60 bajos.

6.3. Biología de las Hsps en aterosclerosis

Se realizó un análisis similar al del punto 6.2 comparando el porcentaje de producción de Hsp70i en PMNs en función del grupo de riesgo vascular. Los resultados se esquematizan en el panel B de la Fig. 4.

En ausencia de factores de riesgo vascular, los individuos clasificados dentro del grupo G0, presentan una menor expresión de Hsp70i intracelular que el resto de individuos con algún factor de riesgo vascular. Este grupo presenta el mayor porcentaje (26,32%) de individuos hipoproducción de Hsp70i PMNs, como recoge el panel B de la Fig. 4, debido probablemente a la ausencia de agentes estresante.

En este grupo (G0) se ha podido demostrar correlación directa ($p=0,029$) entre los niveles circulantes de anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60, lo que parece indicar, incluso en ausencia de estrés, la existencia de un mecanismo autoinmune. Los niveles más altos de anticuerpos anti-Hsp60 se presentan en el G0. Esta correlación es más significativa ($p=0,005$) en los individuos G0 que presentan la mutación -326A>C del promotor del gen *hsp70* en heterocigosis.

A la vista de los resultados obtenidos y a la búsqueda de nuevos marcadores que de forma individual pudieran indicar un futuro riesgo vascular, se podría plantear que en este grupo (G0) el aumento de Hsp70 intracelular estaría justificado en respuesta a algún tipo de estrés *a priori* no detectado, de forma que individuos clasificados como hiperproductores (H) de Hsp70i intracelular, estarían en mayor riesgo que los “normo”(N) o “hipo”(L) productores. Por tanto, un aumento en la expresión de Hsp70i intracelular en individuos del G0, constituiría un indicador de alarma de futuro riesgo.

En presencia de factores de riesgo vascular moderado, se induce la expresión de Hsp70i intracelular en respuesta a la agresión, de forma que los individuos del grupo G1 presentan los niveles más altos de Hsp70i en PMNs, así como el porcentaje más alto (31,03%) de sujetos hiper(H)-productores, tal y como se muestra en el panel B de la Fig. 4. Las mujeres del G1, presentan niveles más altos que los varones. Así mismo se ha observado la existencia de una correlación inversa entre Hsp70i en PMNs y anticuerpos circulantes anti-Hsp60, que alcanza significación estadística ($p=0,007$) en las mujeres del G1, en las que se demuestra también correlación inversa y significativa ($p=0,005$) entre los niveles de Hsp70i séricos y anticuerpos circulantes anti-Hsp70, lo que apoya el mecanismo de acción propuesto anteriormente.

En este grupo (G1) las mujeres tendrán un mejor pronóstico, mientras que los individuos hipoproducción de Hsp70i en PMNs, especialmente varones, tendrían un peor pronóstico.

En el grupo de enfermedad (G2), se produce igualmente una correlación entre Hsp70i PMNs y suero, que en el caso de las mujeres es significativa ($p=0,037$), lo que confirmaría el mecanismo propuesto, pero sin embargo en las mujeres se observa una correlación directa entre niveles de Hsp70i en PMNs y anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, situación inversa a la que se produce en los grupos G0 y G1 y en los varones del G2, lo que podría indicar que en el grupo de mujeres en situación de enfermedad (G2), la formación del complejo antígeno-anticuerpo se modifica, bien por alteración de los sitios de unión del anticuerpo anti-Hsp70, o bien por una alteración de las propiedades de Hsp70 séricas como antígeno. Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral del G2, es difícil sacar conclusiones.

Una situación similar ocurre con los anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, en donde las relaciones observadas se producen de forma inversa cuando se compara de acuerdo al sexo, de forma que los hombres del G2 presentan correlación directa ($p=0,037$) entre Hsp70 séricas y anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, mientras que las mujeres del G2 presentan correlación inversa que no alcanza significación.

La presencia de individuos hiper(H)-productores de Hsp70i disminuye con el grado de riesgo vascular de manera concomitante con la presencia del polimorfismo -110A>C tal y como se recoge en el panel C de la Fig. 4. Por ello, se ha pensado que esto podría constituir un nuevo marcador de riesgo vascular, idea que es una de las bases de la presente invención.

Por tanto, según estos resultados, los niveles elevados de Hsp70 intracelulares que poseen propiedades inflamatorias, se han relacionado con el desarrollo y pronóstico de la aterosclerosis, y se asocia al genotipo salvaje de los polimorfismos -110A>C y +190G>C del promotor del gen *hsp70-1*. Niveles disminuidos de Hsp70i en PMNs asocian con el genotipo mutante (CC).

Ante la agresión celular y/o un daño endotelial, la célula respondería activando los genes que codifican Hsps, lo que lleva a un incremento en la síntesis de Hsp70 intracelulares. La sobreexpresión de Hsp70i intracelular daría lugar a un incremento en el transporte a la membrana y su extravasación celular, alcanzándose un equilibrio transmembrana. Así, las Hsp70 circulantes (séricas) podrían reflejar la situación de las Hsp70 intracelulares.

Con la progresión de la enfermedad, se produciría un aumento de proteasas que pudieran provocar la degradación de las Hsp70 intracelulares, disminuyendo sus niveles.

Las Hsp70 juegan un importante papel en la protección celular frente al daño isquémico, de forma que niveles elevados de Hsp70 podrían reducir la adhesión plaquetaria en la inflamación. Los anticuerpos se han relacionado con el desarrollo y pronóstico de la aterosclerosis, de forma que al aumentar las Hsp70 intracelulares y séricas, disminuirían los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, lo que implicaría un mejor pronóstico.

6.4. Relación entre el SNP 677C>T del gen de la MTHFR y los SNPs del gen *hsp70-1*

La observación de las Tablas de datos mostradas en apartados anteriores indican que la frecuencia de aparición de los distintos genotipos encontrada para los SNPs -110A>C y +190G>C del gen *hsp70-1* es muy similar a la obtenida para la mutación 677C>T del gen de la enzima MTHFR, tanto en población general como al segmentar por sexo (véanse las Tablas 19 y 17, respectivamente), lo que podría sugerir, aunque con baja probabilidad, la existencia de una posible asociación o relación.

Sin embargo, la realizar la correlación bivariada no paramétrica entre la frecuencia de los SNPs del gen *hsp70-1* y el gen de la MTHFR, se demuestra la ausencia de correlación, siendo simplemente una casualidad la similitud de porcentajes.

Por el contrario, al segmentar la población por grupo de riesgo vascular, se observa que la frecuencia de aparición del genotipo homocigótico mutante (HM) para los polimorfismos analizados del gen *hsp70-1* es muy similar en los tres grupos (G0, G1, G2), lo que sin embargo no ocurre con el SNP del gen de la MTHFR, en el que el genotipo HM es mucho menos frecuente en el grupo sin factores de riesgo vascular.

Referencias bibliográficas

Dulin E, Guisasaola MC, Deseo MM, Suárez A, García-Barreno P (2005) *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2005, 106: Abstract 4107.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyete P, Shepard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kuijman LAJ, van den Heuvel LP, Rozen E. (1995) *Nat Genet* 10: 111-113.

Gordon T, Kannel WB (1982). *Am Heart J* 103: 1031-9.

Guisasaola MC, Dulin E, Deseo MM, Suárez A, García-Barreno P. (2007) *Journal of Leukocyte Biology Supplement* 2007, 34, página 24.

ES 2 380 738 A1

He M et al. (Plos ONE; 31-03-2009, Vol. 4, N° 3, e4851; doi: 10.1371/journal.pone.0004851).

Kannel WB, McGee DL (1979). *Circulation* 59: 8-13.

5 **Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH** (1998). *Circulation* 98: 300-307.

Lamb DJ, Tickner ML, Dreux AC, El-Sankary W, Hourani S, Eales-Reynolds L, Ferns G (2004). *Atherosclerosis* 172: 13-20.

10 **Radford NB, Fina M, Benjamin IJ et al.** (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2339-2342.

Wald DS, Law M, Morris JK. (2002) *Br Med J* 325: 1202-1209.

15 **Welch GN, Loscalzo J.** (1998). *N Engl J Med* 338: 1042-50.

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. (1998). *Circulation* 97:1837-47.

20 **Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Pyörälä K et al.** (1998). *Atherosclerosis* 140: 199-270.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 380 738 A1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular que comprende las etapas de:

- a) preclasificar al individuo como carente de riesgo vascular (G0), sin enfermedad pero con riesgo vascular moderado ($\geq 10\%$) (G1) o con enfermedad aterosclerótica declarada (G2), aplicando la tabla de riesgo coronario de las Sociedades Europeas (*Task Force Chart*);
- b) preclasificar los valores obtenidos en una muestra de sangre del individuo para los siguientes factores:
 - i. concentración de proteína Hsp70i intraleucocitaria detectada en los PMN (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos), que se clasifica comparando con un estudio estadístico previo realizado en el grupo poblacional al que pertenezca el individuo, en:
 - alta, si es superior al percentil 75,
 - normal, si está comprendida entre el percentil 25 y el percentil 75,
 - baja, si es inferior al percentil 25;
 - ii. concentración de homocisteína total plasmática, que se clasifica, comparando con un estudio estadístico previo realizado en el grupo poblacional al que pertenezca el individuo, en:
 - alta, si es superior al percentil 95,
 - normal, si está comprendida entre el percentil 25 y el percentil 95,
 - baja, si es inferior al percentil 25;
 - iii. genotipo del individuo con respecto al polimorfismo -110A>C (rs1008438) del gen *hsp70-1*, que será:
 - homocigótico salvaje (WT) si ambas cromosomas presentan la forma A(AA),
 - heterocigótico (HT), si cada cromosoma presenta una forma distinta (AC) del polimorfismo, y
 - homocigótico mutante (HM) si ambas cromosomas presentan la forma C (CC);
- c) calificar el riesgo del individuo de presentar un evento cardiovascular según la tabla adjunta:

GRUPO DE RIESGO SEGÚN LA TASK FORCE		GENOTIPO SEGÚN EL POLIMORFISMO -110 A>C DEL GEN HSP70-1									
		WT (AA)			HT (AC)			HM (CC)			
G2	Factor adicional	Hsp70i	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja
		tHcy	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta
	Riesgo		Medio	Elevado	Alto	Elevado	Alto	Alto	Elevado	Alto	Alto
G1	Factor adicional	Hsp70i	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja
		tHcy	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta
	Riesgo		Medio	Medio	Elevado	Medio	Elevado	Elevado	Medio	Elevado	Alto
G0	Factor adicional	Hsp70i	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja	Alta	Normal	Baja
		tHcy	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta	Baja	Normal	Alta
	Riesgo		Bajo	Bajo	Medio	Bajo	Medio	Medio	Bajo	Medio	Elevado

ES 2 380 738 A1

2. Procedimiento para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular según la reivindicación 1, en el que la concentración de proteína Hsp70i intraleucocitaria, determinada en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, se preclasifica de acuerdo con los siguientes valores:

- 5 a) baja: menor o igual a 16,16 ng/mL;
- b) normal: mayor que 16,16 ng/mL y menor que 44,40 ng/mL;
- 10 c) alta: mayor que 44,40 ng/ml.

3. Procedimiento para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la concentración de homocisteína plasmática total se preclasifica de acuerdo con los siguientes valores:

- 15 a) baja: menor o igual a 7 $\mu\text{mol/L}$;
- b) normal: mayor o igual a 7 $\mu\text{mol/L}$ y menor o igual a 10 $\mu\text{mol/L}$;
- 20 c) alta: mayor que 10 $\mu\text{mol/L}$.

4. Procedimiento para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular según la reivindicación 1 ó 2, en el que la concentración de homocisteína plasmática total se preclasifica en función del sexo, siendo alta si superara el valor de 11 $\mu\text{mol/L}$ en el caso de individuos del sexo femenino y 13 $\mu\text{mol/L}$ en el caso de individuos del sexo masculino

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polimorfismo del gen *hsp70-1* cuyo genotipo se analiza es el polimorfismo +190G>C (rs1043618).

30

35

40

45

50

55

60

65

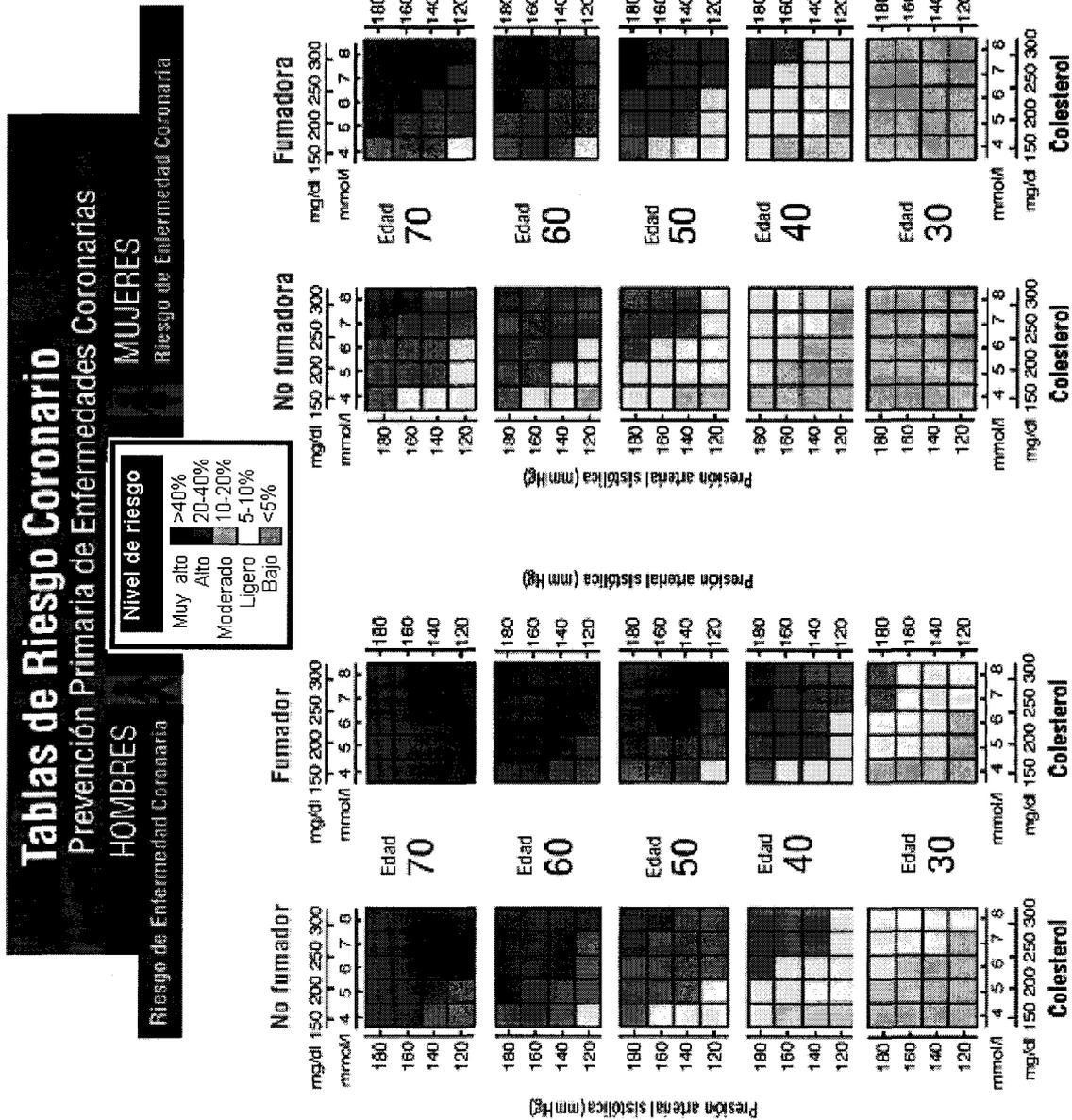
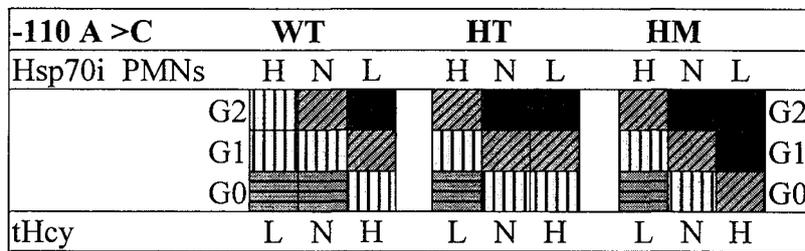


Fig. 1



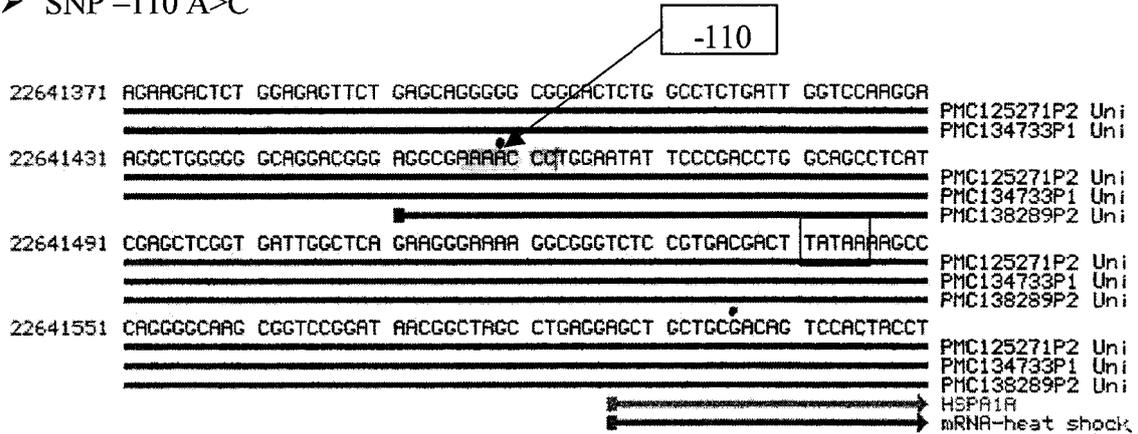
Riesgo:



Fig. 2

A

➤ SNP -110 A>C



B

➤ SNP +190 G>C

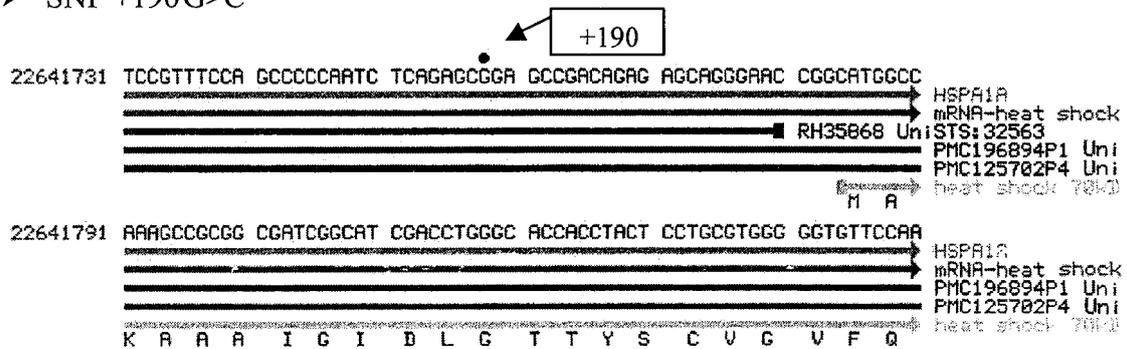


Fig. 3

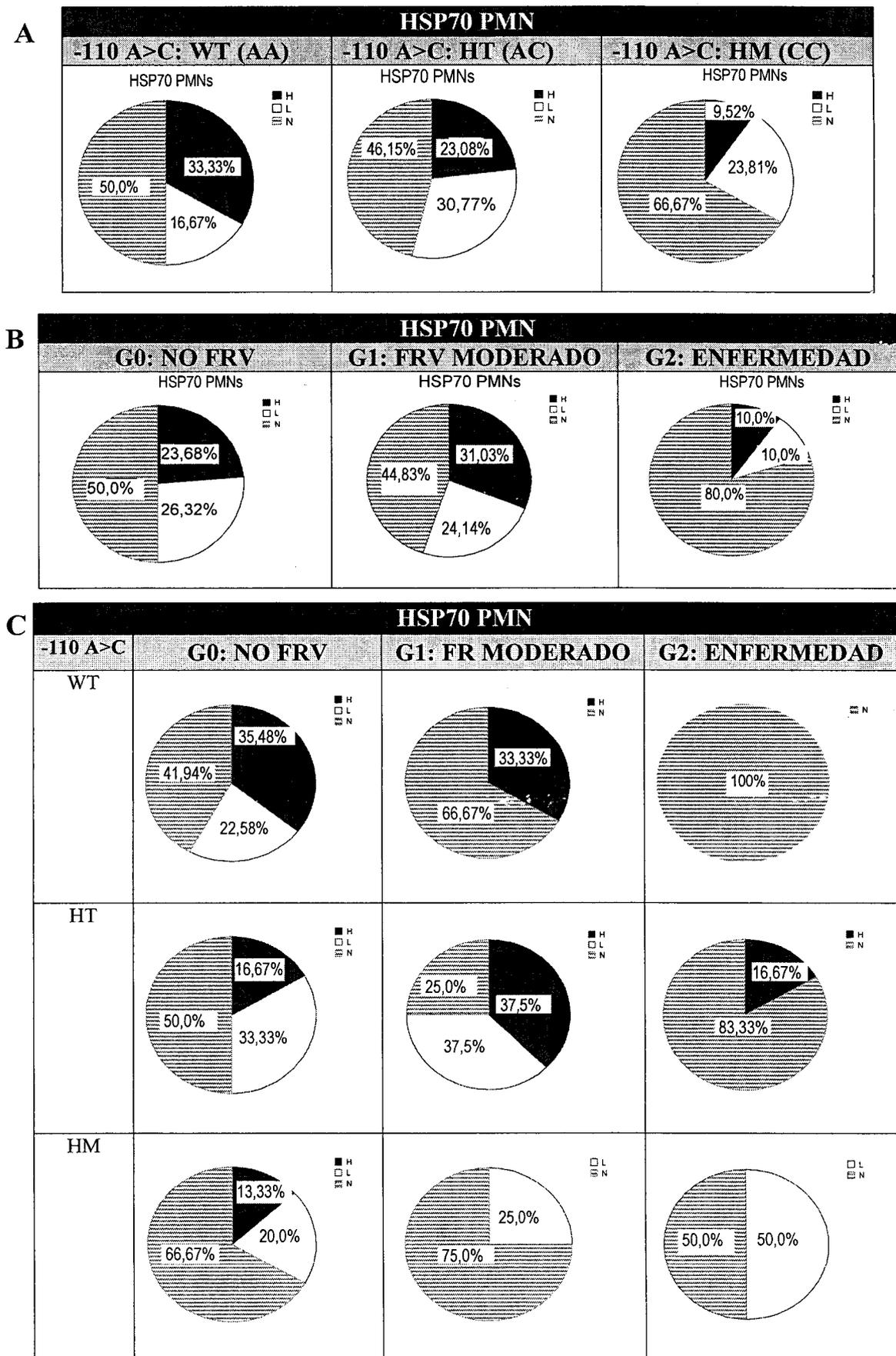


Fig. 4

ES 2 380 738 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón
- 5 <120> PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA EVALUAR EL RIESGO CARDIOVASCULAR
- <130> P-100880
- 10 <160> 7
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Cebador directo de PCR para la región del polimorfismo 677C>T del gen que codifica la enzima MTHFR humana: F-C677T(+)
- 25 <400> 1
- tgaaggagaa ggtgtctgcg gga 23
- 30 <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Cebador inverso de PCR para la región del polimorfismo 677C>T del gen que codifica la enzima MTHFR humana: R-C677T(-)
- 40 <400> 2
- 45 aggacggtgc ggtgagagtg 20
- 50 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Cebador directo de PCR de la región reguladora del gen humano hsp70-1: F1 /nota: apareamiento en nucleótido 22641002 del gen
- 60 <400> 3
- actgcacaac cgggggtcccc 20
- 65 <210> 4
<211> 20

ES 2 380 738 A1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador inverso de PCR de la región reguladora del gen humano hsp70-1: R1

<400> 4

10

agtcgtcacg gagacccgcc

20

<210> 5

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador directo de PCR de la región reguladora del gen humano hsp70-1: F2

<400> 5

25

ggcggcactc tggcctctga

20

30 <210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador inverso de PCR de la región reguladora del gen humano hsp70-1: R2C

40 <400> 6

ggccatgccg gttccctgct

20

45 <210> 7

<211> 20

<212> DNA

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de PCR de la región reguladora del gen humano hsp70-1: R2D
/nota: apareamiento en nucleótido 22642055 del gen

55

<400> 7

60

gccagtgett catgtccgac

20

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901923

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.09.2009

③② Fecha de prioridad: **20-10-2010**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
G01N33/53 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DULIN-IÑIGUEZ E. et al. Relation between homocysteine and heat shock proteins in general population. XIV International Symposium on Atherosclerosis. 20.06.2006, Poster Session Tu-P10:417, todo el documento.	1-5
Y	HE M. et al. Functional SNPs in HSPA1A gene predict risk of coronary heart disease. Plos ONE. 31.03.2009, Vol. 4, Nº 3, e4851, todo el documento.	1-5
Y	GUISASOLA M.C. et al. Epidemiological study of hsp72 promoter and homocysteine polymorphisms in a general population. Journal of Leukocyte Biology Supplement 2007, Nº 34, página 24, todo el documento.	1-5
Y	DULIN E. et al. Hyperhomocysteinemia and Heat Shock Proteins. Epidemiological study in a general population. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2005, Vol.106, Abstract 4107, todo el documento.	1-5
A	DULIN E. et al. Heat Shock proteins (Hsps), inflammation and immune responses in atherosclerosis (AT). Journal of Leukocyte Biology Supplement 2007, abstract 64, página 34, todo el documento.	1-5
A	LIU J. et al. Effects of polymorphisms of heat shock protein 70 gene on ischemic stroke, and interaction with smoking in China. Clinica Chimica Acta. 2007, Vol. 384, páginas 64-68, todo el documento.	1-5
A	US 2005089914 A1 (YAMASAKI) 28.04.2005, todo el documento.	1-5
A	EPSTEIN F. H. Homocysteine and atherothrombosis. The New England Journal of Medicine. 09.04.1998, Vol. 338, Nº 15, páginas 1042-1050, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.12.2011

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-5	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DULIN-IÑIGUEZ E. et al. XIV International Symposium on Atherosclerosis. Poster Session Tu-P10:417	20.06.2006
D02	HE M. et al. Plos ONE. Vol. 4, Nº 3, e4851	31.03.2009
D03	GUISASOLA M.C. et al. Journal of Leukocyte Biology Supplement Nº 34, página 24	2007
D04	DULIN E. et al. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). Vol. 106, Abstract 4107	2005
D05	DULIN E. et al. Journal of Leukocyte Biology Supplement, abstract 64, página 34	2007
D06	LIU J. et al. Clinica Chimica Acta. Vol. 384, páginas 64-68	2007
D07	US 2005089914 A1	28.04.2005
D08	EPSTEIN F. H. The New England Journal of Medicine. Vol. 338, Nº 15, páginas 1042-1050	09.04.1998

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular que comprende las etapas de:

- preclasificar al individuo aplicando la tabla de riesgo coronario de las Sociedades Europeas
- determinar, a partir de una muestra de sangre extraída del individuo, los niveles de proteína Hsp70i intraleucocitaria, los niveles de homocisteína total plasmática y el genotipo del individuo con respecto al polimorfismo -110 A>C del gen hsp70-1
- calificar el riesgo del individuo de presentar un evento cardiovascular (reivindicaciones de la 1 a la 5).

D01 tiene como objetivo identificar nuevos biomarcadores de enfermedad vascular.

D02 determina si las variaciones genéticas en el gen HSPA1A están asociadas con el riesgo de padecer enfermedad cardíaca coronaria en sujetos previamente seleccionados en función de factores convencionales de riesgo vascular como el sexo, la edad, el tabaquismo, la hipertensión o el colesterol.

D03 estudia SNPs del promotor del gen Hsp72 y su correlación con homocisteína y el riesgo de enfermedad vascular.

D04 identifica nuevos marcadores de riesgo vascular.

D05 aplica, para identificar nuevos biomarcadores de enfermedad vascular, la clasificación Task Force de riesgo coronario y cuantifica la homocisteína plasmática total (tHcy), la proteína C reactiva, la Hsp72 sérica, los anticuerpos anti-Hsp72 y Hsp60, así como el polimorfismo C677T de la enzima MTHFR. Afirma que niveles altos de tHcy pueden considerarse marcadores de la progresión de AT y que la Hsp72 es citoprotectora.

D06 comprueba la relación que hay entre tres polimorfismos del gen Hsp70-1 y el riesgo de padecer ataque isquémico estudiando 116 pacientes que lo han sufrido y 116 controles. Como resultado del estudio establece que el polimorfismo +190 G/C (rs1043618) de dicho gen está asociado al riesgo de padecer ataque isquémico.

D07 divulga un método para determinar el riesgo de desarrollar arteriosclerosis e infarto de miocardio, así como la progresión de la enfermedad, consistente en analizar un set de polimorfismos de diversos genes, entre ellos, el SNP C-110→A del promotor del gen HSPA1A (6Q21.3).

D08 revisa estudios realizados para establecer la relación existente entre niveles elevados de homocisteína plasmática y enfermedad vascular.

NOVEDAD

En la documentación y bases de datos consultadas no se ha encontrado un procedimiento para evaluar el riesgo de padecer enfermedad coronaria tal y como el que es objeto de la presente invención. Por consiguiente, las reivindicaciones de la 1 a la 5 cumplen con el requisito de novedad.

ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 tiene como objetivo identificar nuevos biomarcadores de enfermedad vascular. Los sujetos son clasificados de acuerdo con la clasificación Task Force de riesgo coronario en tres grupos (G0, G1 y G2) y, tras tomarles una muestra de sangre, se analiza la homocisteína plasmática total (tHcy), la HSP70i intraleucocitaria y sérica, los anticuerpos anti-HSP70i y el polimorfismo C677T de la enzima MTHFR. La hiperhomocisteinemia ($> 11 \mu\text{mol/l}$) está presente en el 12% de la población. Los individuos con riesgo vascular (G1) presentan concentraciones de tHcy más elevadas que aquellos sin riesgo vascular (G0). Existe una correlación directa entre la concentración de tHcy y los anticuerpos anti-HSP70i en los grupos de riesgo.

La diferencia entre D01 y la presente invención es que en dicho documento se divulga, como uno de los biomarcadores a analizar para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular, el análisis del polimorfismo C677T de la enzima MTHFR en lugar de los polimorfismos -110 A>C o +190G>C del gen hsp70-1.

D02 determina si las variaciones genéticas en el gen HSPA1A están asociadas con el riesgo de padecer enfermedad cardíaca coronaria en sujetos previamente seleccionados en función de factores convencionales de riesgo vascular como el sexo, la edad, el tabaquismo, la hipertensión o el colesterol. En concreto, se estudian 2 SNPs del gen HSPA1, -110A/C (rs1008438) y +190G/C (rs1043618), encontrándose que el genotipo +190CC, así como el haplotipo -110C/+190C, están asociados a riesgo significativamente más alto de padecer la enfermedad, en comparación con el genotipo +190GG, por lo que ambos SNPs pueden utilizarse como marcadores en la identificación de sujetos con riesgo de padecer la enfermedad cardíaca coronaria.

Para un experto en la materia sería evidente sustituir el análisis del polimorfismo -110 A>C o del polimorfismo +190G>C del gen hsp70-1 (HSPA1) (D02) por la determinación del polimorfismo C677T de la enzima MTHFR en D01 y, por tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 5 no presentan actividad inventiva.

D03 estudia SNPs del promotor del gen Hsp72 y su correlación con homocisteína y el riesgo de enfermedad vascular. Primero clasifica a los sujetos, hombre y mujeres, en función de la Task Force de riesgo coronario, en tres grupos (G0, G1 y G2) y cuantifica la homocisteína total plasmática (tHcy), la mutación C677T en la enzima MTHFR y 3 SNPs del promotor del gen Hsp72 (NT_007592): -325 A>C, -27 G>C y -95 T>C. Los individuos HT para los SNPs -325 y -27 son los que presentan mayores concentraciones de tHcy en todos los grupos, de modo que se puede concluir que dichos individuos tienen un factor de riesgo vascular adicional para desarrollar aterosclerosis.

La diferencia entre D03 y la presente invención es que en dicho documento no se divulga, como un parámetro más a determinar para evaluar el riesgo de que un individuo padezca un evento cardiovascular, la determinación de la HSP70i intraleucocitaria y sí el análisis de la mutación C677T en la enzima MTHFR.

D04 identifica nuevos marcadores de riesgo vascular para lo cual clasifica a los sujetos de acuerdo con la clasificación Task Force de riesgo coronario y cuantifica la homocisteína plasmática total (tHcy), la proteína C reactiva (RCP), la HSP70i intraleucocitaria y en suero, los anticuerpos anti-HSP70i y el polimorfismo C677T de la enzima MTHFR, estableciendo correlaciones entre los distintos parámetros.

Para un experto en la materia sería evidente sustituir, como un biomarcador más, el análisis del polimorfismo C677T de la enzima MTHFR por el análisis de la HSP70i intraleucocitaria (D04) y, por tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 5 no presentan actividad inventiva.