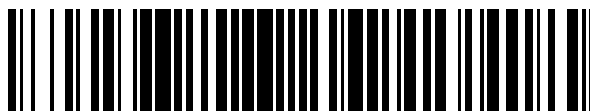


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 313**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08008523 .6**
96 Fecha de presentación: **10.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1962096**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **SCD40L, PAPP-A y factor de crecimiento placentario (PIGF) como combinación de marcadores bioquímicos en enfermedades cardiovasculares**

30 Prioridad:
16.11.2002 DE 10253525
08.04.2003 DE 10316059

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
GÖRZHÄUSER HOF EMIL-VON-BEHRING-
STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:
**ZEIHER, ANDREAS M.;
HEESCHEN, CHRISTOPHER;
DIMMELER, STEFANIE y
HAMM, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 313 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

SCD40L, PAPP-A y factor de crecimiento placentario (PIGF) como combinación de marcadores bioquímicos en enfermedades cardiovasculares

5 La invención se refiere a nuevos marcadores de la inflamación vascular y combinaciones de los mismos como herramientas para el diagnóstico y su pronóstico en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Los marcadores sirven adicionalmente como herramientas que facilitan la selección de principios activos para el tratamiento de tales enfermedades y finalmente como punto de partida para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, la invención se refiere a la creación de un perfil de riesgo individual de fenómenos negativos que están relacionados con el avance de la arteriosclerosis.

10 **Antecedentes de la invención**

La formación de un trombo en el vaso coronario es el acontecimiento desencadenante de una enfermedad cardiaca coronaria inestable. El papel central de la activación plaquetaria en pacientes con una enfermedad cardiaca coronaria inestable lo refuerzan adicionalmente los metabolitos de tromboxanos y las prostaglandinas que liberan las plaquetas. Por tanto, la activación plaquetaria es una diana terapéutica general. Hasta ahora, las terapias de este tipo han comprendido el uso de aspirina, tienopiridinas y un inhibidor de la glicoproteína IIb/IIIa directo. Sin embargo hasta hoy no pudo identificarse un marcador bioquímico fiable de la activación plaquetaria. Ciertos resultados con P-selectina, el marcador más prometedor hasta ahora para una activación plaquetaria, son hasta hoy controvertidos.

20 Los individuos que padecen una enfermedad cardiovascular, pueden clasificarse en individuos que no muestran ningún síntoma y aquéllos que muestran el dolor de pecho. El último grupo mencionado puede clasificarse en individuos que presentan una angina de pecho estable (SAP) y aquéllos con síndromes coronarios agudos (ACS). Los pacientes con ACS pueden presentar una angina de pecho inestable (IAP) o estos pacientes padecieron ya un infarto de miocardio (MI). El MI puede ser un MI con ST elevado o un MI sin ST elevado. La aparición de un MI puede estar acompañada de una disfunción ventricular izquierda (LVD). Por último, los pacientes con LVD atraviesan un fallo cardiaco congestivo (CHF) con una tasa de mortalidad de aproximadamente un 15 % o no muestran ningún síntoma.

25 Los pacientes que ingresan con dolores de pecho, se examinan en relación a una elevación o disminución del ST. Este es el caso que el individuo se opera con una probabilidad de casi el 100 % de permanecer en el hospital. Dado que, sin embargo, no todos los individuos con un MI muestran anomalías del ST, se determina el nivel de troponina (TnT) que en el caso de valores altos no habituales indica una alta probabilidad de que se produzca un MI.

30 Ciertos avances recientes en la investigación básica ha establecido un papel fundamental de la inflamación en la mediación de todas las fases de la arteriosclerosis, desde su inicio a través de avances y, finalmente, las complicaciones trombóticas de lesiones arterioscleróticas [Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9): 1135-43. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985;53(4):363-73. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91(11):2844-50.]. Los resultados obtenidos a partir de la relación entre la inflamación y la arteriosclerosis constituyen las razones para el uso de marcadores inflamatorios circulantes como instrumentos predictivos potenciales en pacientes con síndromes coronarios agudos. De hecho, los niveles elevados de marcadores inflamatorios, tales como por ejemplo proteína C reactiva altamente sensible (hsCRP), amiloide A sérico e interleucina-6 (IL-6), no sólo van acompañados generalmente de síndromes coronarios agudos [Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65(3):168-72., Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, *et al.* Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94(5):874-7.], sino (lo que es más importante) que pueden pronosticar también una afirmación sobre la salida clínica de pacientes con síndromes coronarios agudos [Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331(7):417-24., Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, *et al.* Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999;99(7):855-60., Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997;96(12):4204-10.]. Aunque la proteína hsCRP en fase aguda "clásica" se considera como el biomarcador más prometedor para fines clínicos, existe una heterogenicidad sustancial en cuanto a la prevalencia de niveles de hsCRP elevados en pacientes con síndromes coronarios agudos [Biasucci LM, Liuzzo G, Colizzi C, Rizzello V. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001 ;2(3):164-71.].

55 Así más del 30 % de los pacientes con angina inestable agravada no muestran niveles de hsCRP elevados [Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331(7):417-24., Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J, Simeons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina refractory to standard treatment trial. *J Am Coll*

Cardiol 2000;35(6):1535-42.]. Además, ciertas diferencias individuales en la dimensión de la respuesta frente a determinados estímulos inflamatorios pueden influir posiblemente en los niveles de los reactivos en fase aguda "aguas abajo", tales como hsCRP [Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. *Ital Heart J* 2001; 2(11):804-6., Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuzzi AG, *et al.* Plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996;94(10):2373-80.]. Por tanto existe todavía un reto importante en identificar estímulos próximos para la inflamación vascular que pueden usarse como marcadores séricos que predicen riesgos en pacientes con arteriosclerosis coronaria.

Mientras tanto aumentan indicios de que el sistema CD40-CD40L desempeña un papel importante en la fisiopatología de pacientes con una enfermedad cardíaca coronaria inestable. Excepto en la forma asociada celular, CD40L se produce también en una forma soluble, biológica y completamente activa, concretamente sCD40L. sCD40L se expulsan por linfocitos estimulados y se liberan activamente en relación a la estimulación plaquetaria. sCD40L actúa de manera pro-inflamatoria sobre células endoteliales y promueve la coagulación, induciendo los monocitos y las células endoteliales a la expresión de factores tisulares. Además, sCD40L contiene una secuencia KGD, un motivo de unión conocido que es específico para la integrina plaquetaria imperante $\alpha\text{IIb}\beta_3$. CD40L es realmente un ligando de $\alpha\text{IIb}\beta_3$, un agonista plaquetario, y es necesario para la estabilidad de trombos arteriales. En suero de pacientes con síndromes coronarios agudos puede detectarse un aumento de sCD40L. Se informó (Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266-8) de que mujeres aparentemente sanas que presentaban elevadas concentraciones en plasma de sCD40L, tenían al mismo tiempo un elevado riesgo de acontecimientos cardiovasculares.

Hallazgos más recientes demuestran que una ruptura de placas y la formación posterior de un trombo en pacientes con síndromes coronarios agudos puede conducir a una activación de la exposición de CD40L en plaquetas circulantes (Lee Y, Lee WH, Lee SC, Ahn KJ, Choi YH, Park SW, Seo JD, Park JE. *Cardiology*. 1999; 92: 11-6). También se detectaron elevadas concentraciones de sCD40L en pacientes con angina, siendo especialmente altas las concentraciones en pacientes con angina inestable (Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. *Circulation* 1999; 10: 614-20). Estos resultados insinúan que una interacción CD40L-CD40 desempeña un importante papel en la patogénesis de procesos ateroscleróticos y el desarrollo de síndromes coronarios.

El establecimiento del diagnóstico correcto, unido con un tratamiento adecuado de pacientes con síndromes coronarios agudos que no van acompañados de una elevación del segmento ST, puede ser difícil. La exclusión de infartos de miocardio agudos según patrones actuales no es satisfactoria. En los últimos años se ha realizado una concentración en la estratificación de riesgos y el control del tratamiento con el objetivo de identificar pacientes en los que existe el riesgo de desarrollar acontecimientos cardiológicos potencialmente mortales, y que se benefician sobre todo de estrategias terapéuticas mejoradas y de intervención (Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E. *Lancet* 2001; 358:1533-8). El ECG tiene en este respecto relevancia pronosticadora sólo limitada, dado que las anomalías significativas son inusuales y su detección es poco sensible y específica (Kaul P, Fu Y, Chang WC, *et al.*, *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:64-71 y Savonitto S, Ardissino D, Granger CB, *et al.* *JAMA* 1999; 281:707-13). Por tanto se han desarrollado marcadores de una necrosis de células de miocardio, sobre todo troponinas cardíacas, para obtener herramientas valiosas en la evaluación de pacientes con síndromes coronarios agudos (Hamm CW, Braunwald E. *Circulation* 2000; 102:118-22). Sin embargo, las troponinas no participan activamente en la fisiopatología de síndromes coronarios agudos, sino que representan más bien un tipo de marcadores de imitación para la frágil formación de un trombo (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L. *J Am Coll Cardio*. 2001; 38:979-86, Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML. *Circulation* 1999;100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, *et al.* *Am Heart J* 1999; 137:815-20).

El ECG tiene en este respecto relevancia pronosticadora sólo limitada, dado que las anomalías significativas son inusuales y su detección es poco sensible y específica (Kaul P, Fu Y, Chang WC, *et al.*, *J Am Coll Cardiol* 2001;38:64-71 y Savonitto S, Ardissino D, Granger CB, *et al.* *JAMA* 1999; 281:707-13).

Los marcadores de una activación plaquetaria que determinan la actividad de la enfermedad, posiblemente antes de que se produzca una necrosis de miocardio, podrían representar información adicional importante para la estratificación diagnóstica y terapéutica en pacientes con síndromes coronarios agudos. En medida creciente existen pruebas de que también el ligando de CD40 (CD40L, renombrado recientemente en CD 154) desempeña un papel importante en el desarrollo de enfermedades y la desestabilización de la placa (Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. *Nature* 1998; 394:200-3 y Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, *et al.* *Nat Med* 1999; 5:1313-6). El sistema CD40-CD40L es común en una pluralidad de leucocitos y células no leucocíticas, incluyendo células endoteliales y células del músculo liso (Schonbeck U, Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43), así como plaquetas activadas (Henn V, Slupsky JR, Grafe M, *et al.* *Nature* 1998; 391:591-4). Adicionalmente a la forma 39-kDa asociada de célula, CD40L se produce también en una forma soluble, biológica y completamente activa, concretamente sCD40L (Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. *Eur J Immunol* 1995;25:1749-54). sCD40L se expulsan por linfocitos estimulados y se liberan activamente en relación a la activación plaquetaria (Lee Y, Lee WH, Lee SC, *et al.* *Cardiology* 1999; 92:11-6 y Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. *Blood* 2001; 98:1047-54). sCD40L actúa de manera pro-inflamatoria sobre las células endoteliales y promueve la coagulación, induciendo la expresión de factores tisulares mediante monocitos (Mach F, Schonbeck U, Bennefoy JY, Pober JS, Libby P. *Circulation* 1997; 96:396-9) y células endoteliales (Urbich C, Mallat

Z, Tedgui A, Clauss M, Zeiher AM, Dimmeler S. *J Clin Invest* 2001; 108:1451-8). Además, sCD40L contiene una secuencia KGD (Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. *Eur J Immunol* 1995; 25:1749-54), un motivo de unión conocido que es específico para la integrina plaquetaria imperante $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, *et al.* *J Biol Chem* 1993;268:1066-73). Pudo demostrarse que CD40L representa realmente un ligando de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, un agonista plaquetario y es necesario para la estabilidad de los trombos arteriales (Andre P, Prasad KS, Denis CV, *et al.* *Nat Med* 2002;8:247-52).

Estos resultados demuestran ineludiblemente que sCD40L desempeña un papel importante en la fisiopatología de síndromes coronarios agudos. De manera interesante puede detectarse un aumento de sCD40L en suero de pacientes con síndromes coronarios agudos (Aukrust P, Muller F, Ueland T, *et al.* *Circulation* 1999; 100:614-20). Se informó de que mujeres aparentemente sanas que presentaban elevadas concentraciones en plasma de sCD40L, portaban un elevado riesgo de acontecimientos cardiovasculares (Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266-8). Es objetivo de la presente invención examinar el valor pronosticador de concentraciones de sCD40L en cuanto a acontecimientos cardiacos y los beneficios médicos del inhibidor de la glicoproteína IIb/IIIa Abciximab en pacientes con síndromes coronarios agudos, usándose los bancos de datos del estudio CAPTURE (c7E3 Anti-Platelet Therapy in Unstable Refractory Angina) (CAPTURE. *Lancet* 1997; 349:1429-35).

Los marcadores inflamatorios, que determinan la actividad de la enfermedad, posiblemente antes de que se produzca una necrosis de miocardio, podrían representar información adicional importante para la estratificación diagnóstica y terapéutica en pacientes con síndromes coronarios agudos. La inhibición terapéutica específica de las citocinas que son esenciales para la estabilidad de placas, puede ser una nueva estrategia de tratamiento para pacientes con enfermedad cardiaca coronaria inestable y estable.

Sobrer el factor de crecimiento placentario (PIGF), un miembro de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (familia VEGF) de factores de crecimiento, se demostró recientemente que está altamente regulado en lesiones arterioscleróticas tempranas y avanzadas.

El documento US 6.225.088 describe PIGF en relación con enfermedades proliferativas, mientras que en el documento WO 92/06194 se describe PIGF como factor angiogénico.

De Falco *et al.* (De Falco S, Gigante B, Persico MG. "Structure and function of placental growth factor" *Trends Cardiovasc Med* agosto 2002;12(6):241-6) describen la relación de la angiogénesis y la arteriogénesis alteradas durante estados patológicos, tales como por ejemplo isquemia y formación de tumor en ratones. A este respecto se describe PIGF como un factor esencial para la angiogénesis en condiciones patológicas. PIGF se propone como diana alternativa para una terapia angiogénica.

Luttun *et al.* (Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 *Nat Med* agosto 2002;8(8):831-40) describen procedimientos terapéuticos de PIGF y Flt-1 en el contexto de la angiogénesis. Adicionalmente se describe que la inhibición de PIGF reduce el crecimiento y la vulnerabilidad de placas arterioscleróticas.

Oura *et al.* (Oura H, Bertocini J, Velasco P, Brown LF, Carmeliet P, Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation. *Blood* 15 enero 2003;101(2):560-7) describen los papeles de PIGF en caso de inflamación cutánea y angiogénesis. Adicionalmente se describen los efectos de niveles elevados y reducidos de PIGF y su comparación con el estado de la inflamación.

La citocina pro-inflamatoria CD40L se libera de plaquetas activadas. La forma soluble de CD40L, concretamente sCD40L, está presente de manera creciente en pacientes con síndromes coronarios agudos. Por tanto se examinó el valor pronosticador de sCD40L como un marcador para la activación plaquetaria también en cuanto a la acción terapéutica de una inhibición del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa.

La proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) es una metaloproteínasa de matriz que se une a zinc de alto peso molecular que pertenece a la superfamilia de metzincina de las metaloproteinasas y originariamente se identificó en plasma de mujeres embarazadas. Se extiende para el cribado de trisomía fetal en el primer trimestre de gestación. Recientemente se encontró también de PAPP-A que se expresa respectivamente en placas erosionadas y aflojadas, sin embargo se expresa sólo mínimamente en placas estables y de lo que se supuso una reaparición de síntomas en pacientes con ACS. El documento WO02/056015 da a conocer un procedimiento para el análisis de muestras en relación con enfermedades cardiovasculares agudas, que comprende las siguientes etapas: (a) determinar la concentración de PAPP-A en una muestra biológica de una paciente no embarazada, (b) comparar el/los resultado/s obtenido/s de la muestra que va a examinarse con los valores de muestras de referencia o valores control, y (c) diagnosticar el síndrome coronario agudo (ACS) por medio del valor elevado de PAPP-A en la muestra. De manera perteneciente al síndrome coronario agudo se mencionan angina de pecho inestable (IAP), fallo cardiaco agudo e infarto de miocardio (MI). Sin embargo no se determina de manera exacta el papel preciso de niveles en plasma de PAPP-A circulante para el pronóstico de puntos finales duros, tales como la muerte o el infarto de

miocardio en pacientes con ACS. Adicionalmente es completamente desconocido si el nivel en plasma de PAPP-A facilita información pronosticadora, comparada con biomarcadores establecidos recientemente en pacientes con ACS. Por tanto, los inventores comparan la significancia pronosticadora de niveles en plasma de PAPP-A con marcadores de la inflamación sistémica, de la activación plaquetaria, isquemia y necrosis miocárdica en pacientes con ACS.

En el estado de la técnica se encuentran muchos marcadores moleculares distintos que pueden ser adecuados para el diagnóstico de una enfermedad cardiovascular. Ciertos ejemplos de tales marcadores son entre otros:

Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A); proteína C reactiva (CRP); hsCRP; factor de crecimiento placentario (PIGF); interleucina-18 (IL-18/IL-18b); péptido natriurético cerebral (BNP); propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proNP); sCD40L, cTnI/T, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina, IL-6, VEGF, amiloide sérico A(SAA), CKMB, MPO, LpPLAz, GP-BB, IL1RA, TAF1, fibrina soluble, anti-oxLDL, MCP-1, factor tisular (TF), MMP-9, Ang-2, Tff1-2, IL-P, bFGF, PCM y VEGF-A.

Algunos de los marcadores mencionados anteriormente son marcadores conocidos y caracterizados para el estudio de enfermedades coronarias, otros sin embargo no se estudiaron aún de manera correspondiente hasta ahora.

Casi todos los marcadores indicados tienen un valor diagnóstico en cuanto a acontecimientos cardiovasculares determinados. Por ejemplo, TnT es de especial valor para el diagnóstico y el pronóstico de MI (véase anteriormente). Los marcadores inflamatorios tales como CRP son valiosos para el diagnóstico y el pronóstico de una inflamación que puede conducir a una ruptura de la placa y MI.

Muchos de los marcadores mencionados anteriormente tienen un valor diagnóstico para enfermedades cardiovasculares. El uso de una combinación de marcadores se describió sólo de manera moderada.

Lund *et al.* en *Circulation*. 2003,108:1924-1926, describen la combinación de PAPP-A con TnI (troponina I); Peng *et al.* en *Clinica Chimica Acta* 319 (2002) 19-26, describen la combinación de sCD40L con sICAM-1 y sVCAM-1. Lenderink *et al.* en *European Heart Journal* (2003) 24, 77-85, describen la combinación de TnT con CRP. Heeschen *et al.* en *Journal of the American College of Cardiology*; vol. 35, n.º 6, 2000, mencionan la combinación de TnT con CRP.

Heeschen *et al.* en *Circulation*. 2003; 107:2109-2114, describen la combinación de TnT, CRP y IL-10. Blankenberg *et al.* en *Circulation*. 2002; 106:24-30, describen la combinación de CRP y IL-6. Autiero *et al.* en *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1:1356-1370, describen la combinación de PIGF y VEGF.

Sin embargo ni se estudió el potencial del análisis mejorado mediante la combinación hasta ahora, ni se concluyó el desarrollo de pruebas con marcadores dirigidas consideradas. Qué marcadores son adecuados para un diagnóstico eficaz no puede descubrirse sin más, por consiguiente, a partir de los documentos mencionados anteriormente.

Por consiguiente, en cuanto a lo mencionado anteriormente es un objetivo de la presente invención facilitar un procedimiento con el que puede evaluarse el riesgo de un acontecimiento cardiovascularmente desfavorable, condicionado mediante trombosis coronaria, con ayuda de un perfil de riesgo individual. Es objetivo adicionalmente desarrollar un procedimiento para la evaluación de la probabilidad de que sea ventajoso un tratamiento con un principio activo para la inhibición del factor de crecimiento placentario (PIGF). Con ayuda de este procedimiento se le permite al médico encargado del tratamiento de mejor manera que hasta ahora poder elegir medidas adecuadas para que influyan positivamente en los pacientes y/o para impedir un acontecimiento desventajoso o para reducir al menos su dificultad para los pacientes afectados.

Es objetivo de la presente invención desarrollar un procedimiento, con el que puede evaluarse el riesgo de un acontecimiento cardiovascularmente desfavorable, condicionado mediante trombosis coronaria, con ayuda de un perfil de riesgo individual. Esto debe realizarse mediante la medición de la concentración de un marcador de la activación plaquetaria. Adicionalmente es objetivo de la presente invención desarrollar un procedimiento para la evaluación de la probabilidad de que sea ventajoso un tratamiento con un principio activo para la inhibición de la activación plaquetaria. Con ayuda de este procedimiento se le permite al médico encargado del tratamiento de mejor manera que hasta ahora poder elegir medidas adecuadas para que influyan positivamente en los pacientes, para impedir un acontecimiento desventajoso o para reducir al menos su dificultad para los pacientes afectados.

Otro objetivo de la presente invención es encontrar combinaciones generales de marcadores diagnósticos para acontecimientos cardiovasculares que permitan un diagnóstico preciso de qué acontecimiento cardiovascular ha padecido ya el paciente y cuál padecerá éste posiblemente en el futuro. Particularmente, un objetivo es encontrar una combinación de marcadores que puedan realizarse paralelamente de manera favorable. De manera ideal se permitirían estas mediciones conjuntamente con mediciones de TnT de pacientes con dolor de pecho.

El objetivo de la presente invención se consigue mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10.

El objetivo de la presente invención se soluciona particularmente mediante un procedimiento *in vitro* para el análisis de muestras para el diagnóstico y/o el pronóstico de enfermedades cardiovasculares agudas, en el que el

- procedimiento comprende las siguientes etapas: a) facilitar una muestra biológica que va a someterse a ensayo seleccionada del grupo constituido por sangre periférica o fracciones de la misma y suspensiones de cultivo celular o fracciones de la misma, de un sujeto; b) determinar la concentración de los marcadores PAPP-A y IL-10 en la muestra, c) eventualmente, determinar la concentración al menos de otro marcador seleccionado de ligando CD40 soluble (sCD40L), PIGF, troponina T (TnT), MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP, y otros marcadores inflamatorios, particularmente CRP, hsCRP, en la muestra, y d) comparar el/los resultado/s obtenidos para la muestra que va a someterse a ensayo con valores de referencia y/o los valores de muestras de referencia, en el que con un valor umbral por debajo de 3,5 ng/l de IL-10, valores de PAPP-A por encima de 12,6 mIU/l indican un riesgo cardiovascular especialmente alto.
- Los marcadores usados para el análisis en el contexto de la presente invención son marcadores caracterizados y bien conocidos en la mayor parte por el estado de la técnica, que estaban caracterizados sin embargo hasta ahora todavía de manera insuficiente para su uso para el diagnóstico de una enfermedad cardiovascular aguda.
- Así están caracterizados la proteína C reactiva (CRP) y hsCRP como marcadores de la inflamación sistémica, troponina cTnI/T como marcador para la necrosis; la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) como marcador para la activación de macrófagos; IL-10 (interleucina 10) como marcador para el equilibrio inflamatorio, sCD40L como marcador para la activación tromboinflamatoria, MPO (mieloperoxidasa) como marcador para el estrés oxidativo, el factor de crecimiento placentario (PIGF) como marcador para la inflamación vascular y los marcadores péptido natriurético cerebral (BNP) y propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proNP) como marcadores de la activación neurohumoral y de la isquemia.
- Otros marcadores similares y que pueden usarse también son interleucina-18 (IL-18/IL-18b), ICAM-1, VCAN-1, E-selectina, P-selectina, IL-6, VEGF, amiloide sérico A (SAA), CKMB, LpPLAz, GP-BB, IL-1RA, TAF-1, fibrina soluble, anti-oxLDL, MCP-1, factor tisular (TF), MMP-9, Ang-2, Tffi-2, bFGF, PCM y VEGF-A.
- El documento WO 03/040692 (y Circulation 2001; 104:2266-2268) describe que sCD40L puede usarse ventajosamente en combinación con un marcador inflamatorio, particularmente CRP. Esta combinación se usa sin embargo exclusivamente para el diagnóstico de enfermedades cardíacas no agudas, desestimándose una estratificación por el documento WO03/040692 debido a resultados inciertos.
- Se prefiere un procedimiento según la invención, en el que la muestra que va a someterse a ensayo y/o la muestra de referencia proceden de un mamífero, particularmente del ser humano. Se prefiere más un procedimiento según la invención, en el que la muestra que va a someterse a ensayo y/o la muestra de referencia es suero sanguíneo o plasma sanguíneo. Se prefiere especialmente sangre total periférica como muestra que va a someterse a ensayo y/o muestra de referencia.
- Según otro aspecto del procedimiento según la invención, la muestra que va a someterse a ensayo y/o la muestra de referencia puede estar pretratada, añadiéndose a la sangre periférica por ejemplo un anticoagulante, particularmente heparina.
- Según la invención pudo hallarse sorprendentemente que además del análisis individual de diversos de los marcadores mencionados anteriormente para el diagnóstico o el seguimiento de acontecimientos cardíacos agudos son posibles también combinaciones de tales marcadores que permiten un análisis considerablemente mejorado. A este respecto han resultado especialmente preferentes ciertas combinaciones de marcadores que se refieren a diversos aspectos del acontecimiento cardíaco desventajoso, sin embargo pueden analizarse simultáneamente (o sea de manera simultánea o en una serie de medición más o menos separada temporalmente). En un aspecto se seleccionan estos marcadores adicionales de marcadores inflamatorios, así por ejemplo de CRP, (hs)CRP y IL-10.
- Según la descripción, los marcadores analizados y las combinaciones de los mismos se seleccionan de sCD40L; PAPP-A; PIGF; sCD40L + TnT; PAPP-A + TnT; PIGF + TnT; sCD40L+ PAPP-A; sCD40L + PIGF; PAPP-A + PIGF; sCD40L+ PAPP-A + TnT; sCD40L + PIGF + TnT; PAPP-A + PIGF + TnT; sCD40L + PAPP-A + PIGF; y sCD40L +PAPP-A + PIGF + TnT. Entonces se prefiere la combinación adicional con al menos otro de los marcadores MPO, NT-proBNP, BNP, CRP, (hs)CRP y IL-10.
- Por consiguiente se da a conocer un procedimiento, en el que los marcadores analizados y las combinaciones de los mismos se seleccionan de CRP, TnT, PAPP-A; CRP, TnT, PAPP-A, IL-10; CRP, TnT, PAPP-A, IL-10, sCD40L y TnT, PAPP-A, IL-10, sCD40L, VEGF.
- El procedimiento usado según la invención para determinar la concentración de los marcadores analizados puede seleccionarse de todos los procedimientos adecuados conocidos por el experto para la detección de proteínas en muestras biológicas. El procedimiento específico no es importante en el contexto de la presente invención mientras que el procedimiento sea suficientemente sensible para quedar por debajo del límite de detección necesario para una determinación precisa de las concentraciones de los marcadores. Ciertos procedimientos adecuados se basan normalmente en la unión de una marcación en el marcador que va a detectarse y la detección posterior de esta marcación. La unión puede ser, a este respecto, covalente o no covalente y/o puede realizarse directa o indirectamente. Ciertos procedimientos de medición adecuados según la presente invención incluyen por ejemplo la electroquimioluminiscencia. Igualmente pueden usarse turbidimetría, nefelometría y turbidimetría o nefelometría

reforzada con látex.

Debido a su alta sensibilidad y el hecho de que estos procedimientos puedan adaptarse también a entornos de alto rendimiento, se prefieren procedimientos según la invención, en los que se realiza la determinación de la concentración por medio de un procedimiento inmunológico por medio de moléculas que se unen a los marcadores. Ciertos ejemplos de tales procedimientos son ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos inmunológicos enzimáticos de tipo sándwich o ensayos inmunológicos en fase sólida. Por consiguiente se prefiere que las moléculas que se unen a los marcadores se seleccionen del grupo constituido por anticuerpos anti-marcadores o partes de los mismos y receptores de marcadores o partes de los mismos.

Estas moléculas pueden seleccionarse de una pluralidad muy grande de moléculas específicas para los marcadores. Se prefiere que las moléculas que se unen a los marcadores se seleccionen del grupo constituido por anticuerpos que están dirigidos específicamente frente a marcadores o frente a partes de los mismos, o partes o fragmentos de los mismos y un receptor de marcador o partes del mismo o una integrina, por ejemplo la integrina plaquetaria $\alpha IIb\beta 3$, o partes de las misma. Se prefiere especialmente un procedimiento según la invención, en el que los anticuerpos, partes o fragmentos de los mismos comprenden anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, anticuerpo scFv y diacuerpos.

Según otro aspecto del procedimiento de la presente invención pueden encontrarse componentes del procedimiento unidos en una fase sólida, por consiguiente pueden encontrarse las moléculas que se unen a un marcador en disolución o inmovilizadas en una matriz. Como matrices pueden usarse una pluralidad de materiales conocidos por el experto, tales como por ejemplo matrices de resina y/o matrices de columnas convencionales. Se prefiere especialmente además un procedimiento según la invención, en el que las moléculas que se unen a un marcador están acopladas a un o varias moléculas de detección del grupo constituido por tioisocianato de fluoresceína, ficoeritrina, enzimas (por ejemplo peroxidasa de rábano picante) y perla magnética.

Según otro aspecto del procedimiento según la invención, las moléculas que se unen a los marcadores pueden detectarse con un anticuerpo, al que están acopladas una o varias moléculas de detección. Se trata por consiguiente de una detección indirecta de la unión de la molécula. Tales detecciones en dos etapas las conoce el experto por ejemplo a partir de la técnica de detección con anti-anticuerpos.

Según otro aspecto del procedimiento según la presente invención pueden usarse procedimientos inmunocitológicos para el análisis de la muestra. A este respecto son adecuados todos los procedimientos que permitan una determinación específica por medio de la interacción marcador/molécula. Se prefieren procedimientos que se seleccionan del grupo constituido por ensayo inmunológico enzimático de tipo sándwich, ELISA y ensayos inmunológicos en fase sólida.

Los resultados determinados para la muestra que va a someterse a ensayo se comparan habitualmente con un muestra de referencia. Qué muestra puede servir como muestra de referencia, dependerá particularmente del tipo de la muestra sometida a ensayo y del historial médico del individuo, del que procede la muestra que va a someterse a ensayo. Se prefiere un procedimiento según la invención, en el que la muestra de referencia procede de uno o el valor medio de varios mamíferos, en el que/en los que se excluyó una enfermedad cardiovascular. Sin embargo esto no ha de ser obligatorio entonces cuando por ejemplo debe determinarse el avance de una enfermedad, pudiéndose usar también una muestra "vieja" del mismo paciente como muestra de referencia. Para el experto es evidente que muestras son adecuadas como muestra de referencia para el procedimiento según la invención.

Según otro aspecto del procedimiento según la presente invención, las enfermedades cardiovasculares agudas que van a diagnosticarse y/o a pronosticarse y que van a monitorizarse eventualmente con respecto a su terapia pueden seleccionarse del grupo constituido por angina inestable, infarto de miocardio, síndrome cardiaco agudo, enfermedad arterial coronaria e insuficiencia cardiaca. Sin embargo no debe excluirse que el procedimiento según la invención puede ser adecuado y usarse aún para otros estados patológicos cardiológicos agudos.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un kit diagnóstico, en el que el kit comprende agentes para la realización del procedimiento según la invención, posiblemente conjuntamente con otros componentes y/o coadyuvantes. Tales agentes son de manera preferente al menos un anticuerpo para la detección de marcadores y agentes para la cuantificación posterior de los marcadores. El kit puede contener además otros componentes y/o enzimas para la realización del procedimiento de la presente invención, por ejemplo instrucciones para la interpretación de los resultados del ensayo en cuanto al perfil de riesgo del paciente y correspondientes medidas preventivas y propuestas de terapia.

Además se da a conocer realizar el procedimiento según la invención con ayuda de un kit diagnóstico que comprende anticuerpos indicadores de ratón policlonales marcados con oro, anticuerpos de detección policlonales biotinilados y un dispositivo de ensayo que comprende un material textil no tejido de fibra de vidrio.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere por consiguiente al uso del procedimiento según la invención para el diagnóstico y/o el pronóstico de enfermedades cardiovasculares agudas y/o para la monitorización de su terapia. Esto se realiza mediante la determinación cuantitativa y crítica de marcadores. Debido al perfil de riesgo que puede crearse a consecuencia de ello, el médico encargado del tratamiento puede realizar entonces medidas preventivas

adecuadas, para influir positivamente en el paciente y para impedir el acontecimiento desventajoso o para reducir al menos su gravedad para los pacientes afectados. Una terapia de este tipo puede comprender según la invención por ejemplo la administración de estatinas o inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/III particularmente abciximab. Sin embargo para el experto son conocidas otras posibles terapias para someter a terapia enfermedades cardiovasculares que pueden realizarse según esquemas convencionales.

Según la descripción se administra conjuntamente un agente anti-inflamatorio. Estos agentes pudieron seleccionarse de agentes anti-inflamatorios no esteroideos o esteroideos que pueden incluir por ejemplo: alclofenaco; alclometasona; dipropionato; algestonacetona; alfa-amilasa; amcinafal; amcinafida; amfenaco sódico; clorhidrato de amiprilosa; anakinra; aniolaco; anitrazafeno; apazona; balsalazida disódica; bendazaco; benoxaprofeno; clorhidrato de bencidamina; bromelaína; broperamol; budesonida; carprofeno; cicloprofeno; cintazona; cliprofeno; propionato de clobetasol; butirato de clobetasona; clopiraco; propionato de cloticasona; acetato de cormetasona; cortodoxona; deflazacort; desonida; desoximetasona; dipropionato de dexametasona; diclofenaco potásico; diclofenaco sódico; diacetato de diflorasona; diflumidona sódica; diflunisal; difluprednato; diftalona; dimetilsulfóxido; drocinonida; endrisona; enlimomab; enolicam sódico; eprizol; etodolaco; etofenamato; felbinaco; fenamol; fenbufeno; fenclofenaco; fencloraco; fendosal; fempipalona; fentiazaco; flazalona; fluazacort; ácido flufenámico; flumizol; acetato de flunisolida; flunixina; flunixina meglumina; fluocortina butilo; acetato de fluorometolona; flucuzazona; flurbiprofeno; fluretofeno; propionato de fluticasona; furaprofeno; furobufeno; halcinonida; propionato de halobetasol; acetato de halopredona; ibufenaco; ibuprofeno; ibuprofeno alumínico; ibuprofeno piconol; ilonidap; indometacina; indometacina sódica; indoprofeno; indoxol; intrazol; acetato de isoflupredona; isoxepaco; isoxicam; ketoprofeno; clorhidrato de lofemizol; lomoxicam; etabonato de loteprednol; meclofenamato sódico; ácido meclofenámico; dibutirato de meclorisona; ácido mefenámico; mesalamina; meseclazona; suleptanato de metilprednisolona; momiflumato; nabumetona; naproxeno; naproxeno sódico; naproxol; nimazona; olsalazina sódica; orgoteína; orpanoxina; oxaprozina; oxifembutazona; clorhidrato de parnilina; polisulfato sódico de pentosán; glicerato sódico de fembutazona; pifenidona; piroxicam; cinamato de piroxicam; piroxicam olamina; pirprofeno; prednazato; prifelona; ácido prodólico; procuazona; proxazol; citrato de proxazol; rimexolona; romazarit; salcolex; salnacedina; salsalato; salicilatos; cloruro de sanguíario; seclazona; sermetacina; sudoxicam; sulindaco; suprofeno; talmetacina; talniflumato; talosalato; tebufelona; tenidap; tenidap sódico; tenoxicam; tesicam; tesimida; tetridamina; tiopinaco; pivalato de tixocortol; tolmetina; tolmetina sódica; triclónida; triflumidato; zidometacina; glucocorticoides; zomepiraco sódico.

En el contexto de la presente invención, "diagnóstico" se refiere a la comprobación de si un individuo ha padecido un determinado acontecimiento cardiovascular. En el contexto de la presente invención, "pronóstico" se refiere a la predicción de la probabilidad (en %) de si un individuo padecerá un determinado acontecimiento cardiovascular. En el contexto de la presente invención, "estratificación de la terapia" se refiere a la determinación del tratamiento terapéutico adecuado para el acontecimiento cardiovascular que se producirá o se ha producido. En el contexto de la presente invención, "monitorización de la terapia" se refiere al control y, eventualmente, una regulación del tratamiento terapéutico de un individuo. En el contexto de la presente invención, "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que incluye posiblemente el estado fisiopatológico de un individuo e incluye por ejemplo la administración de productos farmacéuticos así como el tratamiento quirúrgico (por ejemplo dilatación con balón).

Los valores basales de la concentración de sCD40L hacen que estén disponibles la información del valor pronosticador en pacientes con síndromes coronarios agudos independientemente de la aparición de una necrosis de miocardio. Además puede identificarse por medio de sCD40L el grupo de alto riesgo de pacientes que pueden sacar el mayor provecho de un tratamiento anti-plaquetas con abciximab.

El presente estudio proporciona indicios directos de que sCD40L es un marcador bioquímico de gran valor informativo de una activación plaquetaria. Un aumento de la concentración de CD40L identifica de manera fiable un determinado subgrupo de pacientes con síndromes coronarios agudos, que tienen un riesgo de alto grado de padecer un acontecimiento cardíaco y que tienen el mayor provecho de un tratamiento con el antagonista del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab. De manera correspondiente a esto, CD40L no sólo contribuye considerablemente a la fisiopatología de los síndromes coronarios agudos, sino que pone a disposición un marcador clínico fiable y de gran valor informativo con cuya ayuda pueden identificarse pacientes con una formación de lesión sumamente arriesgada y/o trombosis coronaria (Andre P, Prasad KS, Denis CV, *et al.*, Nat Med 2002; 8:247-52; Andre P., Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR.; Circulation 2002; 106:896-9).

En un 40,5 % de los pacientes de CAPTURE, las concentraciones de sCD40L en la circulación se encontraban por encima de la concentración umbral calculada de 5,0 µg/l. Estos pacientes con concentraciones de sCD40L elevadas tienen un riesgo cardíaco de alto grado de padecer un infarto de miocardio mortal o no mortal. Este aumento del riesgo cardíaco en pacientes con altas concentraciones de sCD40L, que obtuvieron un placebo, era evidente en especial medida durante las primeras 72 horas (figura 5a). Sin embargo, la frecuencia de los acontecimientos se desarrolló durante todos los seis meses siempre además separadamente (figura 5b). sCD40L se detectó como un marcador pronosticador de gran valor informativo que es independiente de la detección de una necrosis de miocardio y es independiente de los marcadores inflamatorios CRP y TNF-α del mismo modo que de la molécula de adhesión ICAM-1. En un modelo de regresión multivariante, TnT, CRP y sCD40L proporcionaron información pronosticadora fiable (tabla 2). Con ayuda de la concentración de sCD40L se identificaron pacientes sin síntomas de una necrosis de miocardio que presentan un elevado riesgo cardíaco. Con el uso de concentraciones umbrales

fijadas para TnT y CRP así como una clasificación de los pacientes por medio del número de marcadores cardiacos que eran elevados, se estableció que una valoración simultánea de estos tres marcadores bioquímicos biopatológicamente distintos en el momento en el que se aplicaban al paciente, permitía un pronóstico de gran valor informativo del riesgo del paciente de padecer acontecimientos cardiacos desventajosos durante los siguientes seis meses.

Las troponinas representan marcadores de una necrosis de miocardio, sin embargo no están implicadas de manera activa en la fisiopatología de síndromes coronarios agudos. Éstas son más bien marcadores de imitación para la formación de un trombo frágil (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L; *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:979-86; Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML; *Circulation* 1999; 100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, *et al.*; *Am Heart J* 1999; 137:815-20). En estudios *post mortem* en pacientes con síndromes coronarios agudos se identificó una erosión o ruptura de las caperuzas fibrosas de las placas ateroscleróticas que forman la base de la fisiopatología (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L; *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:979-86; Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML; *Circulation* 1999; 100:1509-14). Una exposición de componentes de las placas, colágeno y otros componentes de la pared vascular conduce a un aumento del tono vascular y de la activación plaquetaria (Farb A, Burke AP, Tang AL, *et al.*; *Circulation* 1996; 93:1354-63; Davies MJ, Thomas AC; *Br Heart J* 1985; 53:363-73; Davies MJ; *N. Engl J Med* 1997; 336:1312-4). La tromboembolia de una arteria coronaria con aumento de la perfusión microvascular y necrosis es un componente esencial de síndromes coronarios agudos (Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML; *Circulation* 1999; 100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, *et al.*; *Am Heart J* 1999; 137:815-20). De manera correspondiente a esto, los marcadores sensibles para la detección de una pequeña lesión del miocardio, particularmente troponinas, sirven como marcadores de imitación de una tromboembolia arterial que se atribuye a un proceso trombótico activo en la lesión desencadenante.

A diferencia de esto, sCD40L podría estar implicada de manera múltiple directamente en la fisiopatología de síndromes coronarios agudos. Indicaciones más recientes insinúan que CD40L contribuye esencialmente a la progresión de una aterosclerosis y de manera correspondiente a esto a una desestabilización de placas ateroscleróticas (Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P; *Nature* 1998; 394:200-3; Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, *et al.*; *Nat Med* 1999; 5:1313-6). Se propuso que las interacciones CD40/CD40L fomentaban complicaciones mediante ateromas, induciendo éstos la expresión de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas de matriz y procoagulantes en diversos tipos de células asociadas a ateroma (Schonbeck U, Libby P.; *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43; Henn V, Slupsky JR, Grafe M, *et al.*; *Nature* 1998; 391:591-4; Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA; *Blood* 2001; 98:1047-54; Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.; *Circulation* 1997; 96:396-9; Miller DL; Yaron R, Yellin MJ; *J Leukoc Biol* 1998; 63:373-9; Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE; *Immunology* 2000;100:441-8). Ciertos estudios nuevos han demostrado que además de leucocitos y células no leucocitarias que incluyen granulocitos, fagocitos mononucleares, células endoteliales y células de la musculatura lisa (Schonbeck U, Libby P; *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43), las plaquetas activadas producen y liberan grandes cantidades de sCD40L (Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA; *Blood* 2001; 98:1047-54). Otro estudio demuestra que un bypass cardiopulmonar origina un aumento de la concentración de sCD40L en el plasma, que corresponde con una reducción del contenido en CD40L en las plaquetas, lo que insinúa que sCD40L procede primariamente de las plaquetas y podría contribuir a las complicaciones trombóticas que están vinculadas con un bypass de este tipo (Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK; *Circulation* 2002, 105:2849-2854). También se estableció que sCD40L se correlaciona positivamente con P-selectina soluble en el plasma y concentraciones de 11-deshidrotromboxano B₂ en la orina (Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, *et al.*; *Circulation* 2002; 106:399-402). Además, ensayos experimentales demuestran que CD40L es necesario para una estabilización de trombos arteriales (Andre P, Prasad KS, Denis CV *et al.*; *Nat Med* 2002; 8:247-52). El presente estudio proporciona ahora indicación directa de que CD40L realmente es un marcador de la activación plaquetaria. La activación plaquetaria, determinada mediante citometría de flujo en pacientes con síndromes coronarios agudos, se correlacionó significativamente con las concentraciones séricas de sCD40L (figura 7). De manera interesante se detectó sCD40L como factor de pronóstico independiente de una activación plaquetaria con el mayor valor informativo. Los resultados del presente estudio establecieron concentraciones de sCD40L como marcadores pronosticadores sumamente informativos en pacientes con síndromes coronarios agudos que están en riesgo de padecer una trombosis. Estos resultados están respaldados por el hecho de que una inhibición del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa mediante abciximab elevaba el riesgo elevado en pacientes con síndromes coronarios agudos y concentraciones de sCD40L elevadas. Mientras que la troponina indica positivamente la tendencia de un trombo a generar una embolia y a conducir a una necrosis de miocardio, las concentraciones elevadas de sCD40L en pacientes con síndromes coronarios agudos reflejan la actividad trombótica de la lesión desencadenante de reclutar y activar plaquetas.

En un análisis anterior de un subgrupo de pacientes del estudio CAPTURE se demostró que el tratamiento adicional con el antagonista del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab reduce el riesgo elevado de pacientes positivos para troponina en la medida de pacientes negativos para troponina (Hamm CW, Heeschen C, Goldmann B, *et al.*; *N Engl J Med* 1999; 340:1623-9). Estos pacientes representan aproximadamente 1/3 de los pacientes con síndromes coronarios agudos (Hamm CW, Braunwald E; *Circulation* 2000; 102:118-22; Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, *et al.*; *N Engl J Med* 1996; 335:1342-9; Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, *et al.*; *N Engl J Med* 1996; 335:1333-41; Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, *et al.*; *N Engl J Med* 1992; 327:146-50; Hamm CW, Goldmann BU,

Heeschen C, Kreymann G, Berger J, Meinertz T; N Engl J Med 1997; 337:1648-53). Ciertos resultados similares con respecto a troponina T y troponina I se obtuvieron más tarde a partir de otros estudios (Newby LK, Ohman EM, Christenson RH, *et al.*; Circulation 2001; 103:2891-6; Januzzi JL, Chae CU, Sabatine MS, Jang IK; J Thromb Thrombolysis 2001; 11:211-5; Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, Deu A, Langenbrink L, White HD; Lancet 1999; 354:1757-62), y a continuación se registraron troponinas en las nuevas directrices como parte de la estratificación de riesgos en pacientes con síndromes coronarios agudos (Hamm CW, Bertrand M, Braundwald E; Lancet 2001; 358:1533-8; Braunwald E, Maseri A, Armstrong PW, *et al.*; Eur Heart J 1998;19:D22-30). En el presente estudio se demuestra que un efecto positivo marcado de este tipo de una terapia anti-plaquetas es notorio también en pacientes con concentraciones de sCD40L elevadas. El presente análisis insinúa que pacientes con síndromes coronarios agudos que presentan concentraciones de sCD40L elevadas, se establecen de manera eficaz mediante el antagonista del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab (figura 5a, b). Con una concentración umbral calculada de 5,0 µg/l se observó una modificación abrupta del cociente de riesgo de 0,87 para el segundo quintil y 1,12 para el tercer quintil hasta valores significativamente más bajos de 0,36 para el cuarto quintil y 0,38 para el quinto quintil (figura 4). De manera interesante, las concentraciones de TnT y sCD40L proporcionaron valores de pronóstico independientes en cuanto tanto al riesgo de acontecimientos isquémicos como a la acción positiva de una inhibición del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa mediante abciximab. Los pacientes sin síntomas de una lesión de miocardio (que carece de aumento de troponina), que sin embargo presentan un aumento de concentraciones de sCD40L, sacaron provecho considerable del tratamiento con el inhibidor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab. En consecuencia, los pacientes con elevado riesgo de una trombosis de los vasos coronarios, probada o bien mediante un aumento de la concentración de sCD40L o bien un aumento de la concentración de TnT, que constituyeron finalmente el 54 % de los pacientes implicados en total en el estudio CAPTURE, sacaron una clara ventaja del tratamiento con abciximab con un coeficiente de riesgo de 0,38 [0,21-0,72]; p < 0,001).

En resumen puede decirse que el presente estudio documenta el papel importante e independiente de sCD40L como marcador de la activación plaquetaria para la estratificación de riesgos diagnóstica y terapéutica. El riesgo cardiaco elevado de pacientes con altas concentraciones de sCD40L, que obtuvieron una terapia convencional con heparina y aspirina, se suprimió mediante el antagonista del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab. El uso combinado de troponinas y sCD40L, que representan los dos componentes esenciales de la fisiopatología en pacientes con síndromes coronarios agudos, proporciona conocimientos importantes en la actividad de la enfermedad, el riesgo cardiológico y la actividad de un tratamiento por medio de la inhibición de la glicoproteína IIb/IIIa mediante abciximab, que es superior al uso de un marcador individual.

Los resultados del presente estudio establecen el nivel sérico de PIGF como un nuevo determinante pronosticador independiente eficaz de la salida clínica en pacientes con síndromes coronarios agudos. Puede observarse especialmente que en pacientes con bajos niveles séricos de hsCRP, elevados niveles séricos de PIGF identifican un subgrupo de pacientes que padecen un riesgo cardiaco significativamente elevado (proporción de peligro adaptada 3,58 [IC al 95 % 1,48 - 7,72]; p = 0,001).

El valor predictivo del nivel sérico de PIGF es independiente de la evidencia de necrosis miocárdica, tal como se determina mediante el nivel sérico de troponina. Por último, los niveles séricos de PIGF elevados identifican no sólo aquellos pacientes con dolores de pecho agudos, que desarrollan síndromes coronarios agudos, sino también aquellos pacientes que padecen un riesgo elevado de inestabilidad recurrente tras el cese de un síndrome coronario agudo inicial. Por tanto, la medición del nivel sérico de PIGF puede ser no sólo una herramienta clínica eficaz y fiable para la identificación de pacientes con alto riesgo de formación de lesiones, sino también de la inflamación vascular permanente de la circulación coronaria.

El papel de PIGF como un marcador inflamatorio primario de inestabilidad de lesiones arterioscleróticas puede explicarse bien mediante sus efectos pro-inflamatorios bien documentados en modelos animales de arteriosclerosis o artritis [Luttun A, Tjwa M, Moons L, *et al.* Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med 2002;8(8):831-40.]. Aunque PIGF pertenece a la familia de VEGF, su papel etiopatogénico parece estar relacionado más bien con la inflamación que con la angiogénesis [Luttun A, Tjwa M, Moons L, *et al.* Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med 2002;8(8):831-40.]. En efecto, mientras que el aumento de VEGF mediante hipoxia y el aumento del nivel sérico de VEGF se consideran como una adaptación temprana del miocardio al flujo sanguíneo reducido [Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med 2000;342(9):626-33.], PIGF no se altera mediante hipoxia o se regula por disminución [Khaliq A, Dunk C, Jiang J, *et al.* Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. Lab Invest 1999;79(2):151-70., Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. *In vivo* angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. J Clin Invest 1996;98(11):2507-11.]. Acorde con estos datos, los resultados de este estudio no obtuvieron ninguna correlación entre el nivel sérico de PIGF y el nivel sérico de troponina T como un marcador de la necrosis miocárdica, mientras que el nivel sérico de VEGF estaba correlacionado positivamente con el nivel sérico de troponina T. De manera concordante con esto, PIGF no estaba correlacionado con el nivel sérico de VEGF.

Por tanto parece que el nivel sérico de PIGF no se altera mediante la necrosis miocárdica. Por el contrario, los

niveles séricos de VEGF están acoplados con un aumento de troponina T, flujo de TIMI alterado, y síntomas clínicos de isquemia miocárdica [Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:524-530.]. El nivel sérico de PIGF como no sensible con respecto a lesiones miocárdicas más pequeñas
 5 podría ser específicamente importante en pacientes con síndromes coronarios agudos, de los cuales aproximadamente un tercio son positivos para troponina en el ingreso [Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000;102(1):118-22.].

De manera similar, una lesión miocárdica podría comprometer también al valor del nivel sérico de hsCRP, para poder predecir así la salida en pacientes con síndromes coronarios agudos. Como marcador en fase aguda aguas
 10 abajo inespecífico clásico se elevan los niveles séricos de hsCRP en pacientes con lesión miocárdica, tal como se mide mediante un aumento de la troponina T. Está bien establecido que un aumento de los niveles séricos de hsCRP antes de la producción de un marcador de necrosis miocárdica se encuentra en casi todos los pacientes en los que antes de un infarto se produce una angina inestable [Liuzzo G, Baisucci LM, Gallimore JR, *et al.* Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(6): 1696-703.]. La
 15 especificidad del nivel sérico de hsCRP elevado, que confirma una inflamación vascular reforzada, está muy limitada por tanto en presencia de lesión miocárdica.

Por tanto, los niveles séricos de hsCRP elevados en pacientes positivos para troponina pueden representar únicamente un riesgo elevado secundario a la lesión miocárdica como un marcador de imitación para
 20 tromboembolias que proceden más bien de un proceso trombótico activo dentro de la lesión crítica que de una inflamación vascular permanente.

De hecho, cuando se incluyen respectivamente troponina T y VEGF como marcadores de la necrosis miocárdica y la isquemia en un análisis multivariante, los niveles séricos de hsCRP elevados no son por más tiempo predictivos para un riesgo elevado en pacientes con síndromes coronarios agudos.

Más importante todavía es que la prevalencia notificada del nivel sérico de hsCRP elevado en síndromes coronarios
 25 agudos varía considerablemente. (Más del 30 % de los pacientes con angina inestable agravada y más del 50 % de los pacientes con un infarto de miocardio agudo no muestran ningún nivel sérico de hsCRP elevado). Los niveles séricos de hsCRP elevados están ausentes en más del 30 % de los pacientes con angina inestable agravada y en más del 50 % de aquéllos con un infarto de miocardio agudo que no sigue después de una angina inestable [Liuzzo G, Baisucci LM, Gallimore JR, *et al.* Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(6): 1696-703.], lo que puede suponer una heterogenicidad importante del papel de causas desencadenantes inflamatorias del síndrome clínico de la inestabilidad coronaria [Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9): 1135-43.]. Sin embargo está también bien establecido que los individuos pueden variar en su respuesta sistémica a un determinado estímulo inflamatorio [Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, *et al.* Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable
 30 angina. *Circulation* 1998;98(22):2370-6., Liuzzo G, Angiolillo DJ, Buffon A, *et al.* Enhanced response of blood monocytes to *in vitro* lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001;103(18):2236-41. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, *et al.* Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94(5):874-7.]. El aumento de hsCRP o IL-6, que se observó en respuesta al traumatismo vascular inducido mediante dilatación con balón o incluso mediante cateterismo cardiaco no complicado, se correlaciona linealmente con líneas básicas de niveles séricos de hsCRP o interleucina-6 [Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, *et al.* Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998;98(22):2370-6.]. Adicionalmente, la producción de IL-6 mediante monocitos que se aíslan de pacientes con angina inestable aumenta significativamente en pacientes con nivel sérico de hsCRP elevado, en comparación con
 35 pacientes con nivel sérico de hsCRP normal [Liuzzo G, Angiolillo DJ, Buffon A, *et al.* Enhanced response of blood monocytes to *in vitro* lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001;103(18):2236-41.]. Estas diferencias individuales en la dimensión de la respuesta a un determinado estímulo inflamatorio pueden tener un origen genético [Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997;349(9069):1912-3.]. Desafortunadamente, tales respuestas heterogéneas limitan la utilidad de reactantes en fase aguda aguas abajo, tales como por ejemplo hsCRP, como marcadores inflamatorios para la evaluación de riesgos. A diferencia de esto, PIGF parece ser un estímulo directo proximal para procesos inflamatorios dentro de la pared vascular [Luttun A, Tjwa M, Moons L, *et al.* Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8(8):831-40.]. De hecho, los niveles séricos de PIGF elevados eran extremadamente informativos específicamente en pacientes con síndromes coronarios agudos,
 40 sin embargo no los niveles séricos de hsCRP no elevados. En esta cohorte de pacientes, los niveles séricos de PIGF elevados identificaron un subgrupo de pacientes con riesgo cardiaco claramente elevado, que era similar a los pacientes de alto riesgo definidos mediante niveles séricos de troponina elevados. Por tanto, los niveles séricos de PIGF elevados pueden representar en efecto un síntoma inflamatorio primario de inestabilidad coronaria.

Adicionalmente, ya que los efectos pro-inflamatorios de PIGF pueden inhibirse específicamente mediante el bloqueo
 60 de su receptor Flt-1, estos resultados pueden facilitar también un planteamiento para un nuevo objetivo terapéutico anti-inflamatorio en pacientes con enfermedad arterial coronaria [Luttun A, Tjwa M, Canneliet P. Placental Growth Factor (PIGF) and Its Receptor Flt-1 (VEGFR-1): Novel Therapeutic Targets for Angiogenic Disorders. *Ann N Y Acad*

Sci 2002;979:80-93.]. Los efectos pro-inflamatorios de PIGF pueden inhibirse específicamente mediante el bloqueo de su receptor Flt-1 y facilitan una nueva opción terapéutica anti-inflamatoria en pacientes con enfermedad arterial coronaria.

Los resultados del presente estudio demuestran que los niveles sanguíneos elevados de la metaloproteinasas PAPP-A están relacionados con resultado negativo en pacientes con ACS. Acorde con un primer ensayo realizado recientemente estaba el valor predictivo de niveles plasmáticos de PAPP-A de la manera más clara en pacientes sin un aumento de troponina. Por tanto, un nivel plasmático de PAPP-A elevado es no sólo un marcador de la inestabilidad de placas, que fomenta el desarrollo de ACS, sino que indica, aún de manera más importante, un mal pronóstico antes de la aparición de un acontecimiento isquémico agudo que se origina mediante la inestabilidad de placas. Adicionalmente, los niveles de PAPP-A elevados facilitan información adicional pronosticadora incluso en pacientes con niveles plasmáticos de hsCRP elevados, lo que supone que al menos en algunos pacientes los niveles de hsCRP elevados no estén relacionados con la inflamación vascular. El resultado de que el valor predictivo de PAPP-A en pacientes con niveles bajos de la citocina anti-inflamatoria interleucina-10 estaba limitado, respalda además el concepto de que el equilibrio entre citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias es para determinar el resultado de los pacientes con ACS. Mediante el análisis de regresión multivariante se identificaron varios marcadores bioquímicos, incluyendo troponina T, ligando de CD40 soluble, interleucina-10 y PAPP-A como marcadores de predicción independientes para determinar el resultado de los pacientes durante los siguientes seis meses de seguimiento posterior.

Las troponinas cardiacas son marcadores sensibles y específicos de la necrosis miocárdica, son secundarias con respecto a complicaciones tromboticas durante un síndrome coronario agudo y son altamente predictivas para el desarrollo clínico temprano tras el comienzo de ACS. Sin embargo, la estratificación de riesgos en pacientes negativos para troponina con síndrome coronario agudo sigue siendo un reto.

Aproximadamente dos tercios de los pacientes con ACS, sin embargo sin aumentos del segmento ST, presentan valores de troponina normales y más de la mitad de los pacientes presentan resultados electrocardiográficos no conclusivos. Durante las primeras semanas tras el comienzo de un síndrome coronario agudo, el riesgo de muerte o infarto de miocardio no mortal en pacientes negativos para troponina están en aproximadamente del 5 % al 8 %. Por tanto, la aparición a corto plazo de acontecimientos cardiovasculares esenciales permanece de manera relativamente sustancial en pacientes sin indicios de necrosis miocárdica, que genera la necesidad de otro tratamiento diagnóstico. Una monitorización continua del segmento ST, pruebas de estrés y procedimientos de obtención de imágenes de perfusión pueden ser de disponibilidad limitada para la estratificación de riesgos directa de pacientes, de los que se supone que presentan un síndrome coronario agudo. El presente estudio demuestra que los niveles de PAPP-A indican un subgrupo de pacientes sin aumento de troponina, que durante el transcurso de tiempo temprano tras el comienzo de síntomas presentan un riesgo esencialmente más alto de acontecimientos cardiacos (72 horas OR 3,17; 30 días: OR 3,33). A diferencia de esto, los pacientes sin modificaciones del segmento ST que eran negativos tanto para TnT como PAPP-A, estaban sujetos a un riesgo muy bajo (tasa de aparición del 0,9 %). Por tanto, la determinación de PAPP-A en pacientes con ACS es una herramienta eficaz para la estratificación de riesgos a corto plazo de pacientes sin niveles de troponina elevados.

El avance y la desestabilización posterior de placas arterioscleróticas encierra modificaciones importantes en la estructura de la pared arterial. La aparición de un estado inflamatorio local en pacientes con ACS está bien establecida, tal como se detecta mediante marcadores inflamatorios, tales como por ejemplo CRP. Las metaloproteinasas son también indicadores potenciales de la inflamación arterial y pueden contribuir mediante la desintegración de la matriz extracelular a la fragilidad de la placa arteriosclerótica rica en lípidos y eventualmente a su ruptura. Tal como se describió anteriormente para varias otras metaloproteinasas (MMP-1, MMP-3, MMP-12 o MMP-13), se encontró de PAPP-A únicamente de manera reciente que ésta se expresaba en placas erosionadas y disueltas, mientras que la expresión de PAPP-A en placas estables no pudo detectarse. Otros estudios han demostrado también que pacientes con placas carotídeas hiperecogénicas o isoecogénicas muestran niveles de PAPP-A significativamente más altos que aquéllos con lesiones de la carótida tempranas hipoecogénicas. El papel exacto de PAPP-A en la fisiopatología de ACS sigue siendo incierto. De PAPP-A se demostró que es un activador específico del factor de crecimiento I similar a insulina (IGF-I), un potente mediador de la arteriosclerosis. Como una metaloproteinasas de matriz, PAPP-A podría participar del procesamiento de la matriz extracelular de las placas y de manera consecuente podría alterar la caperuza fibrosa. Esto conduce a una morfología de placas que es más sensible frente a la erosión, ruptura y posterior trombosis. El presente estudio demuestra que una medición de PAPP-A individual que se obtiene 8,7 horas tras la aparición de los síntomas, facilita un valor significativamente predictivo para la aparición de muerte e infarto de miocardio no mortal durante el seguimiento posterior de 6 meses. Estos datos pueden suponer que PAPP-A desempeña un papel significativo fisiopatológico en la desestabilización de las placas arterioscleróticas durante ACS. La producción de PAPP-A mediante células activadas dentro de las lesiones arterioscleróticas y su liberación en la matriz extracelular parecen que están vinculadas estrechamente con el proceso inflamatorio local aparece dentro de la pared arterial, tal como se indicó mediante la correlación positiva significativa que se observó entre niveles de CRP y PAPP-A. De hecho, los niveles de PAPP-A eran altamente predictivos en pacientes con niveles de CRP elevados, mientras que en pacientes con niveles de CRP bajos no sirvió PAPP-A como un predictor significativo para determinar el resultado del paciente (figura 26a). Mientras que los niveles de CRP están vinculados con el aumento de la troponina, los niveles de PAPP-A parecen ser menos sensibles con respecto a una lesión miocárdica más pequeña, lo que puede ser especialmente importante en

pacientes con ACS, de los cuales aproximadamente un tercio son positivos en troponina en el momento de la llegada al hospital. Adicionalmente, los niveles de PAPP-A ni interfieren con el valor informativo predictivo de sCD40L, un marcador de la activación plaquetaria en pacientes con ACS, ni alteran a éste. Mediante el análisis multivariante resultaron PAPP-A, sCD40L y TnT todos predictores independientes del resultado desfavorable (tabla 2). Una combinación de PAPP-A y sCD40L era especialmente clara en pacientes que eran negativos a TnT, lo que puede suponer que ambos marcadores reflejan distintas rutas de señales que contribuyen eventualmente a un medio pro-inflamatorio y procoagulante en la circulación coronaria. Para un papel complementario distinto de uno competitivo para predecir un resultado desfavorable en pacientes con ACS, los resultados de los inventores son fomentadores de que era útil la inhibición agresiva de la agregación plaquetaria mediante abciximab especialmente en pacientes con niveles de sCD40L elevados.

En resumen, los resultados de la presente invención demuestran que niveles plasmáticos elevados de PAPP-A como marcador de la inflamación vascular están relacionados con un riesgo elevado de acontecimientos cardiacos posteriores. El valor predictivo de niveles plasmáticos de PAPP-A era independiente de los niveles de troponina elevados que reflejan el riesgo actual de manera secundaria con respecto a complicaciones tromboticas que conducen a lesión miocárdica durante un síndrome coronario agudo. Por tanto, un nivel plasmático de PAPP-A elevado es no sólo un marcador de la inestabilidad de la placa, lo que se refiere al avance hacia un infarto de miocardio, sino que indica también un mal pronóstico incluso tras la aparición de un acontecimiento isquémico agudo que se origina mediante la inestabilidad de la placa.

En resumen puede decirse que el presente estudio documenta el papel significativo e independiente de PIGF como un marcador para la estratificación de riesgos diagnóstica y terapéutica. El elevado riesgo cardiaco de pacientes con altas concentraciones de PIGF, que obtuvieron una terapia convencional con heparina y aspirina, se suprimió mediante el antagonista del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab. El uso combinado de troponinas y PIGF, que representan ambos componentes esenciales de la fisiopatología en pacientes con síndromes coronarios agudos, proporciona conocimientos importantes en la actividad de la enfermedad, el riesgo cardiológico y la actividad de un tratamiento por medio de la inhibición de la glicoproteína IIb/IIIa mediante abciximab, que es superior al uso de un marcador individual.

En resumen, el nivel sérico de PIGF representa un biomarcador eficaz y fiable de la inflamación vascular y el resultado negativo en pacientes con síndromes coronarios agudos. Una medición de los niveles séricos de PIGF aumenta significativamente la información predictiva y pronosticadora obtenida de marcadores inflamatorios convencionales en síndromes coronarios agudos.

A continuación, la invención se explicará en más detalle ahora por medio de ejemplos en relación a las figuras adjuntas sin que se limite, sin embargo, mediante esto. En las figuras muestra:

La figura 1 la relación entre la concentración sérica de sCD40L y la frecuencia de un acontecimiento cardiaco después de 24 horas, 72 horas, 30 días y 6 meses en el grupo de pacientes que habían obtenido un placebo (n = 544). Los pacientes se clasificaron en 5 quintiles. El intervalo de las concentraciones de sCD40L era tal como sigue: 0,003-1,9 µg/l (quintil 1), 1,9-3,5 µg/l (quintil 2), 3,5-5,0 µg/l (quintil 3), 5,0-6,3 µg/l (quintil 4) y > 6,3 µg/l (quintil 5). p < 0,001 después de 72 horas, 30 días y 6 meses.

La figura 2 una representación según Kaplan-Meier de la incidencia acumulativa de infarto de miocardio con resultado mortal o no mortal después de 72 horas (a) y 6 meses (b) según los valores basales de la concentración de sCD40L (valor umbral diagnóstico 5,0 µg/l) en el grupo placebo (n = 544).

La figura 3 los cocientes de riesgo adaptados (incluyendo el intervalo de confianza del 95 %) en el tratamiento con abciximab según los quintos de sCD40L. Un tratamiento satisfactorio se define como la reducción de infartos de miocardio mortales o no mortales en el transcurso de 6 meses. Un cociente de riesgo < 1,0 indica el tratamiento satisfactorio con abciximab en comparación con el tratamiento con placebo.

La figura 4 una representación de Kaplan-Meier de mortalidad e infarto de miocardio no mortal a las 72 horas (a) y 6 meses (b) según la concentración de sCD40L en pacientes que habían obtenido o bien un placebo o abciximab.

La figura 5 la activación plaquetaria dependiendo de la actividad de la enfermedad. La actividad plaquetaria, determinada mediante los agregados de monocitos-plaquetas, era significativamente elevada en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria estable. Otro aumento significativo de la activación plaquetaria se observó en pacientes con síndromes coronarios agudos.

La figura 6, que las concentraciones séricas de sCD40L están estrechamente correlacionadas con la dimensión de la activación plaquetaria en pacientes con y sin síndromes coronarios agudos. Las líneas representadas discontinuas clasifican los pacientes en tertiles según la activación plaquetaria (< 15 %, 15 %-30 %, > 30 %) o las concentraciones séricas de sCD40L (< 2,5 µg/l; 2,5-4,5 µg/l; > 4,5 µg/l).

La figura 7 la relación entre PIGF y hsCRP como un reactante en fase aguda aguas abajo (n = 1088).

La figura 8 respectivamente los niveles séricos de PIGF y hsCRP, según el estado de troponina T basal (n = 1088).

La figura 9 la relación entre la concentración sérica de PIGF y la frecuencia de un acontecimiento cardiaco después de 24 horas, 72 horas, 30 días y 6 meses en el grupo de pacientes que habían obtenido un placebo (n = 547). El intervalo de las concentraciones de PIGF era tal como sigue: por debajo de, igual a 13,3 ng/l (1º quintil), de 13,4 a 19,2 ng/l (2º quintil), de 19,3 a 27,3 ng/l (3º quintil), de 27,4 a 40,0 ng/l (4º quintil), y por encima de 40,0 ng/l (5º quintil). Las diferencias en las tasas de un acontecimiento entre los cuartiles eran significativas a los 30 días (p 0,001) y 6 meses (p < 0,001) del siguiente ensayo.

La figura 10 el análisis de curva de característica operativa del receptor para el valor predictivo de niveles séricos de PIGF para determinar la aparición de mortalidad o infarto de miocardio no mortal en un ensayo posterior de 6 meses.

La figura 11 una representación según Kaplan-Meier de la incidencia acumulativa de infarto de miocardio con resultado mortal o no mortal después de 72 horas (a) y 6 meses (b) según los valores basales de los niveles séricos de PIGF (valor umbral diagnóstico 27,0 ng/l; n = 547).

La figura 12 muestra el valor predictivo de PIGF para la incidencia de infarto de miocardio con resultado mortal o no mortal según los niveles séricos de hsCRP (a) y niveles séricos de troponina T (b). Los valores umbrales diagnósticos eran 27,0 ng/l para PIGF, 0,1 ug/l para troponina T y 10 mg/l para hsCRP; n = 547).

La figura 13 el valor predictivo de niveles séricos de PIGF en el alta médica para el resultado de pacientes a los 6 meses tras el ensayo. Los pacientes con niveles séricos de PIGF elevados estaban sujetos a un riesgo cardiaco más alto, con una tasa de aparición del 7,4 %, en comparación con el 2,2 % para pacientes con niveles séricos de PIGF por debajo de 27,0 ng/l (p= 0,005).

La figura 14: respectivamente niveles de PAPP-A y hsCRP según el estado de troponina T basal. Los círculos indican valores atípicos.

La figura 15: respectivamente niveles de ligando de CD40 soluble y hsCRP según el estado de PAPP-A basal. Los círculos indican valores atípicos.

La figura 16: la relación entre los niveles plasmáticos de PAPP-A y la tasa de acontecimientos cardiacos a las 24 h, 72 h, 30 días y 6 meses según el grupo placebo de PAPP-A (n = 547). El intervalo de PAPP-A era tal como sigue: (PAPP-A_1) < 4,5 mIU/l (n=111); (PAPP-A_2) 4,5 - 7,5 mIU/l (n = 108); (PAPP-A_3) 7,6 - 12,6 mIU/l (n = 109); (PAPP-A_4) 12,7 - 24,0 mIU/l (n = 110) y (PAPP-A_5) > 24,0 mIU/l. Las diferencias en las tasas de aparición eran significativas a las 72 horas (p = 0,019), 30 días (p = 0,008) y 6 meses (p = 0,004).

La figura 17: el análisis de curvas de característica operativa del receptor para el valor predictivo de niveles plasmáticos de PAPP-A para determinar la aparición de muerte e infarto de miocardio no mortal en un seguimiento posterior de 6 meses.

La figura 18: las curvas de tasas de acontecimientos de Kaplan-Meier, que muestran la aparición acumulativa de muerte e infarto de miocardio no mortal a las 72 horas (a) y 6 meses (b) según los niveles plasmáticos basales de PAPP-A. Valor umbral diagnóstico 12,6 mIU/l; n = 547.

La figura 19: el valor predictivo de PAPP-A para determinar la aparición de muerte e infarto de miocardio no mortal se limitó en pacientes con niveles de hsCRP elevados (a) y pacientes con niveles bajos de la citosina anti-inflamatoria IL-10 (b). Valores umbrales diagnósticos 12,6 mIU/l para PAPP-A, 10 mg/l para hsCRP y 3,5 ng/l para IL-10; n = 547.

La figura 20: el valor predictivo de PAPP-A para determinar la aparición de muerte e infarto de miocardio no mortal era especialmente informativo en pacientes sin aumento de troponina T (a). En pacientes que eran negativos tanto para TnT como sCD40L, PAPP-A identificó un subgrupo que padecieron un riesgo cardiovascular elevado en el seguimiento posterior de 6 meses (b). Valores umbrales diagnósticos 12,6 mIU/l para PAPP-A, 0,1 µg/l para TnT y 5,0 µg/l para sCD40L; n = 547.

Ejemplos

I. sCD40L

1. Pacientes

El estudio CAPTURE registró 1.265 pacientes con angina inestable refractaria (61 % de hombres, en edad de 61 [48-72, intervalo de confianza del 95 %]) entre mayo de 1993 y diciembre de 1995. Todos los pacientes de CAPTURE se quejaban de dolores de pecho recurrentes en estado de reposo, asociados con modificaciones de ECG durante un tratamiento con heparina intravenosa y trinitrato de glicerina en el medio durante 14 horas. Toda la población de pacientes se sometió a una angiografía coronaria, antes de que se documentaran la aparición de un

5 enfermedad arterial coronaria clara con lesiones desencadenantes $\geq 17\%$ que eran adecuadas para una angioplastia. A los pacientes se les asignó un tratamiento mediante abciximab o placebo de manera distribuida aleatoriamente. El tratamiento se inició en el intervalo de 2 horas tras la asignación. En todos los pacientes se previeron intervenciones coronarias en el intervalo de 18 a 24 horas tras el inicio del tratamiento (CAPTURE. Lancet 1997; 349:1429-35). Se extrajeron muestras de sangre ($n = 1096$) en el promedio de 8,7 (3,6-11,3) horas tras la aparición de los síntomas (línea base).

10 Los puntos finales primarios del estudio eran mortalidad, infarto de miocardio o la necesidad de intervención inmediata (angioplastia, operaciones de bypass de la arteria coronaria) debido a una inestabilidad durante 30 días o 6 meses. En pacientes que durante la estancia en el hospital habían padecido un infarto de miocardio, éste se diagnosticó cuando sus valores de la actividad enzimática de creatinacinasas eran en al menos dos muestras más del triple de altos que el límite superior del intervalo normal o cuando sus ECG presentaban nuevas ondas Q claras en más de dos intervalos sucesivos. Esta estricta definición se seleccionó para descartar cada aumento insignificamente bajo de la creatinacinasas tras PTCA. En pacientes con un infarto de miocardio tras el alta médica, éste se definió cuando sus valores de la actividad enzimática de creatinacinasas eran más del doble de altos que el límite superior del intervalo normal o cuando su ECG presentaba nuevas ondas Q claras en dos o más intervalos sucesivos. El punto final secundario era la restenosis coronaria sintomática de la lesión tratada con un diámetro de estenosis $\geq 70\%$ y la necesidad de revascularización en diferentes ocasiones durante los siguientes 6 meses.

2. Validación de pacientes con dolor de pecho agudo

20 Un grupo separado de 626 pacientes con dolor de pecho (161 mujeres y 465 hombres, edad promedio de 61 [38-82] años) que llegaron a urgencias en serie sucesiva con dolor de pecho agudo que duró menos de 12 horas (en promedio 5,1 [2,1-10,4] horas). No se consideraron pacientes con una elevación del ST característica en el ECG básico o un infarto de miocardio agudo documentado durante las 2 semanas anteriores. Se extrajeron muestras de sangre en el momento del registro (antes del inicio del tratamiento) y 4 horas más tarde, se mantuvieron en hielo, se centrifugaron en el intervalo de 20 minutos tras la toma de muestras y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis posterior. Se demostró que este tratamiento condujo a resultados reproducibles en la medición de las concentraciones de sCD40L (Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. Circulation 2002; 105:2849-54). Los pacientes se observaron hasta su alta médica del hospital y 30 días después para registrar infartos de miocardio mortales y no mortales. La presencia de una enfermedad arterial coronaria se detectó mediante uno de los siguientes criterios: indicios en ECG de una isquemia miocárdica (nuevas modificaciones en el segmento ST o inversión de la onda T), una enfermedad cardíaca coronaria en el historial clínico (infarto de miocardio o revascularización coronaria, una prueba de carga positiva o estrechamiento del diámetro de una arteria coronaria principal en al menos el 50% en un angiograma temprano). Los pacientes sin enfermedad cardíaca coronaria tenían que presentar un angiograma coronario normal. En un subgrupo de pacientes que incluía 131 pacientes con síndromes coronarios agudos, 20 pacientes con enfermedad cardíaca coronaria estable y 10 pacientes con enfermedad cardíaca coronaria descartada, se determinó la activación plaquetaria por medio de citometría de flujo.

3. Análisis bioquímico

40 Se almacenaron de manera central a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ muestras de plasma, anticoaguladas con heparina sódica. La determinación de los marcadores cardíacos se realizó en el desconocimiento de la historia clínica de los pacientes y del tratamiento dispuesto en el laboratorio de investigación de la Universidad de Frankfurt. Los niveles plasmáticos de sCD40L (límite de detección $0,005\text{ }\mu\text{g/l}$), P-selectina soluble ($0,5\text{ }\mu\text{g/l}$), factor de necrosis tumoral α (TNF- α , de alta sensibilidad; $0,12\text{ ng/l}$) y molécula de adhesión 1 intracelular soluble (*Intracellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1; $0,35\text{ }\mu\text{g/l}$) se midieron por medio de ELISA (R&D Systems, Wiesbaden). Para la cuantificación de troponina T (TnT) se usó un ensayo inmunológico enzimático de una sola etapa basado en la tecnología de electroquimioluminiscencia (Elecsys 2010, Roche Diagnostics; límite de detección $0,01\text{ }\mu\text{g/l}$). La proteína C reactiva (CRP) se midió con ayuda del nefelómetro BN II de Behring (Behring Diagnostics; límite de detección $0,2\text{ }\mu\text{g/l}$).

5. Determinación cuantitativa de sCD40L

50 Se determinó la concentración de sCD40L usando la técnica de ensayo inmunológico enzimático de tipo sándwich (R&D Systems, Wiesbaden). Se revistió una placa de microtitulación con un anticuerpo policlonal que estaba dirigido específicamente frente a sCD40L. Se pipetearon los patrones y muestras en los pocillos y el sCD40L existente se unió mediante el anticuerpo inmovilizado. Después de haber eliminado por lavado el material no unido, se añadió a los pocillos un anticuerpo policlonal acoplado a una enzima que estaba dirigido específicamente frente a sCD40L. Tras una etapa de lavado para eliminar por lavado el reactivo anticuerpo-enzima no unido se añadió a los pocillos una disolución de sustrato y se desarrolló el color en proporción a la cantidad de sCD40L que se unió en la primera etapa. Se detuvo el desarrollo de color y se midió la intensidad de color.

6. Ensayo rápido para la detección de CD40L

Se desarrolló un ensayo rápido basado en la tecnología en fase sólida de la cromatografía con un cóctel de

anticuerpos indicadores policlonales marcados con oro de ratón y anticuerpos de captura policlonales biotinilados. El sistema de ensayo contenía al menos 0,3 µg de cada anticuerpo. Se añadieron al dispositivo de ensayo 200 µl de sangre completa heparinizada o plasma centrifugado. Tras la separación de los componentes sanguíneos celulares de la fracción plasmática a través de un material textil no tejido de fibra de vidrio se suspendió el plasma que migra a través del material textil no tejido en un tampón y se añadió al anticuerpo adsorbido. Los anticuerpos y las moléculas de sCD40L de las muestras formaron complejos de tipo sándwich que migraron a la zona de señal y se acumularon en la ventana de lectura por medio de la interacción con biotina-estreptavidina. Los resultados positivos (sCD40L \geq 4,7 µg/l) se indicaron mediante una línea de color que se desarrolló en el intervalo de 15 minutos. Los anticuerpos indicadores que no se unieron migraron posteriormente y se unieron a una línea de control constituida por anticuerpos anti-IgG de ratón en fase sólida (\geq 0,2 µg). La aparición de esta línea de control por debajo de esta línea de señal confirmaba la función de ensayo sin fallos incluyendo el flujo no impedido del plasma.

7. Activación plaquetaria *in vivo*

Se trataron muestras de sangre, anticoaguladas con citrato sódico, inmediatamente durante 10 minutos con paraformaldehído al 1,1 % en PBS, diluidas 4,6 veces en agua destilada para la lisis de los eritrocitos y se lavaron las células fijadas en PBS. Para determinar P-selectina en plaquetas se incubó el sedimento resuspendido durante 60 minutos con anticuerpo monoclonal específico de glicoproteína IIb conjugado con ficoeritrina (PE) (CD41; Dako Carpintería, California) y anticuerpo monoclonal específico de P-selectina conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen, San Diego, California). Las plaquetas se caracterizaron mediante su dispersión de la luz característica hacia delante y hacia un lado y la unión del anticuerpo específico de glicoproteína IIb conjugado con PE. La activación plaquetaria se expresa en % de las plaquetas positivas para P-selectina. Para identificar los agregados de monocitos-plaquetas circulantes se colorearon las células con anticuerpo monoclonal específico de glicoproteína IIIa conjugado con FITC (CD61; Dako) y anticuerpo monoclonal conjugado con PE frente a CD14 (BD Pharmingen). Los monocitos se identificaron mediante sus propiedades características de dispersión de la luz hacia delante y hacia un lado y la unión de anticuerpo específico de CD14 conjugado con PE. Los agregados de monocitos-plaquetas se definieron como monocitos, en los que pudo detectarse la glicoproteína IIIa, y se indican en porcentaje del número total de monocitos (Michelson AD, Bamard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI, Circulation 2001; 104:1533-7). Cada coloración se incubó en presencia de concentraciones saturadas de un anticuerpo de rata monoclonal no conjugado frente a receptores Fc (anti-CD16/32, BD Pharmingen) para reducir la unión inespecífica y los anticuerpos de isotipo idéntico sirvieron como control (IgG₁-PE y IgG_{2a}-FITC; BD Pharmingen). En total se analizaron 50.000 señales con ayuda de FACS-Calibur (Becton/Dickinson, Heidelberg) y el software CellQuest (BD Pharmingen).

8. Procedimientos estadísticos

Tras una evaluación ciega de los marcadores bioquímicos y de la activación plaquetaria se alinearon los resultados de ensayo con el banco de datos. Para poder diferenciar pacientes con diversos grados de un riesgo cardiológico se seleccionó un análisis de datos orientador. Los pacientes de CAPTURE se clasificaron según la concentración de sCD40L de los quintiles. Para cada uno de los cuatro momentos (24 horas, 72 horas, 30 días y 6 meses) se realizó un análisis de regresión logístico, y los pacientes en el primer quintil (sCD40L < 2,0 µg/l) sirvieron como referencia. Se usó el análisis de curva de características operativas del receptor (ROC) por la zona dinámica del ensayo de sCD40L para identificar la concentración umbral de sCD40L que proporcionó el valor predictivo más alto para la estratificación de riesgos de pacientes con síndromes coronarios agudos. La repercusión de un aumento de los marcadores bioquímicos en el destino del paciente se evaluó usando un modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales que evalúa los valores de línea base de los factores pronosticadores (por ejemplo resultados de ECG, factores de riesgo cardiacos, edad y sexo) y el tratamiento seleccionado aleatoriamente (Harrell FE, Jr., Lee KL, Pollock BG. J Natl Cancer Inst 1988; 80:1198-202). Todos los resultados para las variables continuas se expresan como medianas con intervalo de confianza del 95 %. Los grupos intermedios iguales se analizaron mediante la prueba de T (bidireccional) o ANOVA en experimentos con más de dos subgrupos. Se realizaron pruebas de rango post hoc y comparaciones múltiples por parejas con la prueba de T (bidireccional) con el ajuste de Bonferroni. La comparación de variables categóricas se realizó con la prueba de χ^2 de Pearson. Todos los análisis se realizaron con SPSS 11,0 (SPSS, Inc.). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Ejemplo 1a: Relación entre el riesgo cardiaco y la concentración de sCD40L

Las características de partida de la población seleccionada para este estudio (n = 1088, 86 % de los pacientes de CAPTURE) no se diferencian de la población total del estudio en cuanto a la edad, sexo, perfil de riesgo cardiovascular y tratamiento acompañante antes y tras la selección aleatoria. La reducción de acontecimientos cardiacos en el grupo con abciximab de la población pudo compararse con la población total de CAPTURE (antes de PTCA: un 2,2 % de placebo frente a un 0,9 % de abciximab, $p = 0,094$; tras PTCA: un 7,9 % frente a un 3,5 %, $p = 0,002$; tras 30 días: un 9,0 % frente a un 4,2 %, $p = 0,002$) (CAPTURE. Lancet 1997; 349:1429-35).

Pudo detectarse sCD40L en las muestras de suero de línea base de todos los 1088 pacientes con un valor promedio de 4,5 µg/l (intervalo 0,003-20,4). La concentración de sCD40L no se correlacionaba con las concentraciones medidas de TnT ($r = 0,14$) y CRP ($r = 0,11$). Los pacientes del grupo con placebo (n = 544) se clasificaron según sus

concentraciones de sCD40L medidas en quintiles: (sCD40L 1) $< 1,93 \mu\text{g/l}$ ($n = 100$), (sCD40L 2) $1,93\text{-}3,50 \mu\text{g/l}$ ($n = 102$), (sCD40L 3) $3,50\text{-}5,00 \mu\text{g/l}$ ($n = 121$), (sCD40L 4) $5,00\text{-}6,30 \mu\text{g/l}$ ($n = 115$) o (sCD40L 5) $> 6,30 \mu\text{g/l}$ ($n = 106$). Durante las primeras 24 horas eran ligeramente elevados los puntos finales combinados, mortalidad e infarto de miocardio no mortal, sólo en el quinto quintil de sCD40L en comparación con el primer quintil ($p = 0,13$) (figura 1). En momentos posteriores (72 horas, 30 días, 6 meses) aparecieron estos acontecimientos de manera significativamente más frecuente tanto en el cuarto como en el quinto quintil ($p = 0,003$, $p = 0,0004$ o $p = 0,001$).

Basándose en los resultados descritos anteriormente se dividieron las muestras de pacientes según la concentración umbral calculada. 221 pacientes (40,6 %) presentaron concentraciones de sCD40L de $5,0 \mu\text{g/l}$ o superior, y 323 pacientes presentaron valores $< 5,0 \mu\text{g/l}$. Tal como muestra la tabla 1, no se produjeron diferencias significativas en las características de partida de los dos grupos. En pacientes con bajas concentraciones de sCD40L eran diferentes los puntos finales combinados, infarto de miocardio mortal y no mortal, significativamente de aquéllos de pacientes con elevadas concentraciones de sCD40L tanto 24 horas antes del procedimiento (un 4,1 % frente a un 0,9 %; $p = 0,016$) como 72 horas después (incluyendo intervenciones coronarias en todos los pacientes) (un 13,1 % frente a un 4,3 %; frente a un 4,3 %; $p < 0,001$) (figura 2a). Durante el periodo posterior de 6 meses divergieron más las curvas que indican la frecuencia de un acontecimiento en pacientes con altas o bajas concentraciones de sCD40L (figura 2b). Se obtuvieron diferencias significativas tanto después de 30 días (un 14,5 % frente a un 5,3 %; $p < 0,001$) como después de 6 meses (un 18,6 % frente a un 7,1 %; $p < 0,001$). Debido a la mortalidad relativamente baja del grupo de CAPTURE no se diferencia la mortalidad de punto final después de 6 meses significativamente entre los dos grupos (un 2,3 % frente a un 1,5 %; $p = 0,72$). El valor predictivo de sCD40L no dependía de una necrosis miocárdica. En pacientes negativos para TnT se identificó, por medio de la concentración de sCD40L, un grupo de pacientes con elevado riesgo cardiaco (13,6 %) que no se diferenciaba significativamente del riesgo cardiaco de pacientes positivos para TnT (14,0 %; $p = 1,00$). El análisis de curva de características operativas del receptor confirmó una concentración umbral de $5,0 \mu\text{g/l}$ para el valor predictivo maximizado de sCD40L. Las intervenciones cardiológicas no urgentes en diferentes ocasiones durante los primeros 6 meses no eran significativamente diferentes en pacientes con altas concentraciones de sCD40 de aquéllas en pacientes con bajas concentraciones de sCD40L (un 6,2 % frente a un 4,5 %; $p = 0,45$).

De 626 pacientes sin elevación del ST, que se personaron en urgencias con dolor de pecho agudo, 308 pacientes padecían síndrome coronario agudo (117 pacientes habían padecido un infarto de miocardio agudo, basado en un aumento de troponina $\geq 0,1 \mu\text{g/l}$). En los otros pacientes se presentaron los siguientes diagnósticos: $n = 91$ angina estable, $n = 10$ embolia pulmonar, $n = 11$ insuficiencia cardiaca congestiva, $n = 7$ miocarditis y $n = 199$ ningún indicio de una enfermedad cardiaca. Las concentraciones de sCD40L eran significativamente más altas en pacientes con síndromes coronarios agudos ($4,53 [3,19\text{-}5,87] \mu\text{g/l}$) en comparación con pacientes con angina estable ($2,41 [1,99\text{-}3,52] \mu\text{g/l}$; $p < 0,001$) o pacientes sin síntomas de una enfermedad cardiaca ($1,57 [0,88\text{-}1,76] \mu\text{g/l}$; $p < 0,001$). El valor promedio del límite de referencia superior (*Upper Reference Limit*, URL) de 97,5 en pacientes sin síntomas de molestias cardiacas ascendía a $4,7 \mu\text{g/l}$ y el valor promedio de URL de 99 se encontraba en $6,2 \mu\text{g/ml}$. De manera similar a los resultados que se obtuvieron en el estudio CAPTURE, la concentración sérica de sCD40L no se correlacionaba con marcadores de necrosis (troponina T), marcadores de inflamación (CRP, TNF- α) y moléculas de adhesión (ICAM-1). En pacientes con síndromes coronarios agudos, un 43,5 % presentaron concentraciones séricas de sCD40L por encima del valor promedio de URL de 97,5 y un 21,8 % presentaron concentraciones séricas de sCD40L por encima del valor promedio de URL de 99. Con el uso de una concentración umbral fijada para sCD40L de $5,0 \mu\text{g/l}$ se identificaron pacientes con concentraciones séricas de sCD40L elevadas como población de alto riesgo (cociente de riesgo fijado 3,00 [$1,35\text{-}6,71$]; $p = 0,009$). Dentro de toda la población heterogénea de pacientes con dolor de pecho, la concentración umbral fijada de $5,0 \mu\text{g/l}$ era igualmente fiable para identificar pacientes que presentaban un riesgo de alto grado de acontecimientos cardiológicos durante los siguientes 30 días (cociente de riesgo fijado 6,65 [de 3,18 a 13,89]; $p < 0,001$). La superficie por debajo de la curva de ROC ascendía a 0,75 [$0,67\text{-}0,83$] y se alcanzó un valor predictivo maximizado en una concentración umbral de $4,8 \mu\text{g/l}$.

Ejemplo 2a: Resultados angiográficos y concentración de sCD40L

Los angiogramas coronarios de línea base en pacientes con concentraciones de sCD40L elevadas mostraron características más complejas de las lesiones. En un 40,6 % de los pacientes con altas concentraciones de sCD40L se documentaron lesiones del tipo B2+ o C, mientras que sólo el 27,5 % de los pacientes con bajas concentraciones de sCD40L presentaron características de lesión más complejas ($p = 0,004$).

El valor de línea base para el flujo de TIMI era normal en un 59,6 % de los pacientes con altas concentraciones de sCD40L y en un 58,9 % de los pacientes con bajas concentraciones de sCD40L ($p = 0,049$). Un flujo de TIMI = 1 se documentó para el 7,8 % de los pacientes con altas concentraciones de sCD40L en comparación con el 5,7 % de pacientes con bajas concentraciones de sCD40L ($p = 0,67$).

Pudo observarse un trombo en el momento del registro en un 11,1 % de los pacientes con altas concentraciones de sCD40L en comparación con un 4,8 % de pacientes con bajas concentraciones de sCD40L ($p = 0,009$). Todos los pacientes con formación de trombo observable presentaban concentraciones de sCD40L $> 2,5 \mu\text{g/l}$.

Ejemplo 3a: Efecto de abcximab sobre la concentración de sCD40L

Un análisis de regresión logística indicó una relación significativa entre la actividad de un tratamiento con abciximab y de las concentraciones de sCD40L ($p < 0,001$). Los pacientes se clasificaron tal como se indicó anteriormente en quintiles. Para los primeros dos quintiles no se observó ninguna diferencia con respecto a un riesgo cardiaco en un tratamiento con placebo o abciximab (figura 3). Se documentó una reducción significativa e igualmente pronunciada de acontecimientos cardiacos para los dos quintiles anteriores. El resultado de una modificación de la diferencia en 0,35 entre el segundo y el tercer quintil insinúa una concentración umbral favorable en este intervalo de las concentraciones de sCD40L. Según esto se generaron las curvas que representan la frecuencia de un acontecimiento cardiaco en forma de un infarto de miocardio mortal o no mortal, usando una concentración umbral de 5,0 $\mu\text{g/l}$. Los acontecimientos antes de este procedimiento fueron infrecuentes en pacientes con bajas concentraciones de sCD40L, que obtuvieron placebo (0,9 %), mientras que en un 3,4 % de los pacientes aparecieron acontecimientos en relación con una intervención coronaria (figura 4a). En pacientes con bajas concentraciones de sCD40L no se observó ninguna diferencia entre pacientes que obtuvieron abciximab y aquéllos que obtuvieron placebo (24 horas: un 1,2 % frente a un 0,9 %; 72 horas: un 3,8 % frente a un 4,3 %). Sólo pocos acontecimientos adicionales se registraron en los siguientes 6 meses. La frecuencia total ascendió al 7,1 % (figura 4b).

A diferencia de esto, la frecuencia de ataques era significativamente más alta en pacientes con altas concentraciones de sCD40L que habían obtenido placebo tanto antes de PTCA (4,1 %) como después de PTCA (9,0 %), del mismo modo como en el siguiente momento tras el alta médica, lo que condujo a una frecuencia total del 18,6 % después de seis meses. Los acontecimientos que aparecieron antes y después de PTCA se redujeron mediante el tratamiento con abciximab de manera eficaz en un 0,5 % antes de PTCA (cociente de riesgo 0,12 [0,01-0,92]; $p = 0,013$) y un 2,9 % para los acontecimientos relacionados con PTCA (cociente de riesgo 0,19 [0,08-0,49]; $p < 0,001$). Esta mejora perduró durante seis meses tras el acontecimiento, lo que condujo a una frecuencia acumulativa de los acontecimientos del 7,8 % frente al 18,6 % en el grupo placebo (cociente de riesgo 0,37 [0,20-0,68]; $p = 0,001$). Este valor puede compararse con el que se observó en pacientes con bajas concentraciones de sCD40L (7,1 %). Adicionalmente era evidente la acción de la inhibición de la glicoproteína IIb/IIIa sin la aparición de una necrosis miocárdica. En pacientes negativos para TnT se identificó por medio de la concentración de sCD40L un subgrupo de pacientes que mostraban una reducción significativa de acontecimientos cardiacos, cuando obtuvieron abciximab (un 2,8 % frente a un 10,2 %; placebo frente a abciximab; $p = 0,022$).

La disolución de un trombo durante el tratamiento dispuesto antes de la intervención coronaria fue especialmente llamativa en pacientes con altas concentraciones de sCD40L, cuando se trataban con abciximab, con una reducción relativa del 63 % (placebo: -21 %; $p < 0,01$). Una formación de un trombo en pacientes con bajas concentraciones de sCD40L era infrecuente y no se alcanzó una disolución significativa ni en el grupo con placebo ($p = 0,75$) ni en el grupo con abciximab ($p = 0,82$).

Ejemplo 4a: sCD40L como marcador de una activación plaquetaria *in vivo*

Para verificar la hipótesis de que sCD40L representa realmente un marcador para la activación plaquetaria, se sometió a ensayo la proporción de la activación plaquetaria y de las concentraciones séricas de sCD40L en un subgrupo de pacientes con dolor de pecho agudo ($n = 151$) posiblemente. La dimensión de la activación plaquetaria era significativamente más elevada en pacientes con síndromes coronarios agudos en comparación tanto con pacientes con enfermedad cardiaca coronaria estable como con pacientes sin enfermedad cardiaca coronaria (figura 5). Se observó una estrecha correlación entre la activación plaquetaria, determinada por medio de agregados de monocitos-plaquetas (%), y la concentración de sCD40L ($r = 0,75$; $p < 0,0001$) (figura 6). Se obtuvieron resultados similares para P-selectina ($p < 0,001$). Los pacientes se clasificaron según sus concentraciones de sCD40L medidas en terciles: (sCD40L 1) $< 2,5 \mu\text{g/l}$ ($n = 55$), (sCD40L 2) $2,5-4,5 \mu\text{g/l}$ ($n = 50$), o (sCD40L 3) $> 4,5 \mu\text{g/l}$ ($n = 56$). En pacientes del primer tercil de sCD40L, la proporción porcentual de agregados de monocitos-plaquetas ascendió al 11,3 % [9,6-12,9]. En el segundo y tercer tercil de sCD40L, la activación plaquetaria era significativamente más alta (un 22,3 [19,8-24,8] % o un 34,1 [30,0-38,3] %; $p < 0,001$). Es especialmente interesante que en todos los pacientes (con excepción de un paciente) presentaran las concentraciones séricas de sCD40L $> 4,5 \mu\text{g/l}$, al menos un 15 % de los monocitos están agregados con plaquetas, lo que indica una activación plaquetaria clara en estos pacientes. A diferencia de esto, las concentraciones séricas de P-selectina soluble mostraron una relación claramente poco pronunciada con la activación plaquetaria ($r = 0,41$ para agregados de plaquetas-monocitos o $r = 0,36$ la P-selectina). En un análisis de regresión multivariante se demostró que una enfermedad de diabetes ($p = 0,015$), una hipercolesterolemia ($p = 0,006$) y la concentración de sCD40L ($p < 0,0001$), sin embargo no la concentración de P-selectina soluble, estaban asociadas significativamente con la activación plaquetaria (agregados de monocitos-plaquetas > 30 %).

Tabla 1: Características de línea base de sCD40L en el grupo placebo

	sCD40L baja	sCD40L alta
n	323	221
Hombres	73,3 %	70,2 %
edad	60,5 ± 9,9	62,3 ± 10,5
Historial clínico		
Angina más de 4 semanas	57,5 %	54,6 %
Infarto a 14-30 días	3,5 %	2,4 %
Infarto más de 30 días	19,5 %	21,0 %
PTCA	19,1 %	15,9 %
CABG	3,5 %	3,4 %
Factores de riesgo		
Diabetes	12,1 %	9,6 %
Hipercolesterolemia	32,5 %	33,6 %
Hipertensión	39,3 %	34,5 %
Fumador	40,9 %	42,1 %
Medicación antes del registro		
Aspirina	98,1 %	97,7 %
Heparina i.v.	99,2 %	98,6 %
Nitratos i.v.	98,8 %	99,7 %
Bloqueadores beta	65,0 %	61,4 %
antagonistas de Ca ²⁺	56,0 %	55,2 %

Tabla 2: Infarto de miocardio mortal y no mortal en el intervalo de los primeros 6 meses (análisis de regresión multivariante)

Variable	OR	IC del 95 %	Valor p
Sexo	0,91	0,68-1,39	0,16
Edad superior a 65 años	1,36	0,91-1,82	0,34
Diabetes mellitus	1,22	0,83-1,49	0,61
Hipercolesterolemia	0,90	0,68-1,13	0,59
Hipertensión	1,00	0,89-1,04	1,00
Historia de una CHD	0,86	0,65-1,19	0,72
Reducción del ST	1,04	0,76-1,54	0,74
TnT > 0,1 µg/l	2,94	1,75-7,26	< 0,001
CRP > 10 mg/l	2,03	1,11-3,59	0,018
sCD40L > 5,0 µg/l	2,71	1,51-5,35	0,001

II. PIGF

PIGF se identificó originariamente en la placenta y estimula el crecimiento del músculo liso vascular, recluta macrófagos en lesiones arterioscleróticas, regula la producción de TNF- α y MCP-1 mediante macrófagos altamente y estimula la angiogénesis patológica. De manera mucho más importante, de la inhibición de los efectos de PIGF mediante bloqueo de su receptor tirosinacinasasa Flt-1 se demostró experimentalmente que esto suprimía tanto el crecimiento de la placa arteriosclerótica como la vulnerabilidad mediante la inhibición de la infiltración celular inflamatoria. Estos datos pueden insinuar que PIGF sirve quizás como un indicador inflamatorio primario de la inestabilidad de la placa arteriosclerótica.

Por tanto se usó la significancia pronosticadora de PIGF en pacientes con síndromes coronarios agudos usando los datos de los pacientes con síndromes coronarios agudos que se registraron en el ensayo de CAPTURE (c7E3 "Anti Platelet Therapy in Unstable Refractory angina"), y entonces se validó preliminarmente la significancia diagnóstica y pronosticadora en una población de pacientes grande que se hospitalizaron con dolores en el pecho. Se midieron los niveles séricos de PIGF en 1088 pacientes con síndromes coronarios agudos del ensayo de CAPTURE. Adicionalmente se validó preliminarmente la significancia diagnóstica y pronosticadora de niveles séricos de PIGF en un grupo heterogéneo de 619 pacientes con dolores agudos en el pecho. La incidencia de infarto de miocardio con resultado mortal o no mortal se registró durante el periodo posterior.

1. Pacientes

Construcción de conjuntos de pacientes con síndromes coronarios agudos. El estudio CAPTURE registró 1265 pacientes con síndromes coronarios agudos (61 % hombres, en la edad de 61 ± 10 años). Todos los pacientes de CAPTURE se quejaban de dolores de pecho recurrentes en estado de reposo, asociados con modificaciones de ECG durante un tratamiento con heparina intravenosa y trinitrato de glicerina. Toda la población de pacientes se sometió a una angiografía coronaria antes de la aleatorización que mostró la aparición de una clara enfermedad arterial coronaria con lesiones desencadenantes de > 70 % que eran adecuadas para una angioplastia. Se administró heparina desde antes de la aleatorización hasta al menos 1 h tras el procedimiento de PTCA. En todos los pacientes se previeron intervenciones coronarias en el intervalo de 18 a 24 horas tras el inicio del tratamiento. A los pacientes se les asignó un tratamiento mediante abciximab o placebo de manera aleatoriamente distribuida. Los puntos finales primarios del estudio eran mortalidad e infarto de miocardio no mortal durante el periodo de reconocimiento médico posterior a los 6 meses. Se extrajeron muestras de suero 8,7 [IC del 75 % 3,6-11,3] horas tras la aparición de los síntomas.

2. Validación de pacientes con dolor de pecho agudo

Un grupo separado de 626 pacientes con dolor de pecho (161 mujeres y 465 hombres, edad promedio de 61 [38-82] años) que llegaron a urgencias en serie sucesiva con dolor de pecho agudo que duró menos de 12 horas (en promedio 5,1 [2,1-10,4] horas) se estableció como conjunto. No se consideraron pacientes con una elevación del ST característica en el ECG básico o un infarto de miocardio agudo documentado durante las 2 semanas anteriores. Se extrajeron muestras de sangre en el momento del registro (antes del inicio del tratamiento) y 4 horas más tarde, se mantuvieron en hielo, se centrifugaron en el intervalo de 20 minutos tras la toma de muestras y se almacenaron a -80 °C para el análisis posterior. Los pacientes se observaron hasta su alta médica del hospital y 30 días después para registrar infartos de miocardio mortales y no mortales. La presencia de una enfermedad arterial coronaria se detectó mediante uno de los siguientes criterios: indicios de ECG de una isquemia miocárdica (nuevas modificaciones del segmento ST o inversión de la onda T), una enfermedad cardíaca coronaria en el historial clínico (infarto de miocardio o revascularización coronaria, una prueba de carga positiva o estrechamiento del diámetro de una arteria coronaria principal en al menos el 50 % en un angiograma temprano). Los pacientes sin enfermedad cardíaca coronaria tenían que presentar un angiograma coronario normal.

Los puntos finales primarios del estudio eran mortalidad, infarto de miocardio o la necesidad de intervención inmediata (angioplastia, operaciones de bypass de la arteria coronaria) debido a una inestabilidad durante 30 días o 6 meses. En pacientes que durante la estancia en el hospital habían padecido un infarto de miocardio, éste se diagnosticó cuando sus valores de la actividad enzimática de creatinacinasasa eran en al menos dos muestras más del triple de altos que el límite superior del intervalo normal o cuando sus ECG presentaban nuevas ondas Q claras en más de dos intervalos sucesivos. Esta estricta definición se seleccionó para descartar cada aumento insignificamente bajo de la creatinacinasasa tras PTCA. En pacientes con un infarto de miocardio tras el alta médica, éste se definió cuando sus valores de la actividad enzimática de creatinacinasasa eran más del doble de altos que el límite superior del intervalo normal o cuando su ECG presentaba nuevas ondas Q claras en dos o más intervalos sucesivos. El punto final secundario era la restenosis coronaria sintomática de la lesión tratada con un diámetro de estenosis ≥ 70 % y la necesidad de revascularización en diferentes ocasiones durante los siguientes 6 meses.

3. Análisis bioquímico

Se almacenaron de manera central a -80 °C muestras de suero. La determinación de los marcadores cardiacos se realizó en el desconocimiento de la historia clínica de los pacientes y del tratamiento dispuesto en el laboratorio de

investigación de la Universidad de Frankfurt. Los niveles séricos de PIGF y VEGF se midieron por medio de ELISA (R&D Systems, Wiesbaden). Para la cuantificación de troponina T (TnT) cardiaca se usó un ensayo inmunológico enzimático de una sola etapa basado en la tecnología de electroquimioluminiscencia (Elecsys 2010, Roche Diagnostics). La proteína C reactiva altamente sensible (hsCRP) se midió con ayuda del nefelómetro BN II de Behring (Behring Diagnostics). Se usó un valor umbral diagnóstico de 10,0 mg/l [9, 18].

4. Determinación cuantitativa de PIGF

La concentración de PIGF se determinó usando la técnica de ensayo inmunológico enzimático de tipo sándwich (R&D Systems, Wiesbaden). Se revistió una placa de microtitulación con un anticuerpo policlonal que estaba dirigido específicamente frente a PIGF. Se pipetearon patrones y muestras en los pocillos y se unió PIGF existente mediante el anticuerpo inmovilizado. Después de haber eliminado por lavado el material no unido, se añadió a los pocillos un anticuerpo policlonal acoplado a una enzima que estaba dirigido específicamente frente a PIGF. Tras una etapa de lavado para eliminar por lavado el reactivo anticuerpo-enzima no unido se añadió a los pocillos una disolución de sustrato y se desarrolló el color en proporción a la cantidad de PIGF que se unió en la primera etapa. Se detuvo el desarrollo de color y se midió la intensidad de color.

5. Procedimientos estadísticos

Tras una evaluación ciega de los marcadores bioquímicos se alinearon los resultados de ensayo con el banco de datos. Para poder diferenciar pacientes con diversos grados de un riesgo cardiológico se seleccionó un análisis de datos orientador. Se usó el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para evaluar el riesgo relativo de sucesos cardiovasculares, y los pacientes se clasificaron según la concentración de PIGF de los quintiles. El análisis post-hoc de los quintiles se realizó usando el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales con los quintiles de PIGF como una variable categórica, y los pacientes en el primer quintil sirvieron como referencia. Se usó el análisis de curva de características operativas del receptor (ROC) por la zona dinámica del ensayo de PIGF para identificar la concentración umbral para PIGF que proporcionó el valor predictivo más alto para la estratificación de riesgos de pacientes con síndromes coronarios agudos. El efecto de las características de línea base (siendo necesario $p = 0,10$ para introducir una variable en el modelo) y de otros marcadores bioquímicos sobre cualquier relación observada entre niveles de PIGF y sucesos cardiovasculares se realizó usando el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales gradual. Todos los resultados de las variables continuas están expresados como promedios \pm desviación estándar. La comparación entre los grupos se analizó mediante una prueba de t (bidireccional). La comparación de variables categóricas se generó mediante la prueba de χ^2 de Pearson. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago).

Ejemplo 1b: Relación entre el riesgo cardiaco y la concentración de PIGF

Las características de partida de la población seleccionada para este estudio ($n = 1088$, 86 % de los pacientes de CAPTURE) no se diferencian de la población total del estudio en cuanto a la edad, sexo, perfil de riesgo cardiovascular y tratamiento acompañante antes y tras la selección aleatoria. La reducción de acontecimientos cardiacos en el grupo con abciximab de la población pudo compararse con la población total de CAPTURE tanto antes de PTCA (un 2,2 % de placebo frente a un 0,9 % de abciximab; $p = 0,07$), como después de PTCA (un 7,9 % frente a un 3,5 %; $p = 0,001$), y en 30 días (un 9,0 % frente a un 4,2 %; $p = 0,001$).

Pudo detectarse PIGF en las muestras de suero de línea base del 95,6 % de los pacientes del estudio con un valor promedio de 23,0 ng/l (intervalo 7,0-181,2). El nivel sérico de PIGF no se correlacionaba con las concentraciones medidas de troponina T ($r = 0,14$) y niveles de VEGF ($r = 0,07$), sin embargo mostró una correlación significativa con niveles séricos de hsCRP ($r = 0,48$) (figura 7). El nivel sérico de PIGF no se diferencia entre pacientes positivos para troponina T y negativos para troponina T, mientras que los niveles séricos de hsCRP en pacientes positivos para troponina T eran significativamente más altos (figura 8). Los pacientes del grupo con placebo ($n=547$) se clasificaron según sus niveles séricos de PIGF medidos en quintiles: respectivamente (PIGF 1) $< 13,3$ ng/l ($n = 109$), (PIGF 2) 13,4-19,2 ng/l ($n = 110$), (PIGF 3) 19,3-27,3 ng/l ($n = 110$), (PIGF 4) 27,3-40,0 ng/l ($n = 109$), y (PIGF 5) $> 40,0$ ng/l ($n = 109$). Durante las primeras 24 horas no eran diferentes los puntos finales combinados, mortalidad e infarto de miocardio no mortal entre los quintiles de PIGF ($p = 0,11$) (figura 9). En momentos posteriores (72 horas, 30 días, 6 meses) las tasas de sucesos mostraron diferencias significativas entre los quintiles de PIGF. En el reconocimiento médico posterior a las 72 horas, las tasas de sucesos eran significativamente más altas en el cuarto y quinto quintil, cuando se compararon con el primer quintil (respectivamente $p = 0,038$ y $p = 0,011$). Durante el siguiente reconocimiento médico posterior a los 6 meses, las tasas de sucesos divergieron más, lo que condujo a diferencias significativas para el cuarto y quinto quintil en el reconocimiento médico posterior a los 30 días (respectivamente $p = 0,005$ y $p = 0,017$) y a los 6 meses (respectivamente $p = 0,002$ y $p = 0,001$).

El análisis de curvas de características operativas del receptor confirmó un valor umbral de 27,0 ng/l para el valor predictivo maximizado de PIGF (figura 10). Basándose en estos valores umbrales, 223 pacientes (40,8 %) presentaban niveles séricos de PIGF por encima de o igual a 27,0 ng/l, y 324 pacientes por debajo de 27,0 ng/l. Tal como muestra la tabla 3, se produjeron pequeñas diferencias en las características de partida de los dos grupos. Los pacientes con niveles séricos de PIGF elevados eran frecuentemente diabéticos y presentaban hipertensión y tenían

niveles séricos de hsCRP significativamente superiores (tabla 3). En pacientes con alto nivel sérico de PIGF, los puntos finales combinados, infarto de miocardio mortal y no mortal, eran significativamente distintos de pacientes con bajo nivel sérico de PIGF. Después de 72 horas (incluyendo intervenciones coronarias en todos los pacientes) tuvieron un acontecimiento negativo un 12,1 % de los pacientes con alto nivel sérico de PIGF, comparados con un 4,9 % de los pacientes con bajo nivel sérico de PIGF ($p = 0,002$) (figura 11a). Durante el periodo posterior de 6 meses divergieron más las curvas que muestran la frecuencia de un acontecimiento entre pacientes con altos o bajos niveles séricos de PIGF (figura 11b). Se obtuvieron diferencias significativas tanto después de 30 días (un 15,8 % frente a un 3,6 %; $p = 0,001$) como después de 6 meses (un 20,3 % frente a un 4,9 %; $p < 0,001$). A pesar de la mortalidad relativamente baja del grupo de CAPTURE se diferencia la mortalidad de punto final después de 6 meses significativamente entre los dos grupos (un 4,0 % frente a un 0,9 %; $p = 0,021$). En un análisis multivariante, las características de línea base y los marcadores bioquímicos (troponina T, VEGF, hsCRP), PIGF permanecía como un predictor eficaz independiente de riesgos cardiacos elevados tanto en el reconocimiento médico posterior a los 30 días (proporción de riesgos ajustada 3,34 [IC del 95 % 1,79 - 6,24]; $p < 0,001$) como en el reconocimiento médico posterior a los 6 meses (proporción de riesgos ajustada 3,58 [IC del 95 % 1,48 - 7,72]; $p < 0,001$) (tabla 4). La división de los pacientes en cuatro grupos, basándose en sus niveles de PIGF y hsCRP, resultó que PIGF identificaba un subgrupo de pacientes con bajos niveles séricos de hsCRP que padecían un riesgo cardiaco significativamente elevado. Los pacientes con bajo nivel sérico de hsCRP, sin embargo niveles séricos de PIGF por encima de 27,0 ng/l presentaban un riesgo significativamente más alto que pacientes que presentaban niveles bajos tanto para hsCRP como para PIGF (un 23,6 % frente a un 3,9 %; $p = 0,001$) (figura 12a).

Adicionalmente, el valor predictivo de PIGF era independiente de la necrosis miocárdica. Los niveles séricos de PIGF altos indicaban un riesgo cardiaco elevado tanto en pacientes positivos para troponina T (un 15,4 % frente a un 4,1 %; $p = 0,005$) como en pacientes negativos para troponina T (un 26,1 % frente a un 10,1 %; $p = 0,001$) (figura 12b).

Ejemplo 2b: Efecto de abciximab con respecto a niveles séricos de PIGF

Un análisis de regresión logística indicó una relación significativa de límite entre la actividad de un tratamiento con abciximab y las concentraciones de PIGF ($p = 0,043$). Los pacientes con niveles séricos de PIGF elevados que obtuvieron abciximab, tenían un riesgo significativamente más bajo en el reconocimiento médico posterior a los 30 días (proporción de riesgos ajustada 0,38 [0,19 - 0,74]; $p = 0,005$). Esta diferencia significativa se mantuvo en el reconocimiento médico posterior a los 6 meses (0,57 [0,34 - 0,96]; $p = 0,037$). A diferencia de esto, los pacientes con niveles séricos de PIGF bajos no obtuvieron ninguna ventaja terapéutica significativa de un tratamiento con abciximab (reconocimiento médico posterior a los 30 días: proporción de riesgos ajustada 0,59 [0,27 - 1,33]; $p = 0,23$).

Ejemplo 3b: Los niveles séricos de PIGF en el alta médica son predictivos para el resultado a largo plazo

Una segunda muestra de sangre que se recogió antes del alta médica ($7,2 \pm 4,5$ días después de la aleatorización), se obtuvo para 489 pacientes de los 547 pacientes con placebo (89,4 %). Los niveles séricos de PIGF disminuyeron desde un promedio de $27,12 \pm 19,56$ ng/l en línea de base hasta $23,4 \pm 26,2$ ng/l en el alta médica ($p = 0,012$). Para pacientes con un nivel sérico de PIGF por encima de 27,0 ng/l en el alta médica, la aparición de mortalidad e infarto de miocardio no mortal era significativamente más alta, cuando se comparó con pacientes con nivel sérico de PIGF bajo, tanto en el reconocimiento médico posterior a los 30 días (un 4,6 % frente a un 0,8 %; $p = 0,019$) como a los 6 meses (un 7,4 % frente a un 2,2 %; $p = 0,005$) (figura 13).

Ejemplo 4b: Validación del valor umbral de PIGF en pacientes con dolores de pecho agudos

De 626 pacientes con dolores de pecho agudos, 308 pacientes padecieron un síndrome coronario agudo (117 pacientes tuvieron un infarto de miocardio sin elevación del ST). A los otros pacientes se les asignó el siguiente diagnóstico: $n = 91$ angina estable, $n = 10$ embolia pulmonar, $n = 11$ fallo cardiaco congestivo, $n = 7$ miocarditis, y $n = 199$ ningún indicio de enfermedad cardiaca. Los niveles séricos de PIGF eran significativamente elevados en pacientes con síndromes coronarios agudos (promedio 28,3 [IC del 95 % 21,3 - 2,2] ng/l), cuando se compararon respectivamente con pacientes con angina estable (promedio 16,2 [IC del 95 % 13,8 - 18,6 ng/l; $p = 0,001$), y pacientes sin síntomas de enfermedad cardiaca (promedio 9,6 [IC del 95 % 10,4 - 12,9 ng/l; $p = 0,001$). Los niveles séricos de PIGF en pacientes con infarto de miocardio sin elevación del ST no se diferenciaban significativamente de niveles séricos de PIGF en pacientes con angina inestable (30,5 [IC del 95 % 26,9 - 34,1] frente a 28,3 [IC del 95 % 21,3 - 32,2] ng/l; $p = 0,42$). El límite de referencia superior del 97,5 por ciento en pacientes sin indicios de enfermedad cardiaca era de 24,9 ng/l y el límite de referencia superior del 99 por ciento era de 27,3 ng/l. El nivel sérico de PIGF no se correlacionaba con marcadores de la necrosis (troponina T [$r = 0,07$]), sin embargo se correlacionaba significativamente con marcadores de inflamación (proteína C reactiva [$r = 0,43$]).

En pacientes con síndromes coronarios agudos, el 44,8 % de los pacientes presentaban niveles séricos de PIGF por encima del límite de referencia superior del 99 por ciento. Con el uso del valor umbral para PIGF de 27,0 ng/l, los pacientes con nivel sérico de PIGF elevado estaban sujetos a un riesgo significativamente más alto de muerte e infarto de miocardio (proporción de riesgos ajustada 2,97 [IC del 95 % de 1,74 a 9,06; $p = 0,014$). Dentro de toda la población heterogénea de pacientes con dolores de pecho, el valor umbral de 27,0 ng/l identificó también de forma fiable pacientes que estaban expuestos al riesgo más alto de muerte e infarto de miocardio (proporción de riesgos

ajustada 4,95 [IC del 95 % de 2,50 a 9,79; p 0,001).

Resumen de los ejemplos 1b a 4b

5 En pacientes con ACS, PIGF no se correlaciona con VEGF, troponina T, y modificaciones del segmento ST, sin embargo muestra una correlación significativa con hsCRP (p = 0,001). Los pacientes con nivel sérico de PIGF elevado (> 27,0 ng/l; 40,8 %) experimentaron un riesgo cardiaco considerablemente elevado (muerte e infarto de miocardio no mortal) tanto a los 30 días (proporción de riesgos ajustada 3,34 [IC del 95 % 1,79 - 6,24]; p = 0,001) como a los 6 meses (proporción de riesgos ajustada 3,58 [IC del 95 % 1,48 - 7,72]; p = 0,001) tras ACS. Los niveles séricos de PIGF eran informativos específicamente en pacientes con niveles de hsCRP bajos. La validación preliminar en pacientes con dolores de pecho agudos dio como resultado que un nivel sérico de PIGF > 27 ng/l 10 identificó de forma fiable aquellos pacientes que estaban expuestos al riesgo más alto de muerte e infarto de miocardio (proporción de riesgos ajustada 4,95 [IC del 95 % de 2,50 a 9,79; p = 0,001). El riesgo elevado en pacientes con alto nivel sérico de PIGF se redujo mediante el tratamiento con el inhibidor del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab (proporción de riesgos ajustada 0,38 [0,19 - 0,74]; p = 0,005).

15 **Tabla 3:** Características de línea base según el estado de PIGF para el grupo con placebo del ensayo CAPTURE (n= 547)

	PIGF bajo	PIGF alto	Valor de p
n	324	223	
Hombres	71,4 %	69,2 %	0,34
Edad	61,4 ± 10,5	62,3 ± 10,5	0,32
Troponina T ≥ 0,1 µg/l	33,8 %	40,4 %	0,12
CRP ≥ 10,0 µg/l	29,1 %	67,7 %	< 0,001
Depresión del segmento ST	46,0 %	52,1 %	0,18
Inversión de ondas T	51,4 %	52,1 %	0,93
Historia anterior de			
Angina > 4 semanas	55,3 %	57,4 %	0,64
Infarto < 30 días	12,5 %	13,6 %	0,84
Infarto > 30 días	20,3 %	20,4 %	0,97
PTCA	16,5 %	18,4 %	0,56
CABG	3,2 %	3,7 %	0,88
Factores de riesgo			
Diabetes	8,2 %	12,5 %	0,034
Hipertensión	33,4 %	39,9 %	0,019
Fumador agudo	39,6 %	41,8 %	0,48
Medicación antes del registro			
Aspirina	97,9 %	98,1 %	1,00
Heparina i.v.	99,0 %	98,9 %	0,98
Nitratos i.v.	99,4 %	99,3 %	1,00
Bloqueadores beta	63,5 %	62,9 %	0,91

Tabla 4: Modelo de regresión de Cox multivariante de riesgos proporcionales para determinar infarto de miocardio mortal y no mortal en el intervalo de los primeros 6 meses del reconocimiento médico posterior, derivado del grupo con placebo del ensayo CAPTURE

Variable	Proporción de riesgos ajustada	IC del 95 %	Valor de p
Sexo	0,95	de 0,72 a 1,68	0,38
Edad > 65 años	1,22	de 0,65 a 1,47	0,50
Diabetes mellitus	1,22	de 0,83 a 1,49	0,61
Hipercolesterolemia	0,90	de 0,68 a 1,13	0,59
Fumador agudo	0,66	de 0,42 a 1,25	0,18
Hipertensión	1,04	de 0,91 a 1,25	0,95
Historia de una revascularización coronaria	0,86	de 0,65 a 1,19	0,72
Reducción del ST	0,96	de 0,55 a 1,42	0,81
hsCRP > 10,0 mg/l	0,95	de 0,62 a 1,57	0,88
Troponina T > 0,1 µg/l	1,76	de 0,98 a 3,46	0,084
VEGF > 300 ng/l	2,16	de 1,05 a 4,11	0,031
PIGF > 27,0 ng/l	3,58	de 1,48 a 7,72	< 0,001

5 **III. PAPP-A y combinaciones**

Se usó la significancia pronosticadora de PAPP-A en pacientes con síndromes coronarios agudos usando los datos de los pacientes con síndromes coronarios agudos que se registraron en el ensayo CAPTURE (c7E3 “Anti Platelet Therapy in Unstable Refractory angina”), y entonces se validó preliminarmente la significancia diagnóstica y pronosticadora en una gran población de pacientes que se hospitalizaron con dolores en el pecho. Los niveles séricos de PAPP-A se midieron en pacientes con síndromes coronarios agudos del ensayo CAPTURE. La incidencia de infarto de miocardio con resultado mortal o no mortal se registró durante el periodo posterior.

1. Pacientes

Construcción de conjuntos de pacientes con síndromes coronarios agudos. El estudio CAPTURE registró 1265 pacientes con síndromes coronarios agudos (61 % hombres, en la edad de 61 ± 10 años). Todos los pacientes de CAPTURE se quejaban de dolores de pecho recurrentes en estado de reposo, asociados con modificaciones de ECG durante un tratamiento con heparina intravenosa y trinitrato de glicerina. Toda la población de pacientes se sometió a una angiografía coronaria antes de la aleatorización que mostró significativamente la aparición de una clara enfermedad arterial coronaria con lesiones desencadenantes de > 70 % que eran adecuadas para una angioplastia. Se administró heparina desde antes de la aleatorización hasta al menos 1 h tras el procedimiento de PTCA. En todos los pacientes se previeron intervenciones coronarias en el intervalo de 18 a 24 horas tras el inicio del tratamiento. A los pacientes se les asignó un tratamiento mediante abciximab o placebo de manera aleatoriamente distribuida. Los puntos finales primarios del estudio eran mortalidad e infarto de miocardio no mortal durante el periodo de reconocimiento médico posterior a los 6 meses. El infarto de miocardio durante la estancia en el hospital, incluyendo el procedimiento de angioplastia, se definió mediante valores de la actividad enzimática de la CK de más del triple del límite superior de ondas Q normales en al menos dos muestras y/o nuevas ondas Q significativas en dos o más derivaciones continuas. El infarto de miocardio tras el alta médica se definió como valores de la actividad enzimática CK de más del doble del límite superior de ondas Q normales en al menos dos muestras y/o nuevas ondas Q significativas en dos o más derivaciones continuas. Ya que de otros marcadores, tales como por ejemplo troponina T (TnT) y ligando de CD40 soluble (sCD40L), se demostró que éstos interfieren con el efecto de tratamiento del antagonista del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa abciximab, el presente análisis se limitó a pacientes con placebo con muestras de sangre obtenibles (n=547; 86 % de los pacientes con placebo). Las muestras de sangre se recogieron 8,7 ± 4,9 horas tras el inicio de los síntomas.

2. Análisis bioquímico

Se almacenaron de manera central a -80 °C muestras de suero. La determinación de los marcadores cardiacos se realizó en el desconocimiento de la historia clínica de los pacientes y del tratamiento dispuesto en el laboratorio de investigación de la Universidad de Frankfurt. Los niveles séricos de PIGF y VEGF se midieron por medio de ELISA

(R&D Systems, Wiesbaden). Para la cuantificación de troponina T (TnT) cardiaca se usó un ensayo inmunológico enzimático de una sola etapa basado en la tecnología de electroquimioluminiscencia (Elecsys 2010, Roche Diagnostics). La proteína C reactiva altamente sensible (hsCRP) se midió con ayuda del nefelómetro BN II de Behring (Behring Diagnostics). Se usó un valor umbral diagnóstico de 10,0 ng/l. La interleucina-10 (IL-10) altamente sensible, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sCD40L se midieron por medio de ELISA (ambos R&D Systems, Wiesbaden, DE). Se usaron los siguientes valores umbrales, diagnósticos establecidos anteriormente: 5,0 ug/l para sCD40L, 300 ng/l para VEGF, 3,5 ng/l para IL-10. La PAPP-A cardiaca se determinó usando un ensayo inmunológico enzimático de una sola etapa basándose en la tecnología de electroquimioluminiscencia (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, DE). Con el uso de controles internos, la inexactitud total para PAPP-A durante el periodo de tiempo de 8 semanas era del 8,5 %.

3. Procedimientos estadísticos

Los pacientes se clasificaron según las concentraciones plasmáticas de PAPP-A de los quintiles. Para cada momento (24 h, 72 h, 30 días y 6 meses), se usó el modelo de regresión logística para determinar el riesgo relativo de muerte e infarto de miocardio. El efecto de las características de línea base y de otros marcadores bioquímicos sobre cada relación observada entre los niveles de PAPP-A y sucesos cardiovasculares se realizó usando el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales gradual. Todos los resultados de las variables continuas están expresados como promedios \pm desviación estándar. La comparación entre los grupos se analizó mediante una prueba de t (bidireccional). La comparación de variables categóricas se generó mediante la prueba de χ^2 de Pearson. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago).

Resumen de los resultados

Los niveles plasmáticos de PAPP-A de línea base mostraron un nivel promedio de $14,8 \pm 13,8$ mIU/l (intervalo de 0,2 a 105,4). Cuando los niveles plasmáticos de PAPP-A estaban vinculados con marcadores de riesgo convencionales, las concentraciones de PAPP-A no se correlacionaban con niveles de TnT (coeficiente de correlación de serie de Spearman $r = 0,11$; $P = 0,16$) y eran similares en pacientes con altos niveles plasmáticos de TnT y en pacientes con bajos niveles plasmáticos de TnT (figura 14). De manera similar, los niveles plasmáticos de VEGF ($r = 0,08$; $P = 0,07$) e IL-10 ($r = -0,04$; $P = 35$) no mostraban ninguna asociación con niveles plasmáticos de PAPP-A. A diferencia de esto, los niveles plasmáticos de hsCRP eran significativamente más altos en pacientes con nivel plasmático de TnT elevado. El análisis de correlación bivariante dio como resultado una correlación significativa entre PAPP-A y hsCRP así como entre PAPP-A y sCD40L, aunque los coeficientes de correlación con $r = 0,21$ para hsCRP ($P = 0,001$) y $r = 0,18$ para sCD40L ($P = 0,001$) eran bajos. Sin embargo, cuando se limitó el análisis a pacientes sin necrosis miocárdica (ningún aumento de troponina), se volvió más explícita la correlación entre hsCRP y PAPP-A, con un valor de r de 0,68 ($P = 0,001$). De manera consecuente, los pacientes con niveles de PAPP-A elevados presentaban respectivamente niveles de hsCRP y sCD40L significativamente más altos (figura 15).

Interacción entre los niveles plasmáticos de PAPP-A y el riesgo cardiaco

Los pacientes se estratificaron en quintiles según sus niveles de PAPP-A medidos: respectivamente (PAPP-A_1) $< 4,5$ mIU/l ($n = 111$), (PAPP-A_2) $4,5 - 7,5$ mIU/l ($n = 108$), (PAPP-A_3) $7,6 - 12,6$ mIU/l ($n = 109$), (PAPP-A_4) $12,7 - 24,0$ mIU/l ($n = 110$) y (PAPP-A_5) $> 24,0$ mIU/l ($n = 109$). Para el periodo inicial de 24 horas no se diferenciaron los puntos finales combinados, mortalidad e infarto de miocardio no mortal, entre los quintiles ($P = 0,69$) (figura 16). Para el seguimiento de 72 horas, incluyendo sucesos perintervencionales, las diferencias en los acontecimientos cardiacos entre los quintiles alcanzaron niveles de significancia estadística ($P = 0,019$). Durante el seguimiento de 30 días y 6 meses, las curvas de tasas de acontecimientos siguieron desviándose entre sí, lo que condujo a diferencias altamente significativas entre los quintiles tanto en el seguimiento a los 30 días ($P = 0,008$) como a los 6 meses ($P = 0,004$). Para los datos de seguimiento de 6 meses, el análisis post hoc de los quintiles de PAPP-A usando un modelo de regresión logística dio como resultado que sólo los dos quintiles de PAPP-A superiores (4º quintil: $P = 0,034$; 5º quintil: $P = 0,002$) se diferenciaron significativamente del primer quintil PAPP-A que sirvió como referencia. Acorde con estos resultados, el análisis de curvas de características operativas del receptor verificaron un valor umbral de 12,6 mIU/l de PAPP-A para el valor predictivo maximizado (figura 17).

Estratificación según el estado de PAPP-A

Basándose en los resultados mencionados anteriormente se dicotomizó la población de estudio según el valor umbral calculado de 12,6 mIU/l, lo que condujo a 219 pacientes con niveles de PAPP-A elevados (40,0 %). Además de los niveles más altos de respectivamente hsCRP y sCD40L en pacientes con niveles plasmáticos de PAPP-A elevados, las características de línea base en pacientes con niveles plasmáticos de PAPP-A elevados no se diferenciaban significativamente de pacientes con niveles plasmáticos de PAPP-A bajos (tabla 5). Las proporciones de Odds para muerte e infarto de miocardio (de manera ajustada a las diferencias en las características de línea base) eran 1,15 (IC del 95 % 0,36-3,67; $P = 1,00$) a las 24 h, 2,96 (IC del 95 % 1,55-5,64; $P = 0,002$) a las 72 h (figura 18a), 2,84 (IC del 95 % 1,55-5,22; $P = 0,001$) a los 30 días y 2,64 (IC del 95 % 1,55-4,50; $P = 0,001$) a los 6 meses (figura 18b). Las tasas de acontecimientos acumulativas de seis meses en pacientes con niveles de PAPP-A bajos eran de un 7,9 % frente a un 17,4 % para pacientes con niveles de PAPP-A altos. Esta diferencia en las tasas

de acontecimientos se originó no sólo mediante una tasa más alta de infarto de miocardio no mortal, sino también mediante una mortalidad más alta en pacientes con nivel plasmático de PAPP-A reducido (un 3,2 % frente a un 1,2 %; $P = 0,098$). De manera concordante, los procedimientos de revascularización urgentes, incluyendo intervención coronaria percutánea y trasplante de bypass arterial coronario, eran significativamente más altos en pacientes con nivel plasmático de PAPP-A elevado (un 13,6 % frente a un 7,9 %; $P = 0,012$). Los procedimientos de revascularización no urgentes durante los 6 meses del seguimiento posterior mostraron una aparición superior en pacientes con niveles plasmáticos de PAPP-A altos en comparación con pacientes con niveles plasmáticos de PAPP-A bajos (un 34,4 % frente a un 19,7 %; $P = 0,005$).

Consideraciones de marcadores múltiples

Los inventores midieron simultáneamente marcadores de necrosis miocárdica (TnT), isquemia (VEGF), inflamación (hsCRP, PAPP-A), actividad anti-inflamatoria (IL-10) y activación plaquetaria (sCD40L). De manera extraordinaria, el valor predictivo de PAPP-A está limitado a pacientes con niveles de hsCRP elevados (figura 19a). Cuando el nivel plasmático de hsCRP era elevado (por encima de 10 mg/l), los pacientes con un nivel plasmático de PAPP-A por encima del valor umbral calculado de 12,6 mIU/l mostraban un riesgo cardiaco elevado de muerte e infarto de miocardio no mortal (proporción de Odds ajustada 2,61 [1,25-5,62]; $P = 0,007$) (figura 19a). A diferencia de esto, para pacientes con valores de hsCRP por debajo de 10 mg/l, PAPP-A no sirvió como un predictor significativo para el riesgo cardiovascular ($P = 0,073$). Además, el valor predictivo de PAPP-A está estrechamente relacionado con el nivel plasmático de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (figura 19b). Cuando los niveles plasmáticos de IL-10 estaban por encima del valor umbral calculado de 3,5 ng/l, los pacientes con niveles plasmáticos de PAPP-A elevados (por encima de 12,6 mIU/l) estaban protegidos de un riesgo cardiaco elevado (proporción de Odds ajustada 1,40 [0,60 - 3,23]; $P < 0,001$) (figura 19b). Sin embargo para pacientes con nivel plasmático de IL-10 bajo, los valores de PAPP-A por encima de 12,6 mIU/l identificaban un subgrupo de pacientes que padecían un riesgo cardiovascular especialmente alto (proporción de Odds ajustada 3,52 [1,71 - 7,23]; $P 0,001$). Tomados juntos estos datos muestran que el valor predictivo de niveles plasmáticos de PAPP-A se modula de manera importante mediante el equilibrio entre niveles plasmáticos de citocina pro-inflamatoria y anti-inflamatoria. De manera importante, el valor predictivo de PAPP-A era evidente también en pacientes sin indicios de necrosis miocárdica. Los pacientes negativos para TnT (valor umbral 0,1 ug/l) con niveles de PAPP-A elevados estaban en riesgo significativamente superior en comparación con pacientes negativos para TnT con niveles de PAPP-A bajos (proporción de Odds ajustada 2,72 [1,25 - 5,89]; $P = 0,009$) (figura 20a). A diferencia de esto, los pacientes positivos para TnT padecían un riesgo cardiovascular elevado que es independiente de los niveles plasmáticos de PAPP-A. El valor predictivo de PAPP-A se observó también para un valor umbral reducido de 0,01 ug/l para TnT (proporción de Odds ajustada 3,97 [1,24 - 12,68]; $P = 0,016$). En pacientes que eran negativos tanto para TnT como sCD40L, PAPP-A identificó un subgrupo que padecía un riesgo cardiovascular elevado durante 6 meses de seguimiento posterior (figura 20b). Para deducir además una significancia potencialmente independiente pronosticadora de marcadores bioquímicos individuales, se realizó un análisis de regresión logística multivariante gradual que incluía los marcadores bioquímicos TnT, VEGF, hsCRP, PAPP-A, IL-10 y sCD40L así como características de línea base, que dio como resultado un valor predictivo significativo en un modelo univariante. Para los puntos finales, muerte e infarto de miocardio no mortal en el seguimiento posterior de 30 días y de 6 meses, ninguno de los factores de riesgo establecidos era un predictor independiente, después de introducir los marcadores bioquímicos dicotomizados TnT, hsCRP y sCD40L en el modelo (tabla 6). Por tanto, el análisis multivariante gradual se limitó a marcadores bioquímicos. TnT ($P = 0,008$) y PAPP-A ($P = 0,007$) seguían siendo predictores significativos independientes del resultado del paciente, mientras que hsCRP perdió la significancia, después de introducir PAPP-A en el modelo ($P = 0,003$ sin PAPP-A; $P = 0,16$ tras la introducción de PAPP-A) (tabla 7; etapa I). PAPP-A seguía siendo un predictor significativo del resultado del paciente tras el registro de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (tabla 7; etapa II; $P = 0,006$) y tras el registro de sCD40L como un marcador de la activación plaquetaria (tabla 7; etapa III; $P = 0,015$). Tras el registro de VEGF como marcador de la isquemia miocárdica, TnT perdió su valor predictivo para determinar el resultado a los 6 meses (tabla 7; etapa IV; $P = 0,24$ tras el registro de VEGF frente a $P = 0,16$ antes del registro de VEGF), mientras que PAPP-A seguía siendo un predictor independiente significativo ($P = 0,014$).

La determinación simultánea de biomarcadores con distintos perfiles fisiopatológicos mejora drásticamente la estratificación de riesgos en pacientes con ACS. Ya que los niveles de PAPP-A, PIGF y sCD40L son relativamente estables y no son necesarias condiciones de muestras específicas para PAPP-A, PIGF y sCD40L, estos marcadores parecen adecuados para el uso clínico rutinario. Aunque quedan limitaciones inherentes para marcadores que no son específicos para las arterias coronarias y/o el miocardio, PAPP-A, PIGF y sCD40L pueden representar una herramienta importante para la estratificación diagnóstica y terapéutica de pacientes con ACS sin indicios de necrosis miocárdica.

Tabla 5: Características de línea base según el estado de PAPP-A

	PAPP-A baja	PAPP-A alta	Valor de p
n	328	219	
Hombres	70,2 %	71,9 %	0,62
Edad	60,5 ± 11	62,2 ± 10,4	0,39
Troponina T ≥ 0,1 µg/l	36,4 %	39,2 %	0,23
VEGF > 300 ng/l	50,8 %	54,3 %	0,43
CRP ≥ 10,0 µg/l	37,3 %	56,2 %	< 0,001
IL-10 < 3,5 ng/l	57,3 %	53,4 %	0,38
sCD40L > 5,0 µg/l	33,4 %	51,4 %	< 0,001
Depresión del segmento ST	45,1 %	53,6 %	0,062
inversión de ondas T	51,7 %	51,7 %	1,00
Historia anterior de			
Angina > 4 semanas	55,5 %	56,3 %	0,64
Infarto < 30 días	13,3 %	12,5 %	0,89
Infarto > 30 días	20,3 %	20,6 %	0,90
PTCA	17,6 %	17,4 %	0,75
CABG	3,4 %	3,5 %	0,98
Factores de riesgo			
Diabetes	9,5 %	10,7 %	0,97
Hipertensión	34,6 %	37,4 %	0,64
Fumador agudo	40,9 %	42,6 %	0,41
Medicación antes del registro			
Aspirina	98,1 %	97,8 %	1,00
Heparina i.v.	99,0 %	98,8 %	1,00
Nitratos i.v.	99,5 %	99,2 %	1,00
Bloqueadores beta	63,5 %	62,9 %	0,94

Tabla 6: Modelo de regresión de Cox multivariante de riesgos proporcionales para determinar infarto de miocardio mortal y no mortal en el intervalo de los primeros 6 meses del reconocimiento médico posterior

Variable	Proporción de riesgos ajustada	IC del 95 %	Valor de p
Sexo	0,91	de 0,68 a 1,39	0,16
Edad > 65 años	1,36	de 0,91 a 1,82	0,34
Diabetes mellitus	1,22	de 0,83 a 1,49	0,61
Hipercolesterolemia	0,90	de 0,68 a 1,13	0,59
Hipertensión	1,00	de 0,89 a 1,04	1,00

(continuación)

Variable	Proporción de riesgos ajustada	IC del 95 %	Valor de p
Historia de una revascularización coronaria	0,86	de 0,65 a 1,19	0,72
Reducción del ST	1,29	de 0,72 a 2,31	0,39
Troponina T > 0,1 µg/l	2,23	de 1,25 a 3,98	0,007
hsCRP > 10,0 mg/l	2,03	de 1,11 a 3,59	0,018
PAPP-A > 12,6 mIU/l	2,33	de 1,30 a 4,17	0,005

Tabla 7: Ensayos de múltiples marcadores – modelo de regresión logística/multivariante gradual para determinar infarto de miocardio mortal y no mortal en el intervalo de los primeros 6 meses del reconocimiento médico posterior

Etapa I						
Variable	Coeficiente de regresión B	EE	Wald	Valor de P	Exp(B)	IC del 95 %
CRP	0,38	0,28	1,82	0,16	1,49	de 0,86 a 2,59
TnT	0,72	0,27	6,88	0,008	2,07	de 1,21 a 3,56
PAPP-A	0,83	0,27	9,01	0,007	2,13	de 1,24 a 3,68
Etapa II						
Variable	Coeficiente de regresión B	EE	Wald	Valor de P	Exp(B)	IC del 95 %
CRP	0,20	0,29	0,46	0,50	1,44	de 0,67 a 2,17
TnT	0,75	0,27	7,44	0,006	2,13	de 1,24 a 3,69
PAPP-A	0,78	0,28	7,70	0,006	2,18	de 1,25 a 3,78
IL-10	- 0,76	0,29	6,99	0,008	0,47	de 0,26 a 0,82
Etapa III						
Variable	Coeficiente de regresión B	EE	Wald	Valor de P	Exp(B)	IC del 95 %
CRP	0,20	0,30	0,47	0,49	1,23	de 0,68 a 2,19
TnT	0,66	0,28	5,51	0,019	1,93	de 1,12 a 3,35
PAPP-A	0,70	0,29	5,60	0,015	2,05	de 1,18 a 3,32
IL-10	- 0,86	0,28	9,29	0,002	0,42	de 0,24 a 0,74
SCD40L	0,90	0,30	9,61	0,002	2,45	de 1,39 a 4,32
Etapa IV						
Variable	Coeficiente de regresión B	EE	Wald	Valor de P	Exp(B)	IC del 95 %
TnT	0,36	0,31	1,38	0,24	1,43	de 0,79 a 2,60
PAPP-A	0,69	0,29	5,85	0,014	2,01	de 1,14 a 3,49
IL-10	- 0,84	0,28	8,66	0,003	0,43	de 0,25 a 0,76
SCD40L	0,86	0,29	8,76	0,003	2,37	de 1,34 a 4,18
VEGF	0,78	0,33	5,63	0,018	2,29	de 1,14 a 4,18

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para el análisis de muestras para el diagnóstico y/o el pronóstico de enfermedades cardiovasculares agudas, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 5 a) facilitar una muestra biológica que va a someterse a ensayo, seleccionada del grupo constituido por sangre periférica o fracciones de la misma y suspensiones de cultivo celular o fracciones de las mismas, de un sujeto;
 - b) determinar la concentración de los marcadores PAPP-A e IL-10 en la muestra,
 - c) dado el caso, determinar la concentración en la muestra al menos de otro marcador seleccionado de ligando CD40 soluble (sCD40L), PIGF, troponina T (TnT), MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP y otros marcadores inflamatorios, particularmente CRP, hsCRP, y
 - 10 d) comparar el/los resultado/s obtenido/s para la muestra que va a someterse a ensayo con valores de referencia y/o los valores de muestras de referencia,
- en el que con un valor umbral por debajo de 3,5 ng/l de IL-10, valores de PAPP-A por encima de 12,6 mIU/l indican un riesgo cardiovascular especialmente alto.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra que va a someterse a ensayo y/o la muestra de referencia proceden de un ser humano.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la muestra que va a someterse a ensayo es plasma sanguíneo o suero sanguíneo, añadiéndose a la sangre periférica dado el caso un anticoagulante, particularmente heparina.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la determinación de la concentración se realiza por medio de un procedimiento inmunológico por medio de moléculas que se unen a los marcadores, en el que las moléculas que se unen a los marcadores se seleccionan preferentemente del grupo constituido por anticuerpos anti-marcadores o partes o fragmentos de los mismos y receptores de marcadores o partes de los mismos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que los marcadores y/o las moléculas que se unen a los marcadores se encuentran en disolución o inmovilizados en una matriz.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, en el que las moléculas que se unen a los marcadores se detectan con un anticuerpo, en el que están acopladas una o varias moléculas de detección.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 6, en el que los procedimientos inmunológicos se seleccionan del grupo constituido por ensayo inmunológico enzimático de tipo sándwich, ELISA y ensayos inmunológicos en fase sólida.
- 30 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las enfermedades cardiovasculares se seleccionan del grupo constituido por angina inestable, infarto de miocardio, síndrome cardíaco agudo, enfermedad arterial coronaria e insuficiencia cardíaca.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el valor umbral de los resultados obtenidos para la muestra que va a someterse a ensayo se encuentra en 10,0 µg/l de hsCRP en suero o plasma.
- 35 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente una monitorización de la terapia de las enfermedades cardiovasculares agudas, particularmente:
- a) en el que la terapia comprende la administración de estatinas, y/o inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/III,
 - 40 b) en el que la terapia comprende la administración de un agente anti-inflamatorio y un tratamiento quirúrgico, particularmente una dilatación con balón, o
 - c) para distinguir entre pacientes que reaccionan o no reaccionan a una terapia con abciximab.

Fig. 1

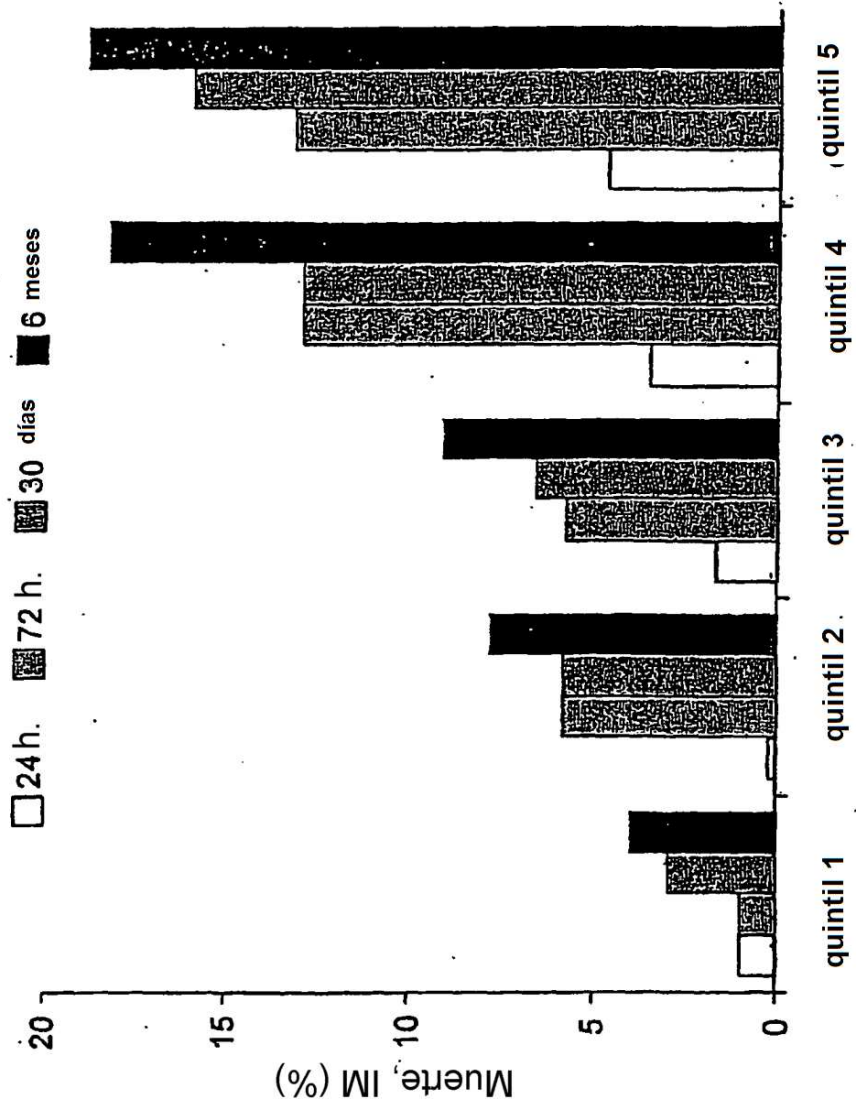


Fig. 2a

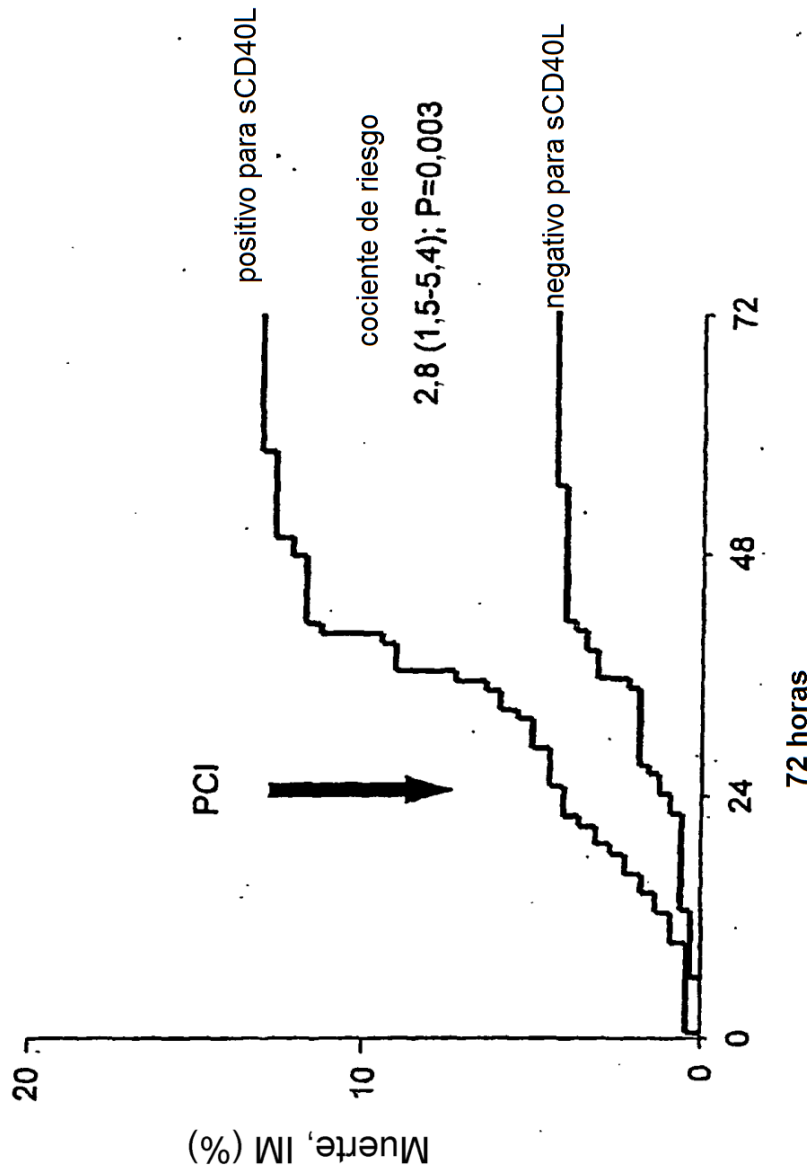


Fig. 2b

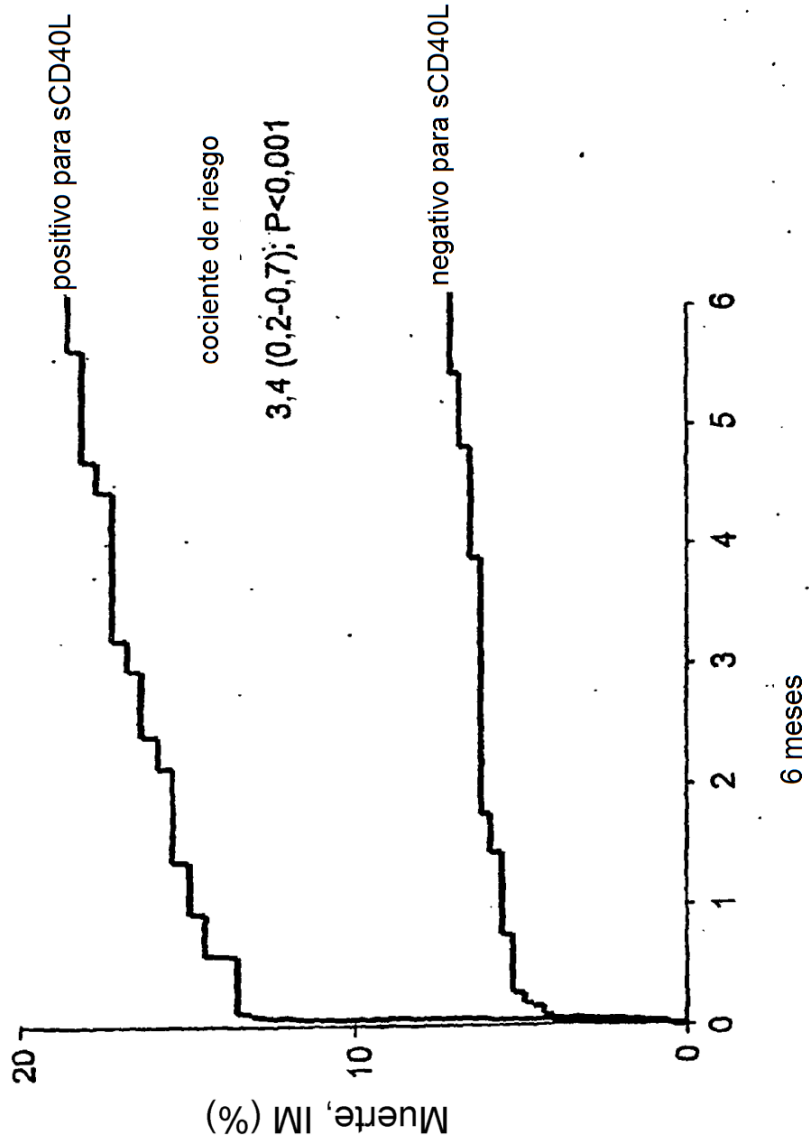


Fig. 3

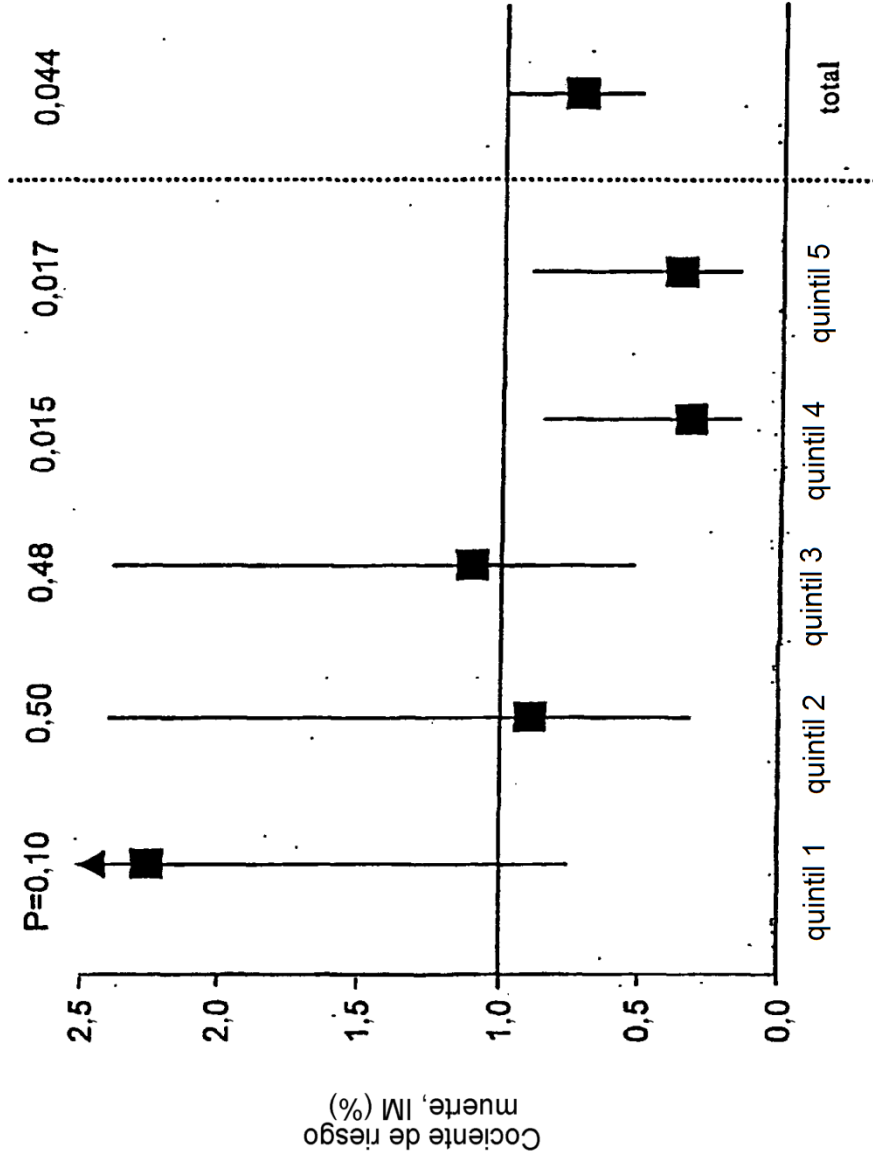


Fig. 4a

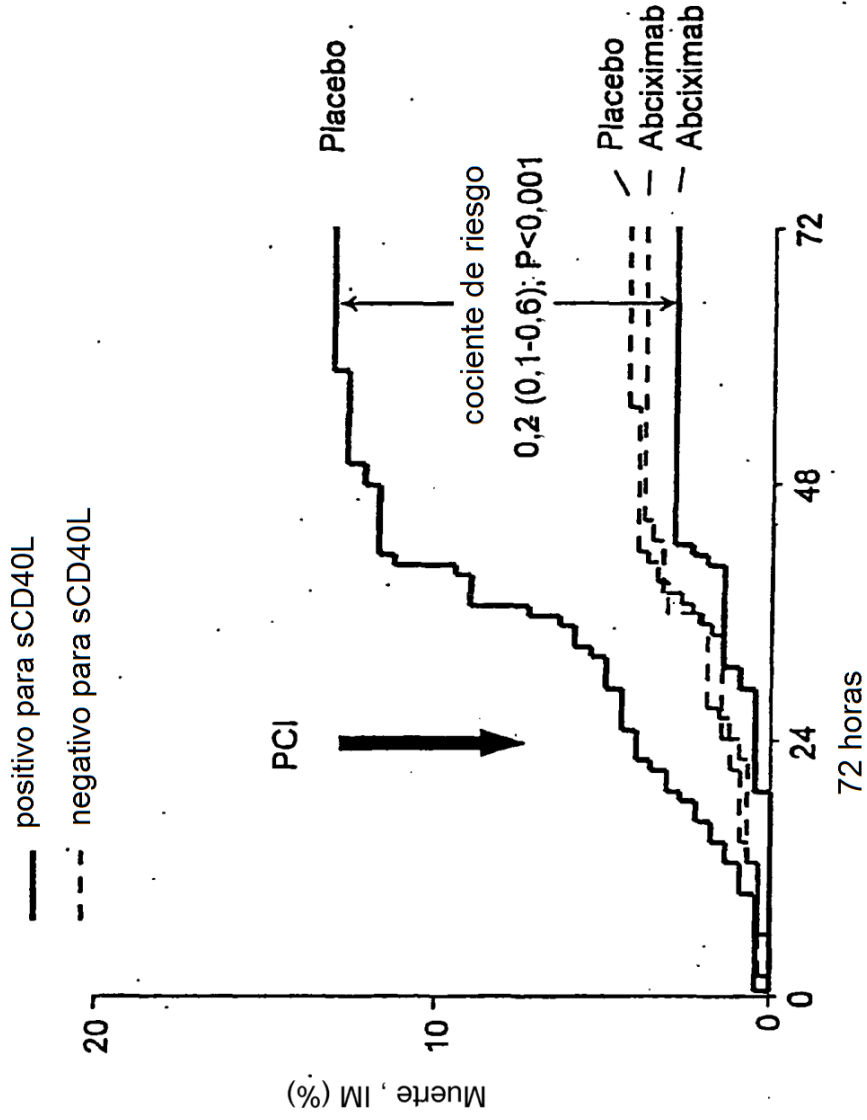


Fig. 4b

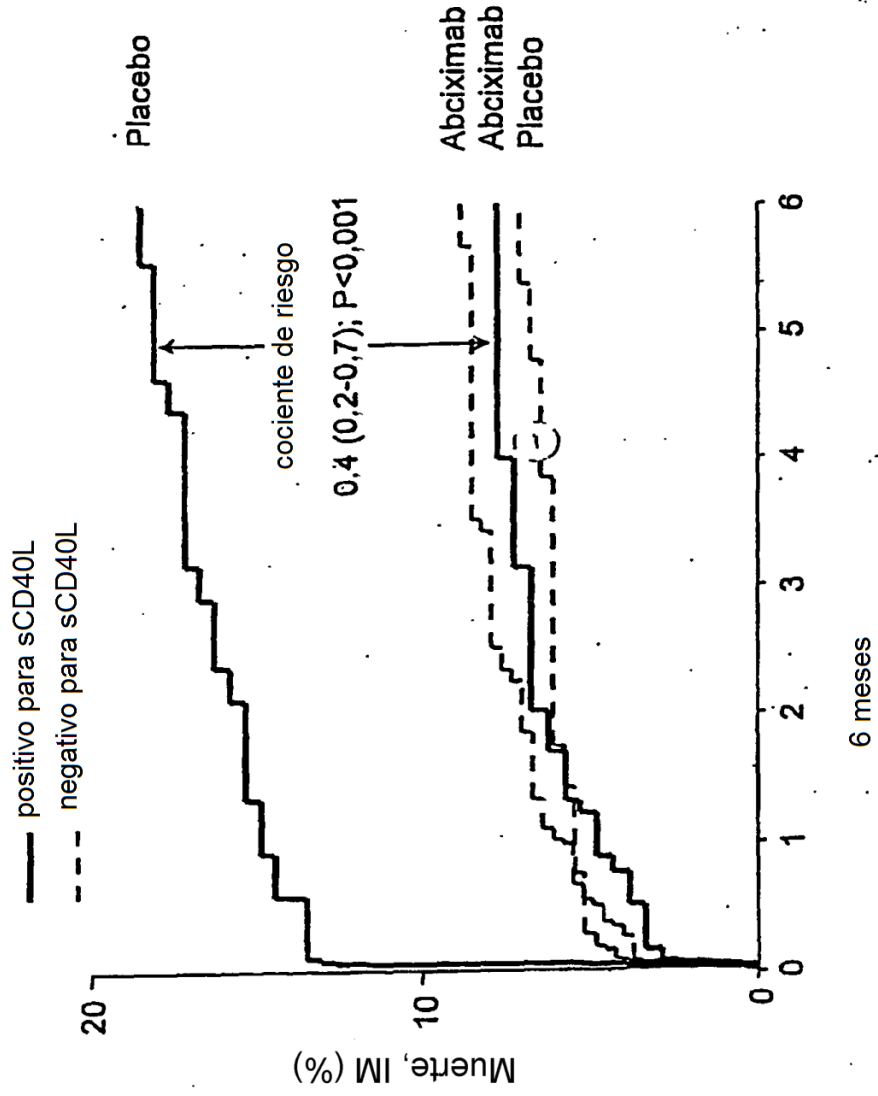


Fig. 5

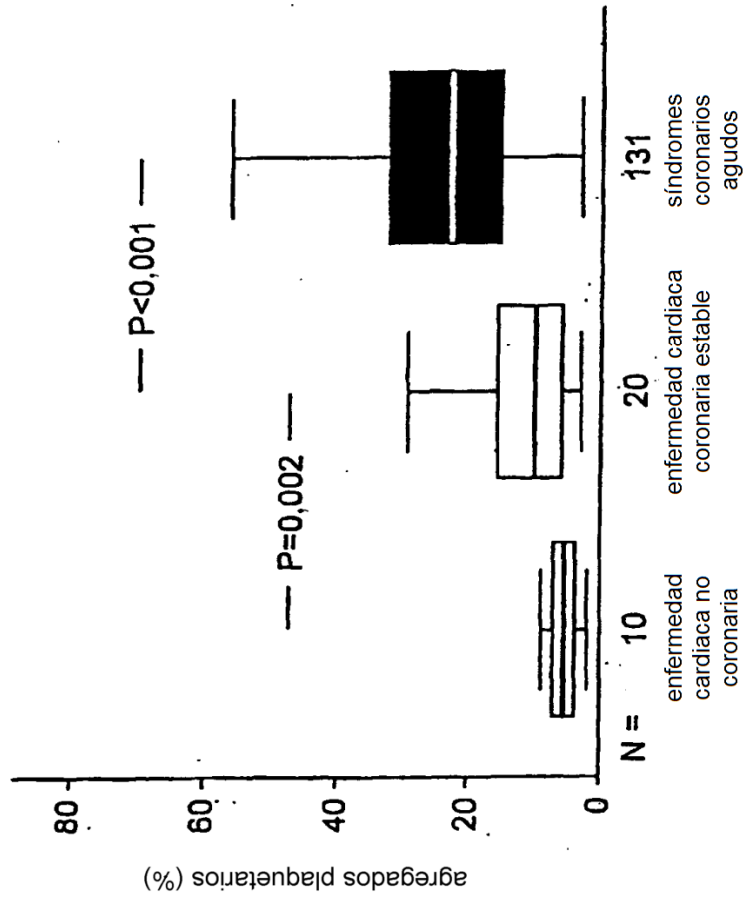


Fig. 6

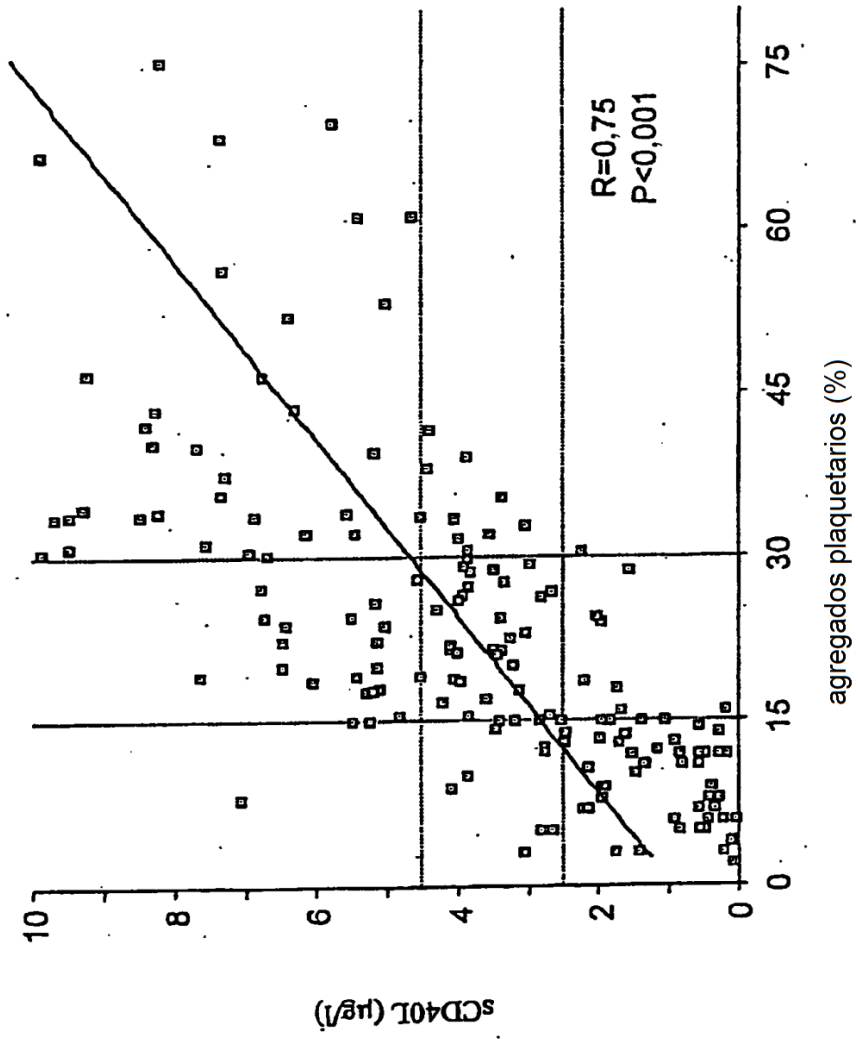


Fig. 7

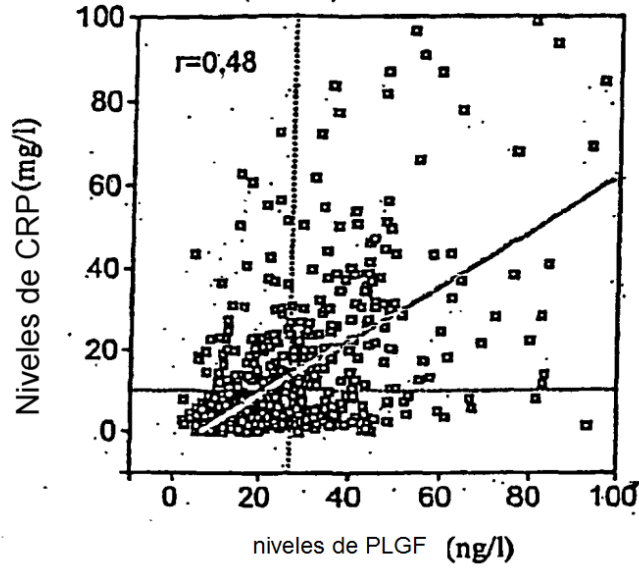


Fig. 8

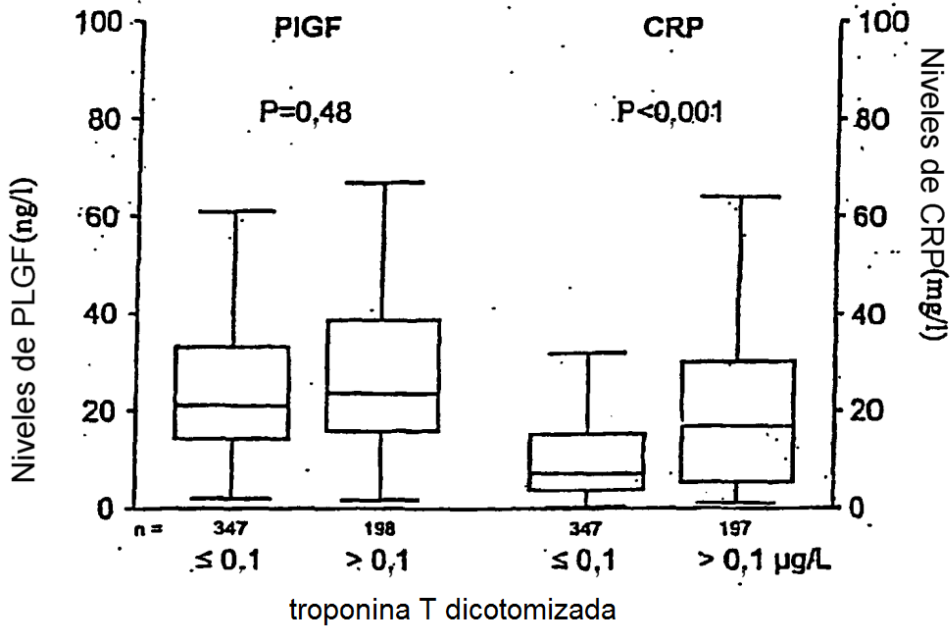


Fig. 9

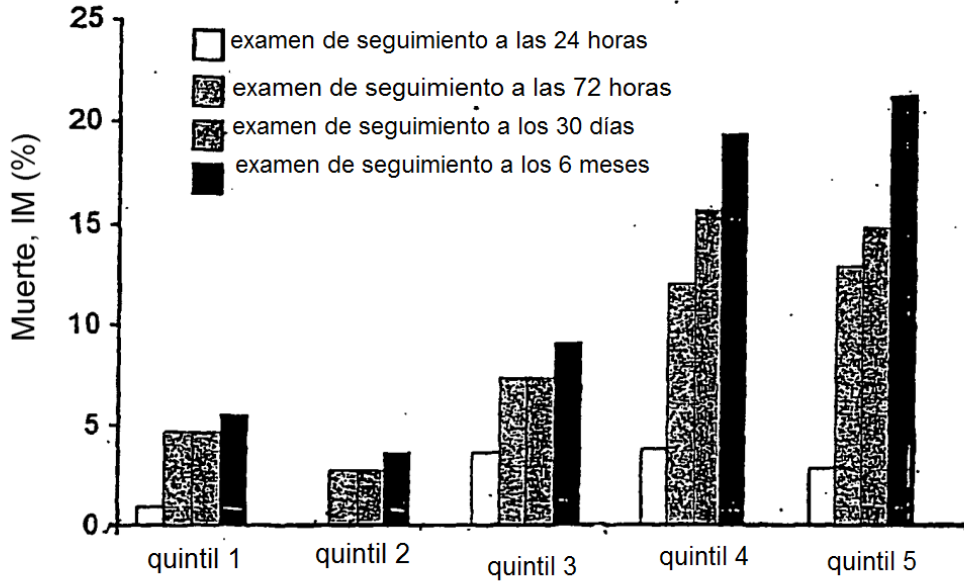


Fig. 10

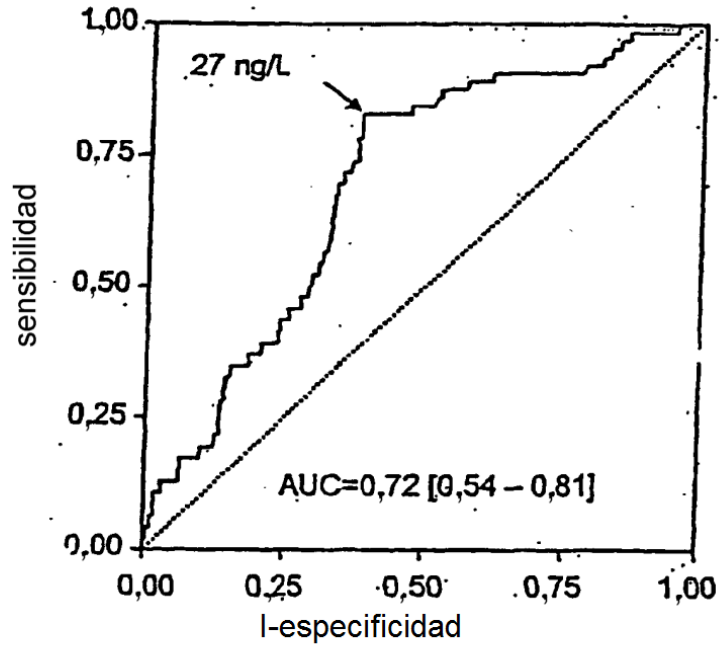


Fig. 11a

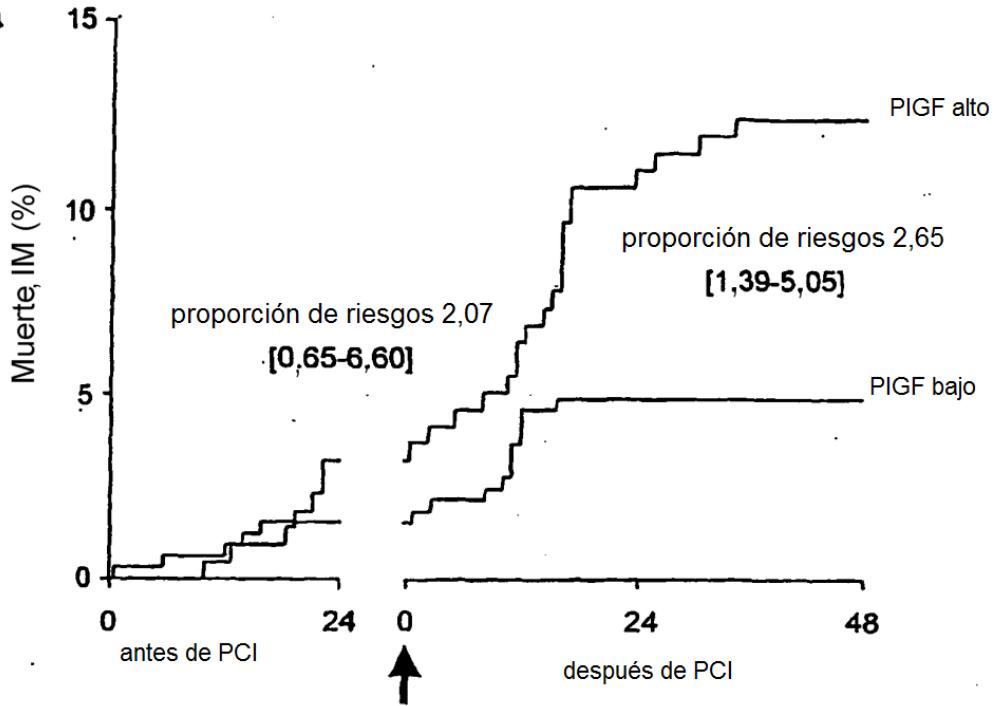


Fig. 11b

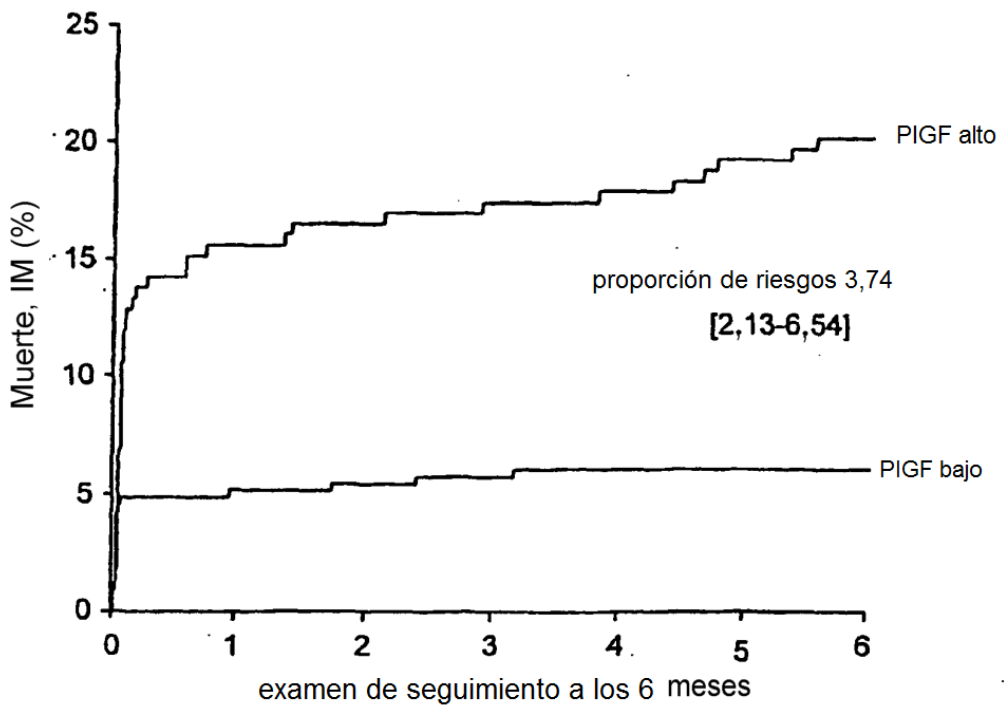
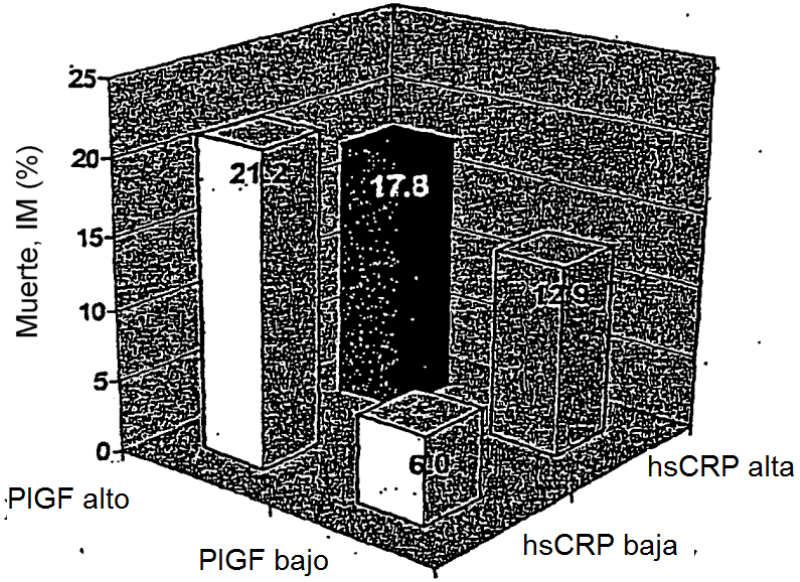
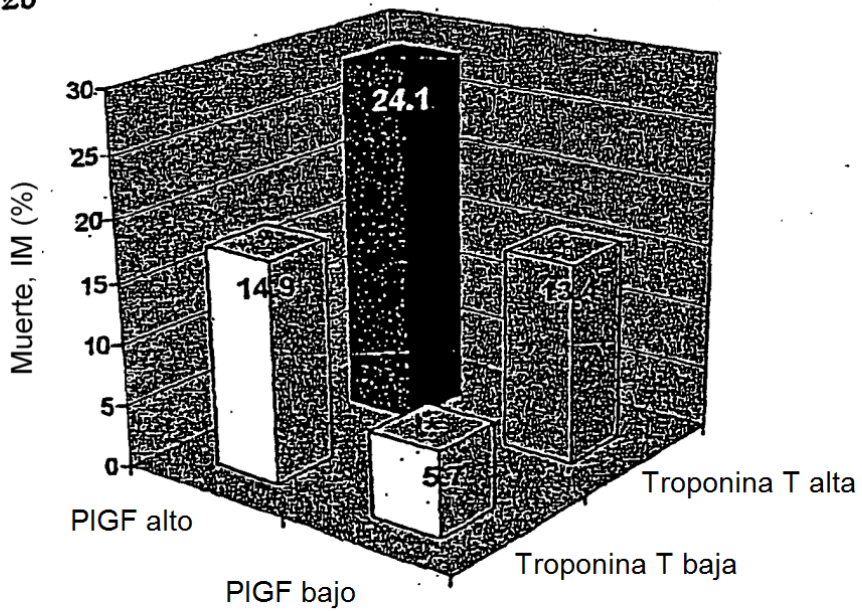


Fig. 12a



*p < 0,001 frente a PIGF bajo

Fig. 12b



*p < 0,01 frente a PIGF bajo

Fig. 13

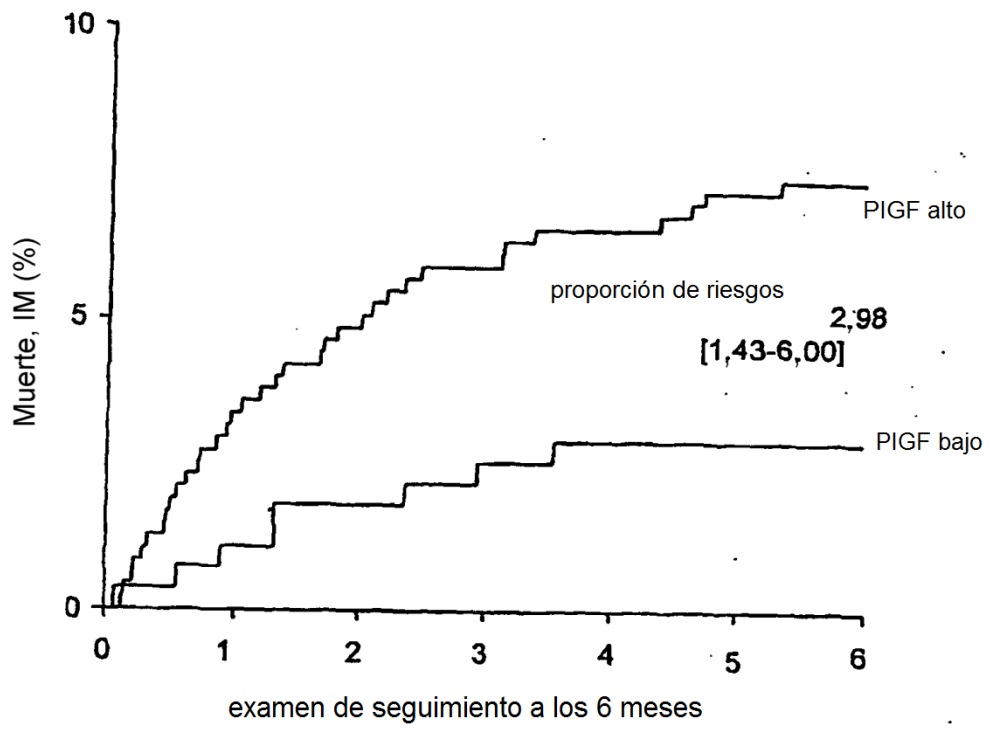


Figura 14

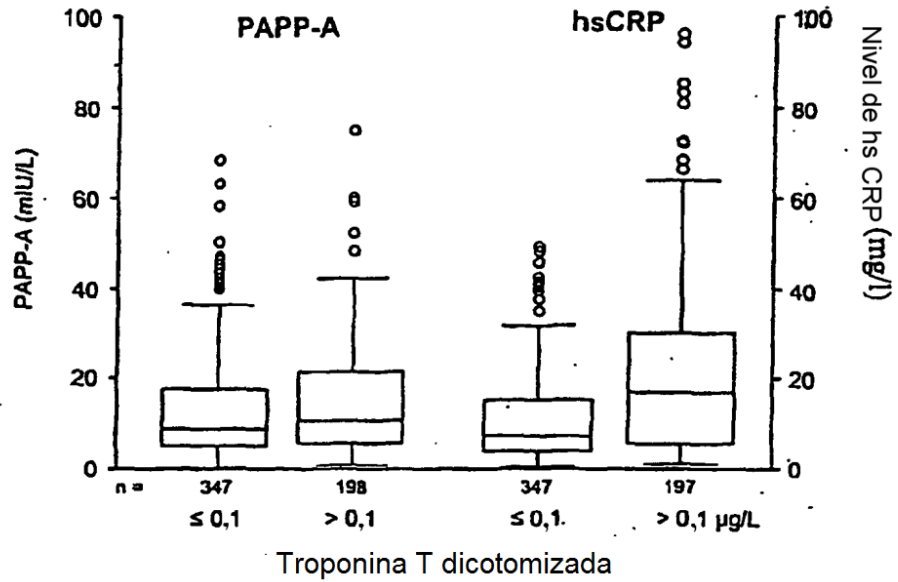


Figura 15

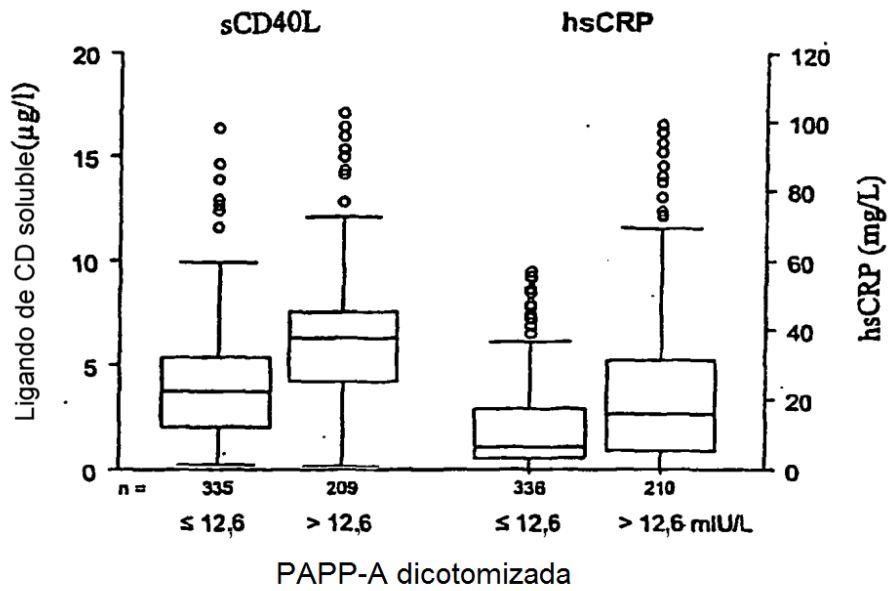


Figura 16

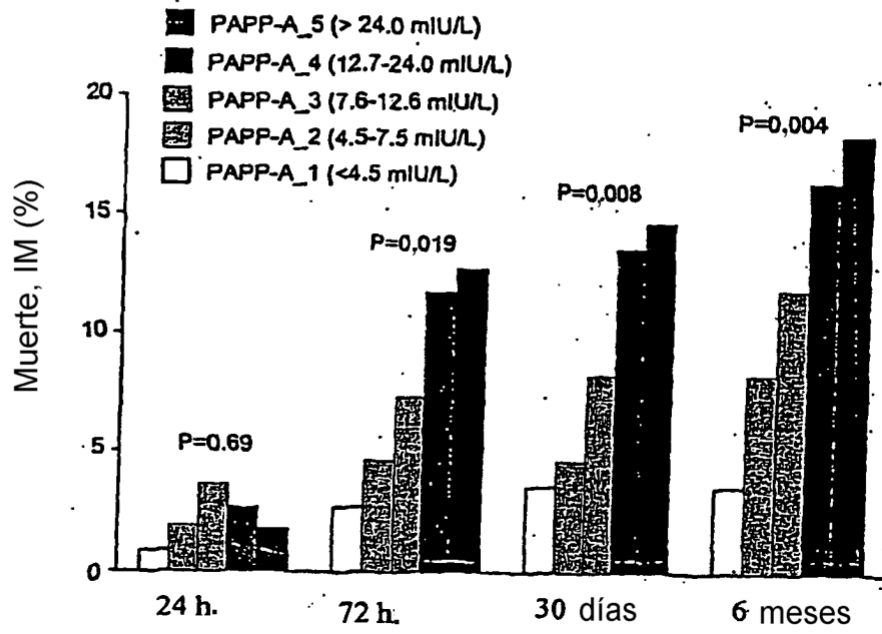


Figura 17

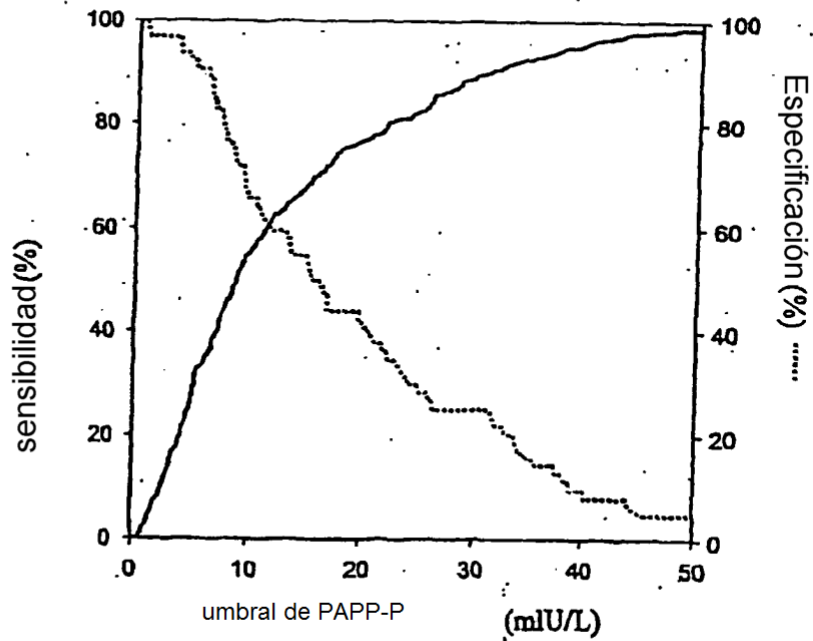


Figura 18a

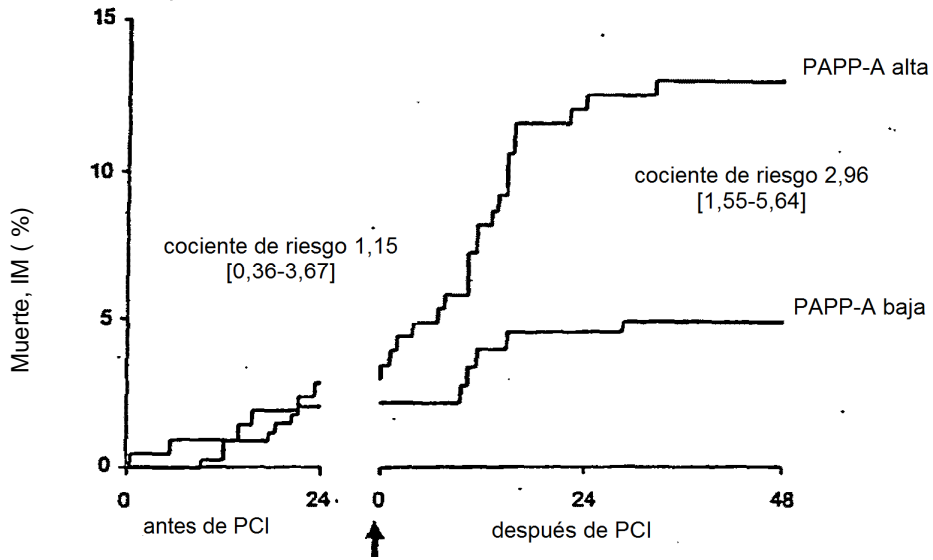


Figura 18b

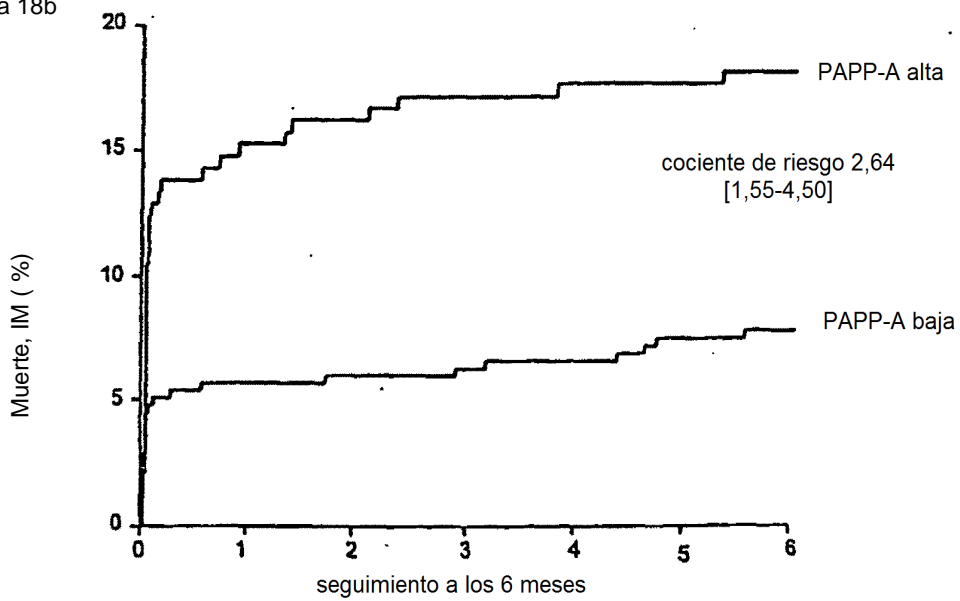


Figura 19a

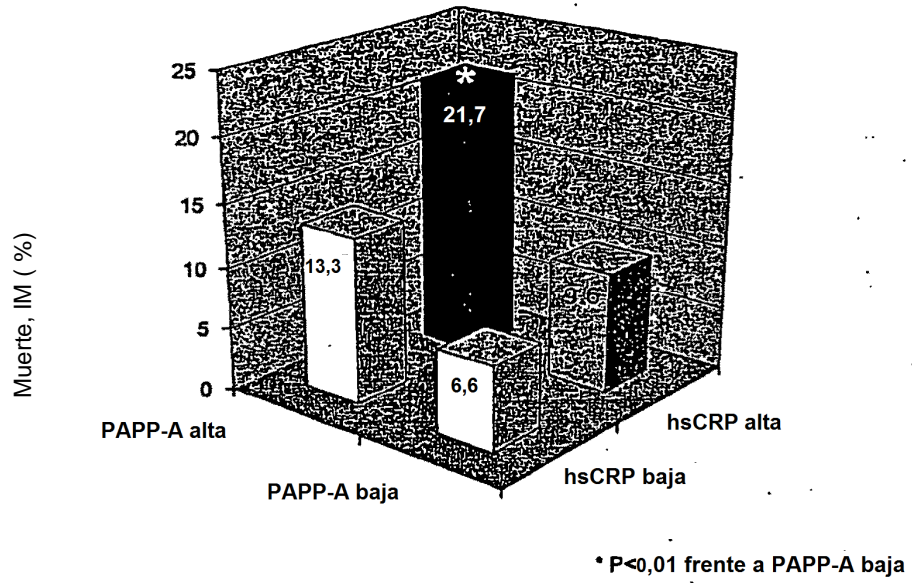


Figura 19b

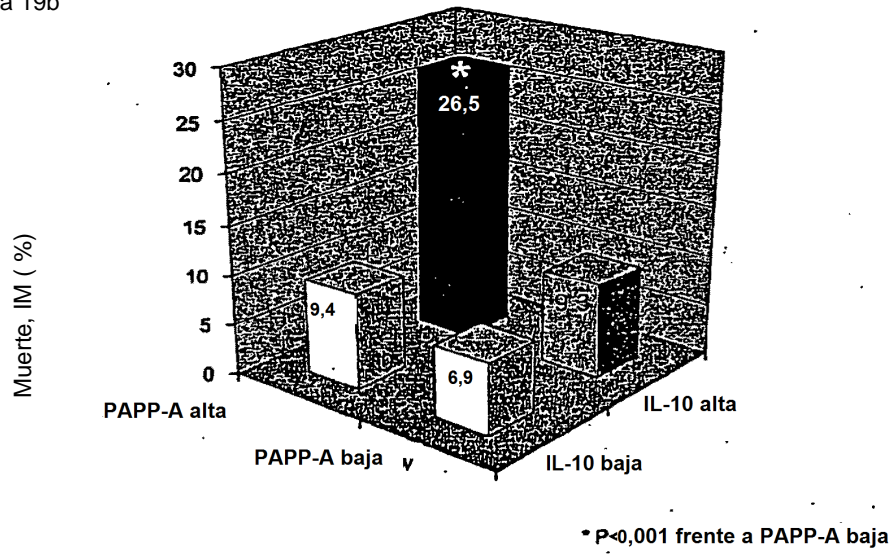


Figura 20A

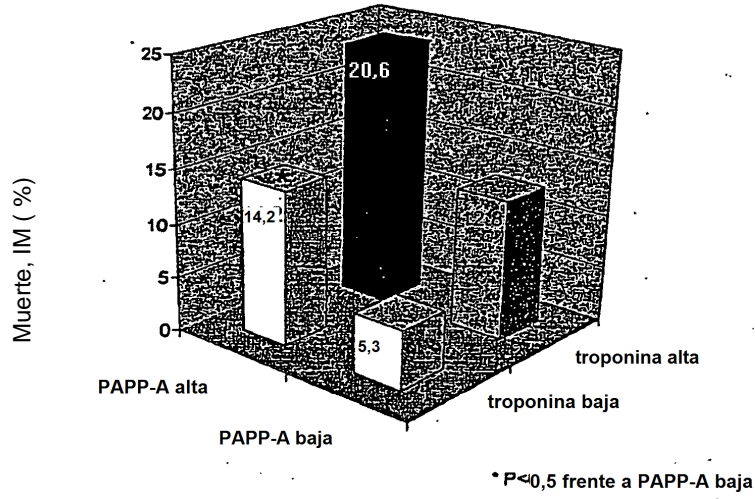


Figura 20b

