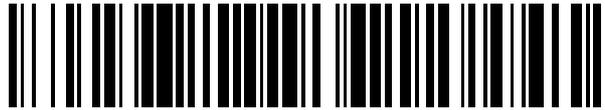


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 726**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/44

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2005 E 05766051 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1769083**

54 Título: **La fosfolipasa A2 (sPLA2) secretora como marcador pronóstico y diagnóstico para enfermedades cardiovasculares**

30 Prioridad:

16.07.2004 EP 04291825

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2013

73 Titular/es:

**I.N.S.E.R.M. INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (33.3%)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CEDEX 13, FR;
L'ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE
PARIS (33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MALLAT, ZIAD;
TEDGUI, ALAIN;
STEG, PHILIPPE GABRIEL;
FREYSSINET, JEAN-MARIE y
BENESSIANO, JOELLE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 399 726 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

La fosfolipasa A2 (sPLA2) secretora como marcador pronóstico y diagnóstico para enfermedades cardiovasculares

5

La presente invención se refiere a un nuevo marcador que se pueda usar para el pronóstico y el diagnóstico de trastornos cardiovasculares.

10

Las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, lo que hace la prevención de esas afecciones una preocupación importante de la salud pública. Una de los pasos hacia la prevención de estos trastornos es la detección de individuos con riesgo. Así, varios marcadores de riesgo bioquímicos, tales como los niveles de colesterol HDL, están actualmente en uso para la detección de pacientes con riesgo para las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, hasta hoy, numerosos trastornos cardiovasculares pueden ocurrir en individuos que no se consideran con riesgo en relación a los marcadores. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos marcadores bioquímicos para obtener una predicción más exacta de los eventos cardiovasculares. El nivel plasmático de sPLA2 es uno de los marcadores de riesgo potencial que se investigan actualmente.

15

20

Las enzimas fosfolipasas A2 (PLA2) hidrolizan los fosfolípidos en la posición sn-2 para generar lisofosfolípidos y ácidos grasos (Dennis J Biol Chem. (1994) 269:13057-13060). Una de las PLA2 más ampliamente estudiadas es una PLA2 (sPLA2) secretora del grupo IIa de bajo peso molecular (14 kDa), que se ha demostrado que se expresa en las arterias normales y las placas ateroscleróticas (Elinder y otros, Arterioscler Thromb Vasc Biol.(1997) 17:2257-63). Diversos datos sugieren un papel potencialmente importante para las sPLA2 tanto en el desarrollo y las complicaciones de la aterosclerosis. La liberación de ácido araquidónico por las sPLA2 es un evento de velocidad limitante en la generación de derivados de la oxidación, que incluyen prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. La sPLA2 está implicada en la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad (LDL) por la lipoxigenasa (Mangin y otros, Circ Res. (1993) 72:161-6) y en la liberación de fosfolípidos oxidados biológicamente activos a partir de partículas tanto de LDL y HDL (Leitinger y otros, Arterioscler Thromb Vasc Biol. (1999) 19:1291-8), lo que sugiere un papel directo en la aterogénesis.

25

30

Así, varios estudios clínicos han tenido como objetivo determinar el valor predictivo del nivel plasmático de la sPLA2 en relación a varios trastornos cardiovasculares. Por consiguiente, se considera que el nivel plasmático de sPLA2 es elevado en pacientes con enfermedad arterio coronaria y predice los eventos coronarios en pacientes estables (Kugiyama y otros, Circulation. (1999) 100:1280-4). Además, el aumento del nivel plasmático de sPLA2 en pacientes estables sometidos a angioplastia coronaria percutánea además proporciona información de pronóstico independiente sobre otras variables biológicas y clínicas clásicas (Liu y otros, Eur Heart J. (2003) 24:1824-32). Además, los estudios de evaluación del valor pronóstico de sPLA2 en pacientes con ACS (síndrome coronario agudo), limitado a un pequeño estudio de pacientes con angina inestable, mostraron que el aumento de los niveles plasmáticos de sPLA2 predice la recurrencia de los eventos coronarios, principalmente los procedimientos de revascularización, independientemente de otros factores de riesgo (Kugiyama y otros, Am J Cardiol. (2000) 86:718-22).

35

40

Otro estudio mide la actividad de la PLA2 y la lisolecitina de suero en pacientes después de un infarto de miocardio en comparación con los pacientes que sufren de angina inestable (Langton y Jarnicki (1992) Clin. Chim. Acta 205: 223-231). Finalmente, Schaefer y otros, (J. Clin. Chem. Clin. Biochem (1990) 28: 253-254) investiga si la elevada actividad de sPLA en pacientes de cuidados intensivos, independientemente del diagnóstico o la gravedad de la enfermedad, se puede usar para predecir la letalidad

45

Sin embargo, estos estudios son muy debatidos, ya que se han llevado a cabo en un número demasiado pequeño de pacientes para que se considere estadísticamente significativo. Claramente, estudios recientes realizados en un mayor número de pacientes indican que no existe una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de sPLA2 y la predicción de la mortalidad o los eventos cardiovasculares.

50

Por consiguiente, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un nuevo método de pronóstico y/o diagnóstico de enfermedades cardiovasculares, más fiable que los de la materia anterior.

55

Otro objetivo de la invención es proporcionar un nuevo método de pronóstico y/o diagnóstico de enfermedades cardiovasculares que pueda ser relevante para las personas aparentemente sanas.

Así, la presente invención se refiere a un método para determinar un aumento del riesgo de mortalidad o de infarto de miocardio en un paciente de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

60

- determinar la actividad de la sPLA2 de dicho paciente,
- comparar dicha actividad con un valor predeterminado,

una mayor actividad de la sPLA2 de dicho paciente, en comparación con dicho valor predeterminado es indicativo de un aumento del riesgo de mortalidad o de infarto de miocardio.

Por "aumento del riesgo" se entiende que un paciente para quien la actividad de la sPLA2 es mayor que el valor predeterminado es más probable que fallezca o que esté afectado con un evento cardiaco y/o evento vascular que un individuo para el cual la actividad de la sPLA2 está por debajo de dicho valor predeterminado.

5 De acuerdo con la solicitud, los siguientes eventos se consideran particularmente como que son eventos cardiacos y/o vasculares: infarto de miocardio (MI), accidente cerebro vascular, hospitalización debido a enfermedades cardiacas y/o vasculares, y procedimientos de revascularización.

10 La medida de la actividad de la sPLA2 se puede realizar por un ensayo fluorimétrico de acuerdo con Radvanyi y otros, (1989) Anal Biochem. 177:103-9 modificado por Pernas y otros, (Pernas y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991) 178:1298-1305). En particular, se usa el siguiente ensayo. La sal sódica 1-hexadecanoilo-2-(1-pirenodcanoilo)-sn-glicero-3-fosfometanol (Interchim, Montluçon, Francia) se usa como un sustrato para la sPLA2. La hidrólisis de este sustrato por la sPLA2 produce el ácido 1-pirenodcanoico, que emite fluorescencia a 397 nm. Un volumen (E) de 0.03 ml de los plasmas alicuotados se mezcla con 5 nmoles del sustrato en presencia de 10 mM tris-HCl pH 8.7, 0.1 % de albúmina, 10 mM de CaCl₂ en un volumen total de 2.5 ml, y la fluorescencia (F) se mide a 397 nm después de un minuto. El 100% de la hidrólisis del sustrato se obtiene con 0.1 U de la PLA2 del veneno de abeja (Sigma Chemical Co., Francia) durante un minuto, el valor de la fluorescencia al final del minuto de reacción (F_{máx}) así corresponde a una actividad, de 2 nmoles/min (V_{máx}). La actividad (A) de la muestra (expresada en nmoles/ml/min) está dada por la siguiente fórmula:

$$A = \frac{V_{\max} \cdot F}{E \cdot F_{\max}}$$

25 Las muestras se diluyen cuando la hidrólisis del sustrato está por encima de 50%. La hidrólisis del sustrato en ausencia de plasma se usa como control negativo y se deduce a partir de la actividad de la PLA2. Todas las muestras se prueban por duplicado. La mínima actividad detectable y el límite de detección es 0.10 nmoles/min/ml y el coeficiente de variación intra e inter ensayo es menor que 10%.

30 Todos los valores numéricos dados en la presente descripción para la actividad de la sPLA2 en el plasma se miden de acuerdo con el ensayo definido anteriormente.

La expresión "valor predeterminado" designa un valor umbral por encima del cual la actividad de la sPLA2 en el plasma se considera que es importante para una aflicción actual o futura de un paciente con un evento cardiaco y/o vascular o patología relacionada.

35 La expresión "mayor actividad de la sPLA2" significa que para ser indicativo de un aumento del riesgo, el valor de la actividad de la sPLA2 del paciente debe ser mayor que el valor predeterminado.

40 De acuerdo con una modalidad particular del método definido anteriormente, el paciente se ha diagnosticado como sustancialmente sano, particularmente con respecto a enfermedades relacionadas con la aterosclerosis, cardiacas y/o vasculares.

45 Por "sustancialmente sano" se entiende que el paciente no presenta síntomas de aflicción por una enfermedad, particularmente por una enfermedad relacionada con la aterosclerosis, cardiaca y/o vascular. Tales enfermedades comprenden particularmente: las enfermedades arterio coronarias (CAD), aterosclerosis de la carótida, aterosclerosis aórtica, aterosclerosis ilíaca o femoral, aneurisma vascular, calcificación vascular, hipertensión, insuficiencia cardíaca y diabetes.

50 De acuerdo con otra modalidad particular del método definido anteriormente, el paciente se ha diagnosticado como que presenta uno de los siguientes trastornos coronarios:

- los trastornos isquémicos crónicos sin necrosis miocárdica, tal como la angina de pecho estable o de esfuerzo,
- trastornos isquémicos agudos sin necrosis miocárdica, tal como la angina de pecho inestable,
- trastornos isquémicos con necrosis miocárdica, tal como el infarto de miocardio con elevación del segmento ST o el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST.

55 La isquemia tisular se define a menudo en términos relativos y se produce cuando las necesidades de oxígeno exceden la entrega de oxígeno a los tejidos. Hay un desequilibrio entre la demanda y el suministro de oxígeno del tejido (miocárdico por ejemplo). Esta afección de falta de oxígeno puede estar acompañada por la eliminación inadecuada de los metabolitos como consecuencia de la perfusión reducida. La isquemia miocárdica se puede diagnosticar clínicamente (dolor en el pecho, por ejemplo), biológicamente (aumento de la actividad de la mieloperoxidasa por ejemplo), metabólicamente, por medio del uso de la escintigrafía, por el análisis de los trastornos de movimiento de la pared regional o por el uso de un electrocardiograma (las modificaciones típicas del segmento ST, la desviación superior o inferior del segmento ST, los cambios típicos de la onda T tal como la inversión de la onda T o las ondas T positivas

simétricas pronunciada o de amplitud alta). La isquemia silente típicamente se diagnostica por medio del uso de la escintigrafía o un registro de electrocardiograma de 24h.

5 La angina estable y de esfuerzo típicamente se manifiestan por un dolor en el pecho durante el ejercicio y se recupera lentamente en reposo. Por lo general, refleja la isquemia tisular durante el ejercicio.

La angina inestable es o bien un reciente aumento en la frecuencia y/o la gravedad de la angina estable, un primer episodio de angina, o una angina en reposo.

10 La necrosis del miocardio típicamente se diagnostica por un aumento en las enzimas miocárdicas (por ejemplo troponina I, troponina T, CPK) en la sangre circulante.

15 La isquemia miocárdica se puede diagnosticar clínicamente (dolor en el pecho por ejemplo), biológicamente (aumento en la actividad de la mieloperoxidasa por ejemplo), metabólicamente, por medio del uso de la escintigrafía, por el análisis de los trastornos de movimiento de la pared regional o por el uso de un electrocardiograma (las modificaciones típicas del segmento ST, la desviación superior o inferior del segmento ST, los cambios típicos de la onda T tal como la inversión de la onda T o las ondas T positivas simétricas pronunciada o de amplitud alta).

20 De acuerdo con el método definido anteriormente, la aparición de los síntomas isquémicos se ha diagnosticado en el paciente.

25 En el método definido anteriormente, el valor predeterminado se corresponde con una actividad de la sPLA2 comprendida en el intervalo de actividad de la sPLA2 de dos tercios, particularmente la mitad, más particularmente la tercera parte, de los individuos que tienen la más alta actividad de sPLA2 en relación a todos los individuos que constituyen una población dada de individuos sustancialmente sanos.

30 Según lo previsto anteriormente, una población dada de individuos sustancialmente sanos se divide en tres partes (o terciles), que contiene cada uno el mismo número de individuos, un tercil correspondiente a la parte de la población dada con las actividades de sPLA2 más altas, un segundo tercil correspondiente a la parte de la población dada con las actividades de sPLA2 más bajas, y el tercer tercil correspondiente al resto de la población.

35 En una modalidad particularmente preferida del método definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 1.8 nmoles/ml/min, particularmente mayor que aproximadamente 2 nmoles/ml/min, más particularmente mayor que aproximadamente 2.5 nmoles/ml/min, preferentemente mayor que aproximadamente 2.9 nmoles/ml/min, y con mayor preferencia mayor que 3.3.

En una modalidad preferida del método definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es menor que aproximadamente 7 nmoles/ml/min.

40 En otra modalidad preferida del método definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 1.8 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, particularmente mayor que aproximadamente 2 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, más particularmente mayor que aproximadamente 2.5 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, preferentemente mayor que aproximadamente 2.9 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, y con mayor preferencia mayor que 3.3 y menor que 7 nmoles/ml/min.

45 En una modalidad adicionalmente preferida del método definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 3.3 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min.

50 La actividad de la sPLA2 se mide de acuerdo con el método de ensayo mencionado anteriormente, particularmente el sustrato usado es la sal sódica de 1-hexadecanoilo-2-(1-pirenodcanoilo)-sn-glicero-3-fosfometanol y la PLA2 de normalización es la PLA2 del veneno de abeja.

55 En otra modalidad particularmente preferida del método definido anteriormente, la actividad sPLA2 se mide en una muestra biológica, particularmente una muestra de suero o una de plasma, y más particularmente una muestra de plasma heparinizado.

Por muestra de plasma heparinizado, se entiende que los tubos de recogida de plasma se han heparinizado antes de la adición de plasma, particularmente con heparina no fraccionada.

60 La presente invención además se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para el diagnóstico del infarto de miocardio en un paciente de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende:

- determinar la actividad de la sPLA2 de dicho paciente,
- comparar dicha actividad con un valor predeterminado,

65

una mayor actividad de la sPLA2 de dicho paciente, en comparación con dicho valor predeterminado es indicativo de infarto de miocardio.

5 En una modalidad particular del método *in vitro* o *ex vivo* definido anteriormente, una mayor actividad de la sPLA2 de un paciente en comparación con un valor predeterminado es indicativo de la aflicción de dicho paciente con una enfermedad cardíaca y/o vascular en el momento en que se hace la determinación de la actividad de la sPLA2 de dicho paciente, o es indicativo de una futura aflicción de dicho paciente con una enfermedad cardíaca y/o vascular, particularmente más de 72 horas después del momento en que se hace la determinación de la actividad de la sPLA2 de dicho paciente.

10 Por "aflicción futura" se entiende una aflicción cuya aparición se produce después del momento en que se ha hecho la determinación de la actividad de la sPLA2 de dicho paciente.

15 En otra modalidad particular del método *in vitro* o *ex vivo* definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 1.8 nmoles/ml/min, particularmente mayor que aproximadamente 2 nmoles/ml/min, más particularmente mayor que aproximadamente 2.5 nmoles/ml/min, preferentemente mayor que aproximadamente 2.9 nmoles/ml/min, y con mayor preferencia mayor que aproximadamente 3.3 nmoles/ml/min.

20 En una modalidad preferida del método *in vitro* o *ex vivo* definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es menor que aproximadamente 7 nmoles/ml/min.

25 En otra modalidad preferida del método *in vitro* o *ex vivo* definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 1.8 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, particularmente mayor que aproximadamente 2 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, más particularmente mayor que aproximadamente 2.5 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, preferentemente mayor que aproximadamente 2.9 nmoles/ml/min y menor que 7 nmoles/ml/min, y con mayor preferencia mayor que 3.3 y menor que 7 nmoles/ml/min.

30 En otra modalidad particularmente preferida del método *in vitro* o *ex vivo* definido anteriormente, la actividad de la sPLA2 se mide en una muestra biológica, particularmente una muestra de suero o una de plasma, y más particularmente una muestra de plasma heparinizado.

Descripción de los figuras

Figura 1

35 La Figura 1 representa la incidencia acumulada de muerte e infarto de miocardio (MI) (eje vertical, en %) versus los días después del ingreso hospitalario (eje horizontal) del paciente con una actividad plasmática de la sPLA2 menor que 1.7 nmoles/min/ml, entre 1.8 y 2.8 nmoles/min/ml, y por encima de 2.9 nmoles/min/ml.

Figura 2

40 La Figura 2 representa la proporción de pacientes no afectados por la muerte y el infarto de miocardio (MI) (eje vertical) versus los días después del ingreso hospitalario (eje horizontal), de los pacientes que tienen un nivel plasmático de sPLA2 en el primer, el segundo o el tercer tercil respectivamente de la repartición global de los niveles plasmáticos de sPLA2 para estos pacientes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Métodos

Estudio de población

55 Los detalles completos de la metodología GRACE se han publicado (Steg y otros, (2004) *Circulation* 109:494-9). Los pacientes incluidos en este subestudio (a partir del 28 de septiembre de 2000 al 24 de octubre de 2002) se reclutaron en 3 centros en Francia y un centro de Escocia. Los criterios de inclusión para el presente estudio fueron la edad ≥ 18 años, un diagnóstico preventivo de ACS (síndrome coronario agudo) y al menos uno de los siguientes criterios: cambios dinámicos en el ECG compatibles con el ACS, aumentos en serie en los niveles séricos de los marcadores bioquímicos de necrosis cardíaca y/o la documentación de la enfermedad arterio coronaria. Los criterios de exclusión fueron el infarto de miocardio reciente con elevación persistente de los marcadores séricos bioquímicos de necrosis cardíaca, clase de Killip IV, trauma, cirugía, comorbilidad significativa, esperanza de vida de menos de 6 meses, un diagnóstico de cáncer, positividad al VIH, hemoglobinuria nocturna paroxística, síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia inducida por heparina, síndrome anti-fosfolípido, lupus

eritematoso sistémico y enfermedad de Crohn. En 6 meses después del alta hospitalaria, los pacientes tuvieron un seguimiento por teléfono, visitas a la clínica, o llamadas al médico de atención primaria.

5 Se usaron definiciones normalizadas de todas las variables relacionadas con el paciente y los diagnósticos clínicos, así como las complicaciones hospitalarias y los resultados. Todos los casos se asignaron a una de las siguientes categorías: STEMI (infarto del miocardio con elevación de segmento ST), NSTEMI (infarto del miocardio sin elevación del segmento ST) o angina inestable. Estas definiciones tienen en cuenta la presentación clínica, los hallazgos del ECG, y los resultados de los marcadores séricos bioquímicos de necrosis. La angina inestable se definió como ACS con los marcadores bioquímicos de necrosis normales (particularmente la troponina I). Los pacientes se categorizaron en el momento del ingreso hospitalario de acuerdo con la clasificación de Killip y Kimball para los signos de insuficiencia cardíaca.

Muestreo de sangre y análisis bioquímicos

15 Las muestras de sangre se recogieron en tubos con heparina en el momento de la inscripción (la primera mañana de trabajo después de la admisión) e inmediatamente se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El plasma resultante se dividió en alícuotas, se congeló y se envió en hielo seco al Xavier Bichat-Claude Bernard Hospital (París, Francia), donde se mantuvieron a -70°C hasta su análisis.

20 La proteína C-reactiva (CRP) se midió mediante una prueba de alta sensibilidad realizada en un analizador Behring BN II, (Behring Diagnostics) y el nivel de la troponina I cardíaca (cTnI) se cuantificó mediante el uso de un sistema automatizado (analizador RXL HM, Dade Behring).

25 La interleucina-18 (IL-18) de alta sensibilidad se midió por medio del uso de un kit de ELISA humano (MBL Co., Japón) con un límite de detección de 12.5 pg/ml.

30 Los niveles de la sPLA2 inmuno-reactiva en el plasma se midieron mediante un ensayo inmunométrico basado en una técnica de tipo "sándwich" de doble anticuerpo, por medio del uso de un anticuerpo monoclonal específico para la PLA2 secretada de tipo IIA (Cayman Chemical Company, Estados Unidos). Este anticuerpo no tiene reactividad cruzada con las sPLA2 de tipo I, IV, o tipo V (Cayman Chemical Company, Estados Unidos). La concentración mínima detectable fue 15.6 pg/ml y el coeficiente de variación intra e inter ensayo (CV) fue <10%.

35 La actividad de la sPLA2 plasmática se midió mediante un ensayo fluorimétrico selectivo de Radvanyi y otros, (1989) Anal. Biochem 177:103-9 modificado por Pernas y otros, (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 178:1298-1305. En resumen, la sal sódica de 1-hexadecanoilo-2-(1-pirenododecanoilo)-sn-glicero-3-fosfometanol (Molecular Probe) se usó como un sustrato para la sPLA2. La hidrólisis de este sustrato por la sPLA2 produce el ácido 1-pirenododecanoico, que emite fluorescencia a 397 nm. Un volumen de 0.03 ml (E) de los plasmas alícuotados se mezcló con 5 nmoles del sustrato en presencia de 10 mM tris-HCl pH 8.7, 0.1 % de albúmina, 10 mM CaCl₂ en un volumen total de 2.5 ml, y la fluorescencia (F) se midió a 397 nm después de un minuto. El 100% de la hidrólisis del sustrato se obtiene con 0.1 U de la PLA2 del veneno de abeja (Sigma Chemical Co., Francia) durante un minuto, el valor de la fluorescencia al final del minuto de reacción (F_{máx}) así corresponde a una actividad, de 2 nmoles/min (V_{máx}). La actividad (A) de la muestra (expresada en nmoles/min/ml) está dada por la siguiente fórmula:

$$A = \frac{V_{\max} \cdot F}{E \cdot F_{\max}}$$

45 Las muestras se diluyeron cuando la hidrólisis del sustrato estaba por encima de 50%. La hidrólisis del sustrato en ausencia de plasma se usó como control negativo y se dedujo a partir de la actividad de la PLA2. Todas las muestras se probaron por duplicado. La actividad mínima detectable y el límite de detección fue 0.10 nmoles/min/ml y el CV intra e inter ensayo fue < 10%.

50

Análisis estadístico

55 Las asociaciones potenciales entre la actividad de la sPLA2 en el plasma y los parámetros clínicos se probaron en un análisis univariado por medio del uso de la prueba de la t de Student o ANOVA para las variables categóricas y la correlación de Pearson para la edad. Los predictores univariados con p <= 0.05 se incluyeron en un análisis de regresión lineal multivariado por etapas.

60 Las correlaciones entre la actividad de la sPLA2 en el plasma y las variables biológicas se evaluaron mediante los coeficientes de correlación de Pearson. Las comparaciones entre los grupos de pacientes de acuerdo con los terciles de la actividad de la sPLA2 se realizaron mediante ANOVA para variables continuas y chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas. Las curvas de supervivencia se obtuvieron a partir de los estimados de Kaplan-Meier. La supervivencia global se definió como el intervalo de tiempo entre la fecha de ingreso hospitalario y la fecha de muerte de todas las causas. Los pacientes vivos en el último seguimiento se censaron. La supervivencia libre de MI

(infarto de miocardio) se define como el intervalo de tiempo entre la fecha de ingreso hospitalario y la fecha de la recurrencia del infarto de miocardio. La muerte y los pacientes vivos sin recurrencia de MI en el último seguimiento se censaron. Para la variable combinada, la supervivencia se definió como el intervalo de tiempo entre la fecha de ingreso hospitalario y la fecha del primer evento. Los pacientes vivos sin recurrencia de MI en el último seguimiento se censaron. Las comparaciones de las distribuciones de supervivencia se realizaron mediante las pruebas Log Rank.

Los predictores independientes de muerte, el MI y la muerte o el MI se identificaron por medio del uso de un modelo de regresión de Cox de riesgo proporcional. Las variables incluidas en el modelo fueron predictores univariados con $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el software SAS versión 8.2 (SAS Institute, Cary, NC).

Resultados

La población de estudio consistió en 458 pacientes con ACS, 38.5% con STEMI, 52.5% con NSTEMI y 49% con angina inestable. La mediana del seguimiento después del ingreso fue de 6.5 meses (percentil 25: 6 meses, percentil 75: 7.5 meses). El tiempo medio (\pm DE) de aparición de los síntomas clínicos al muestreo de sangre fue 30.05 ± 21.3 horas. Este intervalo de tiempo no se correlacionó con los niveles plasmáticos de sPLA2 ($P=0.45$). La actividad de la sPLA2 en el plasma se encontraba en el intervalo de ≤ 0.1 a 16.9 nmoles/min/ml con una media de 2.63 ± 1.69 nmoles/min/ml. Un año de incidencia acumulado de muerte o de MI: 9.63% (S.E : 0.02).

Asociación de la actividad de la sPLA2 en el plasma con los valores iniciales de las variables clínicas y biológicas

En el análisis univariado, las variables clínicas asociadas con una mayor actividad de la sPLA2 fueron el reclutamiento de pacientes en Escocia (versus el reclutamiento en Francia), el sexo masculino, la edad, los antecedentes de diabetes, hipertensión y un cuadro clínico con STEMI o clase de Killip >1 . El tratamiento con heparina no fraccionada dentro de las primeras 24 horas se asoció además con mayor actividad de la sPLA2. Una historia de angina de pecho, infarto de miocardio, angiografía coronaria o angioplastia, una historia de hiperlipidemia o tratamiento de heparina LMW (bajo peso molecular) se asociaron con niveles de sPLA2 más bajos. En el análisis multivariado, el centro de reclutamiento, la edad, el diagnóstico de STEMI en el ingreso, la presentación con la clase de Killip >1 y el tratamiento con la heparina no fraccionada fueron predictores significativos de alta actividad de la sPLA2 (**Tabla 1**). Una historia de hiperlipidemia se asoció significativamente con actividad de la sPLA2 más baja (**Tabla 1**).

Cuando la población de pacientes se estudió de acuerdo con los terciles de la actividad de la sPLA2 (**Tabla 2**), la edad mayor, una historia de insuficiencia cardíaca, la clase de Killip >1 en el ingreso, y los mayores valores de Tnl y CRP se asociaron más frecuentemente con mayor actividad de la sPLA2, mientras que una historia de angioplastia coronaria, hiperlipidemia o mayores niveles de colesterol medidos durante las primeras 24 horas después del ingreso fueron más frecuentes en los terciles inferiores de sPLA2 (**Tabla 2**).

La actividad de la sPLA2 en el plasma se correlacionó modestamente con los niveles de CRP ($r=0.47$, $P < 0.0001$). Aunque estadísticamente significativas, las asociaciones entre la actividad de la sPLA2 y los niveles de Tnl ($r=0.12$, $P=0.01$), los niveles de colesterol total ($r=-0.17$, $P=0.009$) y el colesterol LDL ($r=-0.18$, $P=0.007$) fueron débiles. No se encontró correlación entre la actividad de la sPLA2 y los niveles de IL-18 ($r=0.02$, $P=0.74$). Además, la correlación entre la actividad plasmática de la sPLA2 y el nivel del antígeno sPLA2 en el plasma fue inesperadamente baja ($r=0.66$, $P < 0.0001$); como consecuencia, los resultados obtenidos para la actividad de la sPLA2 no se pudieron deducir del nivel plasmático de sPLA2; este hallazgo inesperado se podría explicar por la presencia de una cantidad sustancial de las enzimas sPLA2 en el plasma no activas o ligeramente activas.

Asociación de los valores iniciales de la actividad de la sPLA2 en el plasma con los resultados clínicos.

Los valores iniciales medios de la actividad de la sPLA2 fue mayor entre los pacientes que murieron o tuvieron MI nuevo o recurrente que entre los que estaban vivos y libres de MI a los 6 meses de seguimiento (3.31 ± 1.22 vs. 2.57 ± 1.72 , respectivamente, $P=0.02$). No se observó asociación entre los resultados clínicos y ya sea la CRP o los niveles de IL-18.

La tasa de muerte y MI nuevo o recurrente aumentó de acuerdo con los terciles crecientes de la actividad de la sPLA2. Los pacientes en el tercil superior de sPLA2 tuvieron un riesgo relativo de 4.30 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 2.1 a 8.7) por muerte y MI ($P < 0.0001$) (**Figura 1**). Esta asociación se mantuvo significativa en los subgrupos de pacientes con STEMI (RR=6.9; 1.5-31.8), los pacientes con NSTEMI o angina inestable (RR=3.8; 1.7-8.7), los pacientes con la clase de Killip <1 (RR=3.8; 1.4-10.4), los pacientes con la clase de Killip >1 (RR=2.8; 1.0-7.7), los pacientes con CRP <10 mg/l (4.7; 1.8-12.1) y los pacientes con los niveles de CRP >10 mg/l (4.0; 1.3-12.2).

Los ajustes para potenciales variables de confusión en un modelo de regresión de Cox, que incluyen la edad, una historia de hipertensión, diabetes, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, angiografía coronaria o angioplastia, clase de Killip, desviación del segmento ST, revascularización coronaria (angioplastia o cirugía de derivación arterio coronaria), y creatinina no alteró la fuerte asociación entre los altos niveles de los valores iniciales de la actividad de la sPLA2 y un aumento del riesgo de eventos coronarios mayores en el seguimiento (**Tabla 3**).

El riesgo relativo ajustado para la muerte, el MI no mortal o la variable combinada de muerte y MI en el tercer tercil de la sPLA2 fueron 2.61 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.01 a 6.39) ($P=0.036$), 6.1 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.91 a 19.21) ($P=0.002$) and 3.3 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.56 a 6.85) ($P=0.002$), respectivamente.

Además, el riesgo relativo ajustado para la variable combinada de muerte y MI para una actividad de la sPLA2 en el plasma mayor que 1.8 fue 2.44 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 0.70 a 8.48), 2.19 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 0.73 a 6.58) para una actividad de la sPLA2 en el plasma mayor que 2, 2.4 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.02 a 5.65) para una actividad de la sPLA2 en el plasma mayor que 2.5, 3.08 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.37 a 6.91) para una actividad de la sPLA2 en el plasma mayor que 2.9 y 2.26 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.11 a 4.66) para una actividad plasmática de sPLA2 mayor que 3.3 (N.B. la actividad plasmática de sPLA2 se expresa en nmoles/min/ml).

No se encontró ninguna asociación significativa entre el nivel del antígeno sPLA2 y la variable combinada de muerte o MI (riesgo relativo, 1.44, $P=0.3$). Finalmente, se verificó que la puntuación de GRACE, previamente demostró ser altamente predictiva de los eventos de recurrencia (Eagle y otros, (2004) *Jama*.291:2727-33), predijeron significativamente los resultados adversos en el presente estudio (riesgo relativo para cada aumento de un punto en la puntuación, 1.03; el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.02 a 1.04, $P<0.0001$). Interesantemente, en un modelo de regresión de Cox que incluyen la puntuación de GRACE, el ajuste de riesgo relativo para la variable combinada de muerte o MI en el tercer tercil de la actividad de la sPLA2 fue 2.78 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.30 a 5.93) ($P=0.006$). El nivel del antígeno sPLA2 no añadió ninguna información de pronóstico importante a la puntuación GRACE ($P=0.3$).

Comparación con otros marcadores

Los procesos inflamatorios y trombóticos son los principales determinantes de las complicaciones de la placa aterosclerótica que conducen a los síndromes coronarios agudos (ACS) y la muerte súbita. Además de los estudios patológicos que muestran una asociación importante entre la inflamación de la placa y la ruptura de la placa en humanos, y los datos experimentales que muestran un papel crítico de la respuesta inmuno-inflamatoria tanto en el desarrollo y la composición de la placa, la última década ha sido testigo de un creciente interés en el estudio del papel de los marcadores inflamatorios sistémicos y su relación con las graves complicaciones clínicas de la aterosclerosis. Varios marcadores inflamatorios circulantes, que incluyen CRP, IL-6, el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1, y más recientemente la mieloperoxidasa, se ha demostrado que están elevados en los pacientes con ACS y que están asociados con los resultados clínicos adversos durante el seguimiento. En este estudio, los inventores han demostrado que la actividad de la sPLA2 en el plasma, en contraste con la CRP o la IL-18, es un importante predictor independiente de muerte y MI nuevo o recurrente en pacientes con ACS.

CRP

Desde el estudio de referencia por Liuzzo y otros, (Liuzzo y otros, (1994) *N Engl J Med.*; 331:417-24), numerosos estudios han abordado el valor pronóstico de la CRP en pacientes con ACS. Mayores niveles de CRP se asociaron con un aumento del riesgo durante el seguimiento en varios ensayos aleatorizados de pacientes con angina inestable o NSTEMI, que incluyen TIMI IIa (Morrow y otros, (1998) *J Am Coll Cardiol.*; 31:1460-5), CAPTURE (Heeschen y otros, (2000) *J Am Coll Cardiol.*; 35:1535-42), FRISC (Lindahl y otros, (2000) *N Engl J Med.*; 343:1139-47) y GUSTO-IV (James y otros, (2003) *Circulation.*; 108:275-81). Los niveles de CRP en los pacientes de ACS asignados a los primeros procedimientos de revascularización invasiva además predijeron los resultados adversos (Mueller y otros, (2002) *Circulation.*; 105:1412-5). Sin embargo, el valor predictivo independiente de CRP en pacientes con STEMI o en pacientes con ACS, reclutados fuera de los ensayos clínicos aleatorios, es discutible (Zairis y otros, (2002) *Am Heart J.*; 144:782-9; Bennermo y otros, (2003) *J Intern Med.*; 254:244-50; Benamer y otros, (1998) *Am J Cardiol.*; 82:845-50). En el presente subestudio observacional a partir de GRACE, la CRP medida unas pocas horas después del ingreso por el ACS (en su mayoría STEMI y NSTEMI) no se asoció con los resultados adversos, lo que sugirió que en la práctica diaria, una única medición temprana de CRP en pacientes ingresados por ACS no podía añadir información predictiva significativa sobre las variables clínicas.

IL-18

Sobre la base de los anteriores datos experimentales por los inventores y otros que muestran un potente papel proaterogénico para la IL-18 endógena (Mallat y otros, (2001) *Circ Res.*; 89:E41-5; Whitman y otros, (2002) *Circ Res.*; 90:E34-8), se han medido los niveles de IL-18 en el plasma en pacientes con una historia de enfermedad de las arterias coronarias y en hombres sanos de mediana edad y resultó ser un predictor independiente de eventos coronarios (Blankenberg y otros, (2002) *Circulation.*; 106:24-30; Blankenberg y otros, (2003) *Circulation.*; 108:2453-9). En el presente estudio, no se encontró ninguna asociación entre los niveles de IL-18, medida en el ingreso, y los resultados adversos durante el seguimiento en los pacientes con ACS. Estos resultados en conjunto sugieren que el valor pronóstico de la medición de IL-18 varía de acuerdo con la actividad de la enfermedad en el momento del muestreo.

Esto se podría relacionar con múltiples factores, que incluyen las variables de confusión no probadas, un papel diferencial de la IL-18 en diferentes situaciones clínicas o a diferencias en la producción de la proteína de unión de la IL-18, el inhibidor endógeno de la IL-18. Estas consideraciones se deben tener en cuenta en futuros estudios de evaluación de las implicaciones de pronósticos de la IL-18 en pacientes con ACS.

Nivel del antígeno sPLA2 en el plasma

El hallazgo más importante y novedoso en este estudio contemporáneo es la demostración de que una única determinación de la actividad de la sPLA2, obtenida durante los 2 días, con una media de 30 horas, después de la aparición de los síntomas isquémicos, proporciona información de pronóstico potente en pacientes con ACS. La asociación entre la actividad de la sPLA2 y el riesgo de muerte e infarto de miocardio fue independiente de otros predictores conocidos de los principales resultados adversos en los pacientes con ACS, que incluyen la presencia o ausencia de una historia de infarto de miocardio y la presencia o ausencia de signos clínicos de insuficiencia cardíaca en el ingreso (Steg y otros, (2004) *Circulation.*; 109:494-9). Curiosamente, este hallazgo de un fuerte valor predictivo de la actividad de la sPLA2 se obtuvo a pesar de la heterogeneidad de la población bajo estudio en cuanto a la presentación clínica, fisiopatología y el riesgo asociado a cada tipo de síndromes coronarios agudos y la alta tasa de revascularización en el hospital, compatible con la práctica cotidiana actual. Esto sugiere que la activación de la sPLA2 puede ser un mecanismo crítico y común entre los pacientes con riesgo de muerte e infarto de miocardio después de los síndromes coronarios agudos.

Un pequeño estudio previo ha demostrado que en los pacientes con angina inestable, un mayor nivel plasmático de sPLA2 se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar eventos coronarios, principalmente revascularizaciones coronarias y reingresos, durante un período de seguimiento de 2 años (Kugiyama y otros, (2000) *Am J Cardiol.*; 86:718-22). Este estudio anterior se centraba en un número limitado de pacientes homogéneos y sólo incluyó 52 pacientes con angina inestable que no tenían ningún aumento de los marcadores bioquímicos de necrosis. Adicionalmente, no se realizó ninguna medición directa de la actividad de la sPLA2.

En comparación, el presente estudio ha demostrado que no se encontró asociación significativa entre el nivel del antígeno sPLA2 y la variable combinada de muerte y MI (riesgo relativo, 1.44, $P=0.3$) así como para MI solo riesgo relativo 0.5, $P=0.7$) (**Figura 2**). Además, el presente estudio se amplía a los pacientes con ACS grave, y muestra que la actividad de la sPLA2 es un predictor fuerte e independiente de muerte e infarto de miocardio en pacientes con STEMI y pacientes con NSTEMI.

Beneficios del uso de la actividad de la sPLA2 como marcador de riesgo

La importancia de la evaluación de la actividad de la sPLA2 en comparación con otros marcadores inflamatorios probados previamente en los síndromes coronarios agudos es de varios órdenes.

A diferencia de los biomarcadores cardíacos tradicionales usados para predecir los resultados adversos en pacientes con ACS, la actividad de la sPLA2 ha demostrado que actúa en múltiples rutas críticas implicadas en la aterogénesis, a partir de la oxidación de los lípidos para la modulación de la activación de las células vasculares e inflamatorias y la apoptosis. La sPLA2 se expresa en varios tejidos y podría ser uno de los reactantes de la fase aguda (Pruzanski y Vadas (1991) *Immunol Today.*; 12:143-6; Murakami y otros, (1995) *J Lipid Mediat Cell Signal.*; 12:119-30). Curiosamente, la sPLA2 está expresada ya en la pared arterial normal. (Hurt-Camejo y otros, (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 17:300-9; Elinder y otros, (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 17:2257-63) y su expresión rápidamente se regula de manera ascendente mediante estímulos inflamatorios (Przanski y Vadas (1991) *Immunol Today.*; 12:143-6; Murakami y otros, (1995) *J Lipid Mediat Cell Signal.*; 12:119-30; Nakano y Arita (1990) *FEBS Lett.*; 273:23-6, Murakami y otros, (1993) *J Biol Chem.*; 268:839-44, Kuwata y otros, (1998) *J Biol Chem.*; 273:1733-40), lo que sugiere un papel potencial para la sPLA2 al comenzar las fases tempranas de la respuesta del vaso a la lesión. En contraste con un número de otros marcadores inflamatorios, la sPLA2 ha demostrado ser una potente enzima proaterogénica en un modelo animal de aterosclerosis, que es capaz de inducir la formación de estrías de grasa aun en ausencia de elevados niveles de colesterol (Ivandic y otros, (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 19:1284-90), lo que sugiere una implicación directa de las rutas mediadas por la sPLA2 en la aterosclerosis.

La sPLA2 estimula la oxidación de la LDL nativa (Mangin y otros, (1993) *Circ Res.*; 72:161-6) y está implicada en la liberación de ácidos grasos poliinsaturados, lo que conduce a la producción de fosfolípidos biológicamente activos derivados a partir de 1-palmitoilo-2-araquidonoilo-sn-glicero-3 fosforilcolina (PAPC) (Leitinger y otros, (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 19:1291-8). Estos productos de oxidación juegan un importante papel en la activación endotelial, de las plaquetas, monocitos y en las interacciones monocitos-endoteliales, todos los procesos conocidos que son etapas críticas en la aterogénesis. Los mediadores lipídicos producidos a través de la sPLA2, que incluyen prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos han demostrado efectos proinflamatorios, protrombogénicos y proaterogénicos significativos. Los lisofosfolípidos, que incluyen la lisofosfatidilcolina y el ácido lisofosfatídico, liberado de la membrana celular de las plaquetas y otras células en forma de microvesículas después de la activación de la sPLA2 (Fourcade y otros, (1995) *Cell.*; 80:919-927), pueden influir en las funciones celulares (Swarthout y Walling (2000) *Cell Mol Life Sci.*;

57:1978-85; Kume y otros, (1992) J Clin Invest.; 90:1138-44) y conducen a la generación de PAF, un potente activador celular y un factor potencialmente proaterogénico.

5 La sPLA2 potencia enormemente la activación de los linfocitos T que conduce a una mayor proliferación, lo que sugiere que la fosfolipasa A2 secretada en los sitios inflamatorios, que incluyen la placa aterosclerótica (Menschikowski y otros, (1995) Atherosclerosis.; 118:173-81; Hurt-Camejo y otros, (1997) Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 17:300-9; Elinder y otros, (1997) Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 17:2257-63), juega un papel en la propagación de las respuestas celulares. De gran importancia, la sPLA2 es virtualmente inactiva sobre los fosfolípidos de las células intactas, y varios estudios sugieren que sólo las membranas donde la distribución transversal de fosfolípidos se ha perturbado ofrecen una una superficie conveniente capaz de interactuar con la enzima (Fourcade y otros, (1998) Adv Enzyme Regul.; 38:99-107).

15 Previamente los inventores han demostrado el aumento de los niveles intraplacas y circulantes de micropartículas secretadas por la membranas que presentan una distribución alterada de fosfolípidos con exposición de fosfatidilserina en la hoja externa de la membrana en pacientes con síndromes coronarios agudos en comparación con los pacientes estables y no coronarios (Mallat y otros, (1999) Circulation.; 99:348-353; Mallat y otros, (2000) Circulation.; 101:841-3). Estas micropartículas pueden constituir un sustrato importante para la sPLA2 tanto en el sitio de complicación de la placa y circulantes en sangre. En conjunto, estos datos sugieren que la actividad de la sPLA2, en la pared arterial y la sangre circulante, puede jugar un papel crítico en las rutas inflamatorias que conducen a los síndromes coronarios agudos, y pueden explicar, al menos en parte, el aumento de 6 veces en el infarto de miocardio nuevo o recurrente en los pacientes con ACS.

25 Para que la actividad de la sPLA2 sea útil en la evaluación clínica de pacientes con ACS, debe ayudar a los clínicos en la toma de decisiones terapéuticas. Los pacientes con bajos niveles de actividad de la sPLA2 parecen tener un riesgo particularmente bajo de eventos adversos durante el seguimiento, lo que sugiere que, en estos pacientes, una estrategia terapéutica agresiva o invasiva podría evitarse, lo que lleva a la reducción de los costes y el riesgo de la terapia innecesaria. Por otra parte, los pacientes con niveles elevados de actividad de la sPLA2 tienen un aumento del riesgo de MI y muerte y se pueden beneficiar a partir de una terapia médica y/o de revascularización más agresiva. Estos asuntos se deben abordar específicamente en estudios futuros.

30 En conclusión, el nivel de actividad de la sPLA2, medida unas pocas horas después de la aparición de los síntomas isquémicos en pacientes con síndromes coronarios agudos, es un fuerte predictor de muerte y MI en 6 meses de seguimiento. Es importante destacar que el riesgo asociado con niveles elevados de actividad de la sPLA2 es estadísticamente independiente de otros marcadores clínicos y biológicos asociados con un aumento del riesgo. Una fortaleza adicional de estos hallazgos es que se obtuvieron en un estudio observacional contemporáneo realizado en el marco del "mundo real". Así, la medición de la actividad de la sPLA2 proporcionará una valiosa información adicional para su uso en la estratificación del riesgo en el futuro.

Ejemplo 2

40 Con la metodología descrita en el Ejemplo 1, se llevó a cabo un estudio sobre una muestra de estudio muy similar. Los resultados obtenidos son idénticos a las conclusiones del Ejemplo 1.

45 La muestra de estudio consistió en 446 pacientes con ACS, 38.5% con STEMI, 52.5% con NSTEMI y 9% con angina inestable. La mediana de seguimiento después del ingreso fue de 6.5 meses (percentil 25: 6 meses; percentil 75: 7.5 meses). La tasa de revascularización intrahospitalaria (PCI o CABG) fue alta: 48.3%. Un año de incidencia acumulada de muerte o de MI fue: 9.63% (S.E: 0.02). La actividad de la sPLA2 en el plasma se encontraba en el intervalo de ≤ 0.1 a 16.9 nmoles/min/ml con una media de 2.63 ± 1.69 nmoles/min/ml. El intervalo de tiempo a partir de la aparición de los síntomas clínicos hasta el muestreo de sangre no se asoció con los niveles plasmáticos de actividad de la sPLA2 ($P=0.45$).

Asociación de la actividad de la sPLA2 en el plasma con los valores iniciales clínicos y las variables biológicas

55 Las características de la muestra se muestran en la Tabla 4 y las variables clínicas asociadas con la actividad de la sPLA2 se muestran en la Tabla 5. En los análisis multivariados, los predictores significativos de alta actividad de la sPLA2 fueron el centro de reclutamiento, la edad, el diagnóstico de STEMI al ingreso, la presentación con clase de Killip >1 y el tratamiento con heparina no fraccionada (Tabla 5). Una historia de hiperlipidemia se asoció significativamente con la actividad de la sPLA2 más baja (Tabla 5). La actividad de la sPLA2 en el plasma mostró moderada asociación con CRP ($r=0.35$, $P<0.0001$). Aunque estadísticamente significativas, las asociaciones entre la actividad de la sPLA2 y TnI ($r=0.23$, $P<0.0001$), el colesterol total ($r=-0.24$, $P<0.0001$) y el colesterol LDL ($r=-0.24$, $P=0.0003$) fueron débiles. No hubo ninguna asociación entre la actividad de la sPLA2 y los niveles de la IL-18 ($r=0.03$, $P=0.53$). La actividad de la sPLA2 mostró moderada asociación con los niveles del antígeno sPLA2 ($r=0.37$, $P<0.0001$). Esto no fue inesperado ya que la actividad de la sPLA2 es la de los distintos subtipos de sPLA2, mientras que los niveles del antígeno sPLA2 sólo reflejaban los niveles de sPLA2 del tipo IIA.

Asociación de los valores iniciales de la actividad de la sPLA2 en el plasma con los resultados clínicos

Hubo 35 eventos adversos mayores (20 muertes y 15 MI). No se vio ninguna asociación significativa entre los resultados clínicos y los niveles tanto de CRP o IL-18 (Tabla 6). La tasa de muerte y MI nuevo o recurrente aumentó de acuerdo con los terciles crecientes de la actividad de la sPLA2. Los pacientes en el tercil superior de actividad de la sPLA2 tuvieron una tasa de riesgo de 4.30 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 2.1 a 8.7) para la muerte o MI ($P<0.0001$) (en comparación con los otros 2 terciles) (Tabla 6). El ajuste para los factores de confusión potenciales en un modelo de regresión de Cox por etapas, que incluye la edad, una historia de hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, enfermedad arterio coronaria, cirugía de derivación arterio coronaria, clase de Killip >1 , y el nivel de creatinina >1.1 no alteró la fuerte asociación entre los altos niveles de los valores iniciales de actividad de la sPLA2 y un aumento del riesgo de eventos coronarios mayores en el seguimiento (Tabla 6). El ajuste del cociente de riesgo para las variables combinadas de muerte o MI en el tercer tercil de actividad de la sPLA2 en comparación con el primer y segundo terciles fue 3.08 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.37 a 6.91) ($P=0.006$) (Tabla 7).

No se encontró ninguna asociación significativa entre el nivel del antígeno sPLA2 y la variable combinada de muerte o MI (el cociente de riesgo ajustado, 1.44, $P=0.3$). Por último, se verificó que la puntuación GRACE, que previamente se demostró ser altamente predictiva para el evento de recurrencia, predijo significativamente los resultados adversos (MI/muerte) en el presente estudio (el cociente de riesgo para cada aumento de un punto en la puntuación, 1.03; el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.02 a 1.04, $P<0.0001$). Curiosamente, la actividad de la sPLA2 permaneció como un predictor independiente para los eventos recurrentes después de ajustar por la puntuación GRACE para los eventos recurrentes en un modelo de regresión de Cox. El cociente de riesgo ajustado para la variable combinada de muerte o MI en el tercer tercil de la actividad de la sPLA2 fue 2.78 (el intervalo de confianza del 95 por ciento, 1.30 a 5.93) ($P=0.006$).

La actividad de la sPLA2 fue mayor en los pacientes reclutados en Escocia que en los pacientes reclutados en Francia (Tabla 5). Esto puede estar relacionado, al menos en parte, a la mayor edad de los pacientes reclutados en Escocia ($P<0.0001$ en comparación con Francia), y el porcentaje más alto de pacientes escoceses con una clase de Killip >1 al ingreso (34.52% vs solo 12.02% en la muestra francesa de pacientes) ($P<0.0001$).

Ejemplo 3

Los resultados preliminares de un estudio realizado en una población distinta confirmaron los resultados obtenidos en el Ejemplo 1, para el uso de la actividad de la sPLA2 como un marcador de riesgo para los eventos cardíacos y vasculares.

En el presente estudio se incluyeron 1105 individuos. Estos individuos se seleccionaron por haber desarrollado una enfermedad coronaria (mortal o no) hasta noviembre de 2003 (la media de la duración del seguimiento de 6 años). Además fueron parte del estudio 2209 controles pareados por sexo, edad y fecha de inclusión.

Los individuos se seleccionaron entre los participantes del estudio EPIC-Norfolk. Este último es un estudio prospectivo de una población que incluyó 25 663 hombres y mujeres de edad de 45 a 79, que vivían en Norfolk (Reino Unido) y llenaron un cuestionario y se sometieron a un control clínico en el momento de la inclusión (entre 1993 y 1997) (Day N, y otros, EPIC-Norfolk: study design and characteristics of the cohort. European Prospective Investigation of Cancer. Br J Cancer 1999;80 Suppl 1:95-103). A modo de ejemplo, las características de los 1400 individuos de control y los 700 pacientes incluidos en el estudio EPIC-Norfolk se presentan en la Tabla 8. Cada individuo se puede identificar por la Oficina de Estadística Nacional del Reino Unido por los certificados de defunción, y el estado de vida se conoce con precisión para toda la cohorte. Los pacientes ingresados en un hospital se identifican gracias a su único número del Servicio Nacional de Salud en relación con la base de datos Norfolk Health Authority. Los pacientes se identificaron como que estaban afectados con una enfermedad coronaria durante el seguimiento si se hospitalizaron con un diagnóstico de enfermedad coronaria y/o murieron a consecuencia de una enfermedad coronaria. La enfermedad coronaria se definió de acuerdo con los códigos 410 a 414 de la Clasificación Internacional de Enfermedades, 9^{na} edición. Estos códigos incluyen todo el panel clínico de las enfermedades coronarias del angor estable al infarto.

Una muestra de sangre venosa se tomó en el momento de la inclusión en tubos secos citrados. Las muestras de sangre (plasma y suero) se mantuvieron a -80°C en el departamento de bioquímica clínica, Universidad de Cambridge, Reino Unido.

Las muestras de los 1105 casos de individuos y de los 2209 controles se transportaron en hielo seco y se mantuvieron a -80°C en el departamento Biochimie B del Bichat Hospital, París, la actividad de la sPLA2 se midió de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1.

La distribución del factor de riesgo cardiovascular de acuerdo con los cuartiles de actividad de la sPLA2 se determina al analizar las relaciones entre la actividad de la sPLA2 y los factores de riesgo. Los cuartiles se definen de acuerdo con la distribución de la actividad de la sPLA2 en los controles.

La relación entre la actividad de la sPLA2 (como una variable continua) y otras variables continuas de riesgo

cardiovascular se analizó mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson, así como el valor de la probabilidad correspondiente.

5 Los riesgos relativos de ocurrencia de la enfermedad coronaria y sus correspondientes intervalos de confianza (95%) se calculan por medio del uso de un análisis de regresión logística condicional que tiene en cuenta la edad y el sexo coincidente.

El cuartil más bajo de la actividad de la sPLA2 se considera como una referencia (RR=1).

10 Los riesgos relativos se ajustan sobre los factores de riesgo cardiovascular. Se proporcionan ajustes adicionales sobre otras variables biológicas asociadas al riesgo de enfermedad coronaria.

Los análisis estadísticos se llevan a cabo con el software SAS versión 8.2 (SAS Institute, Cary, NC).

15 **Tabla 1 Asociación entre la actividad de la sPLA2 en el plasma y los valores iniciales de las variables clínicas**

		Media ±D.E de la actividad de la sPLA2	Valor P univariado	Valor P multivariado
Centro de reclutamiento	Escocia	3.1 ±1.9	<0.0001	0.0006
	Francia	2.4 ±1.5		
Sexo	M	2.6 ±1.6	0.4	
	F	2.8 ±1.9		
Edad		*	<0.0001	0.002
Historial médico				
Infarto	Sí	2.5 ±1.4	0.3	
	No	2.7 ±1.8		
Enfermedad Arterio Coronaria	Sí	2.5 ±1.4	0.15	
	No	2.7 ±1.8		
Enfermedad cerebrovascular	Sí	2.8 ±1.3	0.6	
	No	2.6 ±1.7		
Diabetes	Sí	3.0 ±2.2	0.08	
	No	2.5 ±1.6		
Hipertensión	Sí	2.8 ±1.8	0.07	
	No	2.5 ±1.6		
Hiperlipidemia	Sí	2.4 ±1.3	0.001	0.04
	No	2.9 ±1.9		
PCI	Sí	2.3 ±1.4	0.06	
	No	2.7 ±1.7		
CABG	Sí	2.3 ±1.3	0.3	
	No	2.7 ±1.7		
Estado del fumador	Fumador actual o en el pasado	2.6 ±1.65	0.3	
	Nunca fumó	2.8 ±1.81		
Índice de diagnóstico				
Infarto de miocardio con elevación del segmento ST		3.0 ±2.2	0.002	0.01
Infarto de miocardio sin elevación del segmento ST		2.4 ±1.3		
Angina inestable		2.3 ±1.4		
Clase de Killip	1	2.4 ±1.5		

Índice de diagnóstico					
	2		3.5 ±2.2	<0.0001	0.04
	3		3.2 ±1.8		
Tratamiento dentro de las primeras 24 h en el hospital o uso crónico					
Aspirina	Sí		2.6 ±1.7	0.2	
	No		2.3 ±1.2		
Ticlopidina / clopidogrel	Sí		2.5 ±1.7	0.3	
	No		2.7 ±1.7		
Heparina LMW	Sí		2.4 ±1.4	0.001	
	No		2.9 ±2		
Heparina no fraccionada	Sí		2.9 ±2	0.0008	0.03
	No		2.3 ±1.2		
GPIIb/IIIa	Sí		2.7 ±1.9	0.6	
	No		2.6 ±1.6		
Estatina	Sí		2.5 ±1.6	0.09	
	No		2.8 ±1.9		
Inhibidor de ACE	Sí		2.8 ±1.9	0.3	
	No		2.6 ±1.6		
Beta bloqueador	Sí		2.6 ±1.8	0.5	
	No		2.8 ±1.5		

Coeficiente de correlación con la sPLA2 : 0.2
 PCI : intervención percutánea; CABG: injerto de derivación arterio coronaria; clase de Killip: clasificación de las enfermedades del corazón (Braunwald (1992) Text Book of Cardiology 4^{ta} Ed); GPIIbIIIa: glicoproteína IIb/IIIa,

Tabla 2 Valores iniciales característicos de acuerdo con el tercil de la actividad de la sPLA2

	Tercil 1 (0 - 1.7)	Tercil 2 (1.8 - 2.8)	Tercil 3 (≥2.9)	Valor P
Centro de reclutamiento francés (%)	80	59	50	< 0.0001
Sexo masculino (%)	79.3	77.9	74.5	0.6
Edad (Media ±D.E.)	57.2±11.4	60.9 ±13.6	65.1 ±12.9	< 0.0001
Historial médico (%)				
Infarto	26.4	24.3	19.5	0.3
Insuficiencia cardíaca congestiva	2.9	2.9	10.1	0.02
Enfermedad Arterio Coronaria	32.1	27.9	25.5	0.4
Enfermedad cerebrovascular	5.0	5.1	6.7	0.8
Diabetes	16.4	12.5	21.5	0.11
Hipertensión	35.7	42.6	43.6	0.3
Hiperlipidemia	60.7	49.3	40.3	0.003
PCI	22.9	13.2	12.1	0.007
CABG	8.0	9.2	3.9	0.17
Fumador actual o en el pasado (%)	77.1	73.5	68.5	0.3
Índice de diagnóstico (%)				

Índice de diagnóstico (%)				
STEMI	30.0	41.2	43.6	
NSTEMI	57.9	52.2	49.0	0.14
Angina inestable	12.1	6.6	7.4	
Clase de Killip > 1 (%)	8.6	22.8	30.9	< 0.0001
Troponina I ±Media ±D.E.	9.8 ±24.2	24.6 ±68.5	28 ±54.7	0.006
CRP ±Media ±D.E.	9.7 ±14.8	15.6 ±24.4	39.5 ±54.6	< 0.0001
IL18 ±Media ±D.E.	216.9 ±97.6	227.5 ±88.3	229.5 ±99.9	0.5
Colesterol ±Media ±D.E.	220.2 ±56	201.3 ±46	190.5 ±42.7	< 0.0001

Tabla 3. Análisis multivariado de los predictores de muerte, MI y muerte o MI

	R.R	95% C.I		P
MUERTE				
Historial médico de CABG	5.43	2.09	14.3	0.0005
Clase de Killip > 1	7.136	2.861	17.801	<.0001
sPLA2 tercil >=3	2.609	1.066	6.386	0.0358
MI				
Historial médico de insuficiencia cardiaca congestiva	6.02	1.77	20.4	0.004
Creatinina >1.1	9.29	1.19	72.5	0.03
sPLA2 tercil >=3	4.7	1.27	17.5	0.02
Muerte o MI				
Clase de Killip > 1	3.09	1.50	6.30	0.002
Edad ≥60 años	2.96	1.12	7.83	0.03
Historial médico de CABG	3.46	1.34	8.93	0.01
Creatinina > 1.1	3.23	1.22	8.57	0.02
Actividad de la sPLA2, tercer tercil	3.08	1.37	6.91	0.006

5

Tabla 4. Características de la muestra

Centro de reclutamiento francés (%)	63
Sexo masculino (%)	76.6
Edad (Media ± D.E.)	61.1+/-13
Historial médico (%)	
Infarto	22.9
Insuficiencia cardiaca congestiva	5.6
Enfermedad Arterio Coronaria	28.5
Enfermedad cerebrovascular	5.6
Diabetes	16.6
Hipertensión	40.2
Hiperlipidemia	49.6
PCI	16.4
CABG	6.9

Fumador actual o en el pasado (%)	72.9
Índice de diagnóstico (%)	
STEMI	38.5
NSTEMI	52.5
Angina inestable	9.0
Clase de Killip > 1 (%)	20.5
Troponina I ng/ml (Mediana - Intervalo intercuartil)	2.55-17.3
CRP mg/l (Mediana - Intervalo intercuartil)	8.45-15.7
IL18 pg/ml (Mediana- Intervalo intercuartil)	195-120
Colesterol mg/dl (Mediana - Intervalo intercuartil)	197.4-70.4
Creatinina mg/dl (Mediana - Intervalo intercuartil)	1.1-0.26
Actividad de la sPLA2 nmol/min/ml (Mediana - Intervalo intercuartil)	2.3-1.78
Antígeno PLA2 ng/dl (Mediana - Intervalo intercuartil)	279-459

Tabla 5 Asociación entre la actividad de la sPLA2 en el plasma y los valores iniciales de las variables clínicas

		Media (D.E.) de la actividad de la sPLA2	Valor P univariado	Valor P multivariado
Centro de reclutamiento de Escocia		3.07 (1.9)	<0.0001	0.0006
Francia		2.36 (1.5)		
Sexo M		2.59 (1.6)	0.4	
F		2.77 (1.9)		
Edad		*	0.4	0.002
Historial médico				
Infarto	Si	2.48 (1.4)	0.3	
	No	2.67 (1.8)		
Enfermedad Arterio Coronaria	Si	2.47 (1.4)	0.15	
	No	2.7 (1.8)		
Enfermedad cerebrovascular	Si	2.79 (1.3)	0.6	
	No	2.63 (1.7)		
Diabetes	Si	3.03 (2.2)	0.08	
	No	2.55 (1.6)		
Hipertensión	Si	2.81 (1.8)	0.07	
	No	2.51 (1.6)		
Hiperlipidemia	Si	2.36 (1.3)	0.001	0.04
	No	2.88 (1.9)		
PCI	Si	2.33 (1.4)	0.06	
	No	2.69 (1.7)		
CABG	Si	2.33 (1.3)	0.3	
	No	2.65 (1.7)		
Estado del fumador actual o en el pasado		2.58 (1.7)	0.3	
Nunca fumó		2.77 (1.8)		
Índice de diagnóstico				

Índice de diagnóstico				
Infarto de miocardio con elevación del segmento ST		2.99 (2.2)	0.002	0.01
Infarto de miocardio sin elevación del segmento ST		2.42 (1.3)		
Angina inestable		2.31 (1.4)		
Clase de Killip				
1		2.43 (1.5)	<0.0001	0.04
2		3.46 (2.2)		
3		3.24 (1.8)		
Tratamiento dentro de las primeras 24 h en el hospital o uso crónico				
Aspirina	Sí	2.65 (1.7)	0.2	
	No	2.29 (1.2)		
ticlopidina / clopidogrel	Sí	2.54 (1.7)	0.3	
	No	2.70 (1.7)		
Heparina LMW	Sí	2.36 (1.4)	0.001	
	No	2.90 (2.0)		
Heparina no fraccionada	Sí	2.93 (2.0)	0.0008	0.03
	No	2.35 (1.2)		
GPIIb / IIIa	Sí	2.71 (1.9)	0.6	
	No	2.60 (1.6)		
Estatina	Sí	2.53 (1.6)	0.09	
	No	2.84 (1.9)		
Inhibidor de ACE	Sí	2.79 (1.9)	0.3	
	No	2.59 (1.6)		
Beta bloqueador	Sí	2.62 (1.8)	0.5	
	No	2.77 (1.5)		
*Variables con una P<0.05 en el análisis univariado se estudiaron en el análisis multivariable mediante la realización de un análisis de covarianza. *Coeficiente de correlación con sPLA2: 0.2				

Tabla 6 Análisis de supervivencia univariante

	Incidencia acumulada de muerte/MI (S.E)*	Riesgo relativo (intervalo de confianza de 95%)	P
Centro de reclutamiento de Escocia Francia	10.5% (0.02)	1.81 (0.93 - 3.53)	0.08
	6.0% (0.01)		
Sexo			
F	7.9% (0.03)	1.13 (0.53-2.41)	0.7
M	7.7% (0.01)		
Edad			
≥60 años	13.2%(0.02)	5.4 (2.26 - 13)	<0.0001

ES 2 399 726 T3

Edad				
< 60 años		2.3% (0.01)		
Historial médico				
Infarto	Sí	14.9% (0.04)	3.2 (1.65-6.13)	0.0002
	No	5.6% (0.01)		
Insuficiencia cardiaca congestiva	Sí	27.9% (0.09)	4.41 (1.93-10.1)	0.0001
	No	6.5% (0.01)		
Enfermedad Arterio Coronaria	Sí	12.1% (0.03)	2.27 (1.18-4.36)	0.01
	No	6.1% (0.01)		
Enfermedad cerebrovascular	Sí	16.0% (0.07)	2.06 (0.73-5.83)	0.16
	No	7.2% (0.01)		
Diabetes	Sí	12.5% (0.04)	1.95 (0.94-4.05)	0.07
	No	6.8% (0.01)		
Hipertensión	Sí	10.2% (0.02)	1.90 (1.01-3.55)	0.05
	No	6.1% (0.01)		
Hiperlipidemia	Sí	8.8% (0.02)	1.44 (0.74-2.8)	0.28
	No	6.8% (0.02)		
PCI	Sí	4.4% (0.02)	1.6 (0.57-4.52)	0.37
	No	8.4% (0.01)		
CABG	Sí	18.2% (0.07)	2.67 (1.11-6.41)	0.02
	No	6.9% (0.01)		
Estado del fumador				
Nunca fumó		10.6% (0.03)	1.67 (0.86 - 3.27)	0.13
Fumador actual o en el pasado		6.6% (0.01)		
Índice de diagnóstico				
- MI con elevación del segmento ST		9.9% (0.02)	1.93 (0.96 - 3.86)	0.06
- otro		5.7% (0.02)		
Clase de Killip				
>1		21.4% (0.04)	5 (2.62 - 9.7)	<0.0001
1		4.3% (0.01)		
Creatinina				
>1.1		14% (0.02)	6.2 (2.39 - 15.95)	<0.0001
≤1.1		2% (0.01)		
Colesterol total				
≤197		8.4% (0.02)	1.34 (0.59-3.06)	0.5
>197		5.2% (0.02)		
Tratamiento				
Heparina LMW	No	8.7% (0.02)	1.12 (0.57-2.2)	0.7
	Sí	6.8% (0.02)		
Heparina no fraccionada	No	8.4% (0.02)	1.27 (0.64-2.52)	0.5
	Sí	6.8% (0.02)		

Colesterol total				
Revascularización (en el hospital)	No	10.5% (0.02)	2.42 (1.16-5.05)	0.01
	Sí	4.3% (0.01)		
Troponina I				
Tercil 1		6.2% (0.02)	R.R 2,3 vs 1 : 1.39 (0.59-3.30)	0.5
Tercil 2		7.8% (0.02)	R.R 3 vs 1,2 : 1.22 (0.57-2.61)	0.6
Tercil 3		9.4% (0.02)		
CRP				
Tercil 1		7.7% (0.02)	R.R 2,3 vs 1 : 0.99 (0.43-2.3)	0.9
Tercil 2		7% (0.02)	R.R 3 vs 1,2 : 1.28 (0.58-2.81)	0.5
Tercil 3		8.8% (0.02)		
IL18				
Tercil 1		7.3% (0.02)	R.R 2,3 vs 1 : 0.99 (0.43-2.28)	0.9
Tercil 2		7% (0.02)	R.R 3 vs 1,2 : 1.31.(0.6-2.89)	0.5
Tercil 3		9.8% (0.02)		
Antígeno PLA2				
Tercil 1		7.8% (0.02)	R.R 2,3 vs 1 : 1 (0.51-2)	0.9
Tercil 2		5% (0.02)	R.R 3 vs 1,2 : 1.9 (0.96-3.6)	0.06
Tercil 3		11.3% (0.03)		
Actividad de la sPLA2				
Tercil 1		3% (0.01)	R.R 2,3 vs 1 : 1.8 (0.5-6.2)	0.3
Tercil 2		5.1% (0.02)	R.R 3 vs 1,2 : 4.3 (2.1-8.7)	<0.0001
Tercil 3		14.4% (0.03)		
* 6 meses de incidencia acumulada de muerte/MI (error estándar).				

5

Tabla 7 Análisis multivariable de los predictores de muerte o MI.

	R.R	95% C.I	95% C.I	P
Muerte o MI				
Clase de Killip > 1	3.09	1.50	6.30	0.002
Edad ≥60 años	2.96	1.12	7.83	0.03
Historial médico de CABG	3.46	1.34	8.93	0.01
Creatinina > 1.1	3.23	1.22	8.57	0.02
Actividad de la sPLA2, tercer tercil	3.08	1.37	6.91	0.006

Los predictores univariados con una P<0.05 (Tabla 6) se incluyeron en un modelo de regresión de Cox multivariable por etapas. El método de selección fue una selección hacia adelante con un nivel de significación de 0.05 para introducir una variable explicativa en el modelo. El modelo final sólo incluye variables significativas con una P<0.05 por medio del uso de la prueba de Wald.

Tabla 8 Las características de una muestra de 1400 individuos de control y 700 casos de pacientes incluidos en el estudio de EPIC-Norfolk de 1993-2003.

		Controles	Casos
Hombre			
Edad		64±8	64±8

ES 2 399 726 T3

		Controles	Casos
Hombre			
Fumador			
	No	32%	25%
	En el pasado	60%	60%
	Actual	8%	15%
Índice de masa corporal (Kg/m ²)		26±3	27±4
Diabetes		2.4%	7.1%
Presión arterial sistólica		139±17 (mmHg)	144±18
Presión arterial diastólica		85±11	87±11
Colesterol total (mmol/l)		6.1±1.1	6.3±1.1
Colesterol LDL(mmol/l)		4.0±1.0	4.1±1.0
Colesterol HDL (mmol/l)		1.25±0.33	1.16±0.31
Triglicéridos (mmol/l)		1.7 (1.2-2.4)	2.0 (1.4-2.9)
Proteína C-reactiva (mg/ml)		1.4 (0.7-2.9)	2.2 (1.0-4.5)
Mujer			
Edad		67±7	67±7
Fumador			
	No	55%	45%
	En el pasado	37%	40%
	Actual	8%	15%
Índice de masa corporal (Kg/m ²)		26±4	27±5
Diabetes		0.8%	5.5%
Presión arterial sistólica		139±18(mmHg)	143±19
Presión arterial diastólica		82±11	85±12
Colesterol total (mmol/l)		6.6±1.2	6.9±1.3
Colesterol LDL(mmol/l)		4.3±1.1	4.5±1.1
Colesterol HDL (mmol/l)		1.59±0.4	1.45±0.39
Triglicéridos (mmol/l)		1.5 (1.1-2.2)	1.8 (1.3-2.6)
Proteína C-reactiva (mg/ml)		1.6 (0.8-3.5)	2.6 (1.1-5.8)

REIVINDICACIONES

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
1. Un método para determinar un aumento del riesgo de mortalidad o de infarto de miocardio en un paciente en donde se ha diagnosticado la aparición de los síntomas isquémicos, que comprende:
 - determinar la actividad de la fosfolipasa A2 (sPLA2) secretora en una muestra biológica de dicho paciente,
 - comparar dicha actividad con un valor predeterminado, en donde dicho valor predeterminado se corresponde con una actividad de sPLA2 comprendida en el intervalo de actividad de la sPLA2 de las dos terceras partes de los individuos que tienen la más alta actividad sPLA2 en relación con todos los individuos que constituyen una población dada de individuos que no presentan ningún síntoma de afección por aterosclerosis o enfermedades cardíacas y/o vasculares relacionadas, una mayor actividad de sPLA2 de dicho paciente en comparación con dicho valor predeterminado es indicativo de un aumento del riesgo de mortalidad o de infarto de miocardio.

 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se ha diagnosticado que el paciente presenta uno de los siguientes trastornos coronarios:
 - trastornos isquémicos crónicos sin necrosis miocárdica, tal como la angina de pecho estable o de esfuerzo,
 - trastornos isquémicos agudos sin necrosis miocárdica, tal como la angina de pecho inestable,
 - trastornos isquémicos con necrosis miocárdica, tal como el infarto de miocardio con elevación del segmento ST o el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST.

 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 1.8 nmoles/ml/min, particularmente mayor que aproximadamente 2 nmoles/ml/min, más particularmente mayor que aproximadamente 2.5 nmoles/ml/min, preferentemente mayor que aproximadamente 2.9 nmoles/ml/min, y con mayor preferencia mayor que 3.3.

 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la actividad sPLA2 se mide en una muestra biológica, particularmente una muestra de suero o una de plasma, y más particularmente una muestra de plasma heparinizado.

 5. Un método in vitro o ex vivo para el diagnóstico de infarto de miocardio en un paciente, que comprende:
 - determinar la actividad de la sPLA2 de dicho paciente,
 - comparar dicha actividad con un valor predeterminado, en donde dicho valor predeterminado se corresponde con una actividad de la sPLA2 comprendida en el intervalo de actividad de la sPLA2 de las dos terceras partes de los individuos que tienen la más alta actividad sPLA2 en relación con todos los individuos que constituyen una población dada de individuos que no presentan ningún síntoma de afección por aterosclerosis o enfermedades cardíacas y/o vasculares relacionadas,
 una mayor actividad de la sPLA2 de dicho paciente, en comparación con dicho valor predeterminado es indicativo de infarto de miocardio, en donde se ha diagnosticado la aparición de los síntomas isquémicos en dicho paciente.

 6. Un método in vitro o ex vivo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde una mayor actividad de la sPLA2 de un paciente en comparación con un valor predeterminado es indicativo de la afección de dicho paciente con infarto de miocardio en el momento en que se hace la determinación de la actividad de la sPLA2 de dicho paciente, o es indicativo de una futura afección de dicho paciente con un infarto de miocardio, particularmente más de 72 después de la hora en que se realiza la determinación de la actividad de sPLA2 de dicho paciente.

 7. Un método in vitro o ex vivo de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde la actividad de la sPLA2 del paciente es mayor que aproximadamente 1.8 nmoles/ml/min, particularmente mayor que aproximadamente 2 nmoles/ml/min, más particularmente mayor que aproximadamente 2.5 nmoles/ml/min, preferentemente mayor que aproximadamente 2.9 nmoles/ml/min, y con mayor preferencia mayor que 3.3 nmoles/ml/min.

 8. Un método in vitro o ex vivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la actividad sPLA2 se mide en una muestra biológica, particularmente una muestra de suero o una de plasma, y más particularmente una muestra de plasma heparinizado.

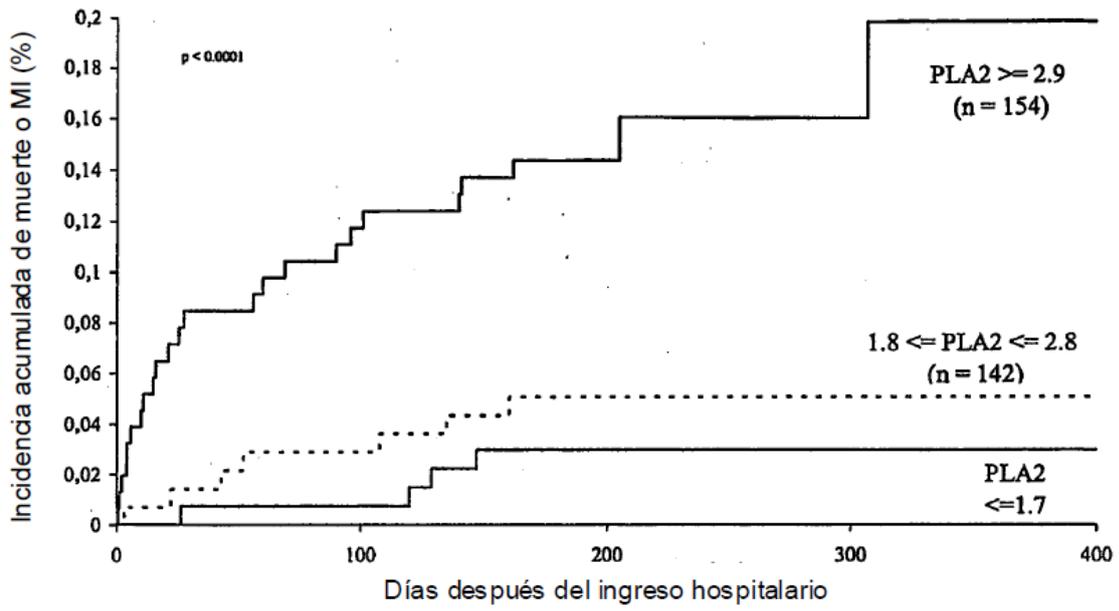


Figura 1

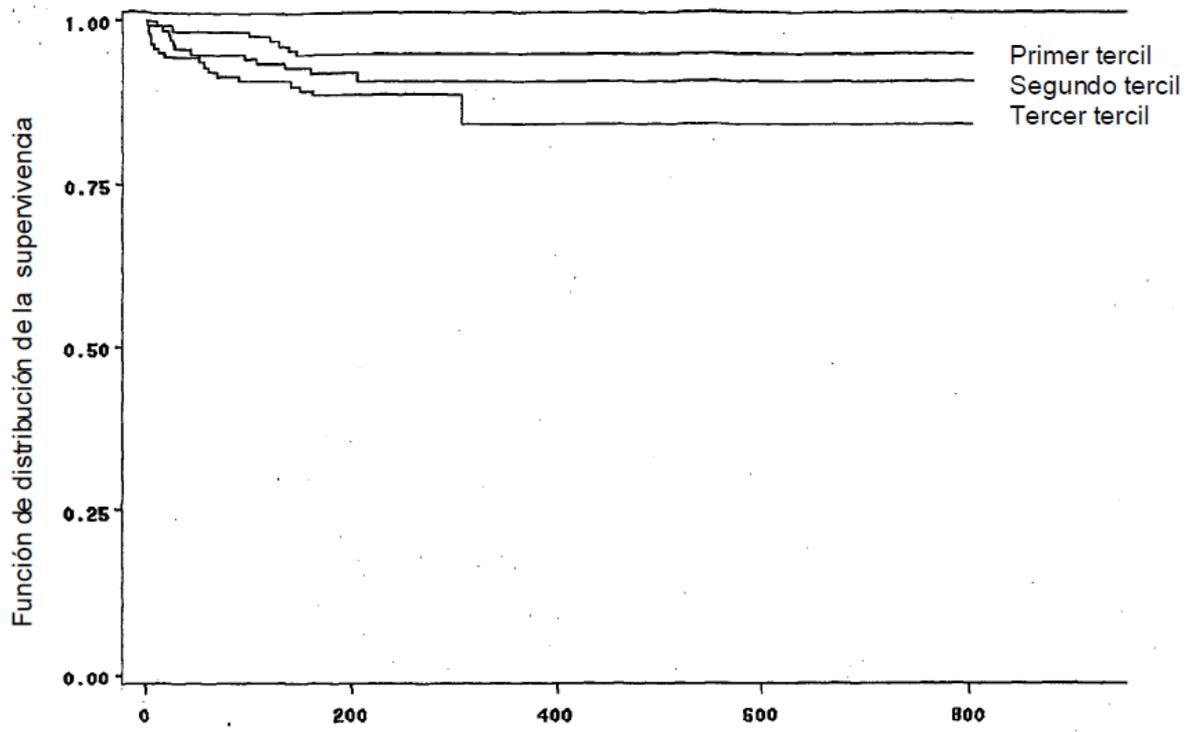


Figura 2