

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 567**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2004** **E 10186331 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2317324**

54 Título: **Método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar insuficiencia cardíaca determinando el nivel de galectina-3 o trombospondina-2**

30 Prioridad:

09.10.2003 EP 03078161

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

03.03.2015

73 Titular/es:

MAASTRICHT UNIVERSITY (100.0%)
Minderbroedersberg 4-6
6211 LK Maastricht , NL

72 Inventor/es:

PINTO, YIGAL M

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 530 567 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

Método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar insuficiencia cardíaca determinando el nivel de galectina-3 o trombospondina-2.

5 La presente invención se refiere a un método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo, tal como insuficiencia cardíaca congestiva.

10 La insuficiencia cardíaca (HF) congestiva es un síndrome clínico común pero grave y complejo, especialmente entre personas ancianas, caracterizado por una función contráctil cardíaca disminuida y menor tolerancia al ejercicio, dando como resultado un deterioro gradual del paciente que conduce a menudo a mortalidad cardiovascular. De este modo, un gran número de pacientes muere en uno a cinco años después del diagnóstico. Sin embargo, aunque un número importante de pacientes evoluciona para desarrollar complicaciones potencialmente mortales, otros pueden permanecer estables durante períodos prolongados.

15 Puesto que la identificación temprana de pacientes susceptibles de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo, tal como insuficiencia cardíaca, puede prevenir la progresión rápida, sería preferible ser capaces de identificar aquellos pacientes en los que es probable que se produzca la insuficiencia cardíaca antes de que lo haga realmente. Además, sería preferible ser capaces de identificar aquellos pacientes que sufren insuficiencia cardíaca que son susceptibles de desarrollar complicaciones graves.

Los métodos actuales pueden descartar de forma fiable la insuficiencia cardíaca, pero no pueden demostrar creíblemente la existencia de insuficiencia cardíaca, ni pueden predecir el resultado de insuficiencia cardíaca consolidada, o requieren un equipo caro y personal entrenado específicamente para hacerlo.

20 Por lo tanto, existe la necesidad de un método simple y fiable para predecir la probabilidad del comienzo de insuficiencia cardíaca, y para predecir el resultado de la insuficiencia cardíaca ya consolidada.

25 El objeto de la presente invención es proporcionar un método mediante el cual se pueden identificar pacientes que son particularmente susceptibles de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo, tal como insuficiencia cardíaca, o que son particularmente susceptibles de desarrollar complicaciones de la insuficiencia cardíaca. Después de la identificación, estos pacientes se pueden tratar, por ejemplo, antes de que se produzca la insuficiencia cardíaca o sus complicaciones, lo que sería de gran importancia clínica.

Esto se logra mediante la invención proporcionando un método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo, que comprende las etapas de:

- (a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto;
- 30 (b) determinar el nivel de al menos un marcador no miocítico en dicha muestra;
- (c) comparar el nivel de dicho marcador con un nivel estándar y
- (d) determinar si el nivel del marcador es indicativo de un riesgo de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo.

35 En la investigación que condujo a la presente invención, se identificaron marcadores específicos, que se pueden usar para predecir qué corazones hipertrofiados son propensos a la insuficiencia.

40 Finalmente, se sabe que la hipertensión provoca hipertrofia cardíaca, que es uno de los factores de riesgo más importantes para la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, no todos los corazones hipertrofiados fallarán en última instancia. Estas observaciones sugieren que, durante la progresión desde hipertrofia cardíaca compensada hasta la insuficiencia, se reclutan mecanismos adicionales, además de aquellos que provocan la hipertrofia. Aunque estudios recientes han dado a conocer muchos cambios moleculares y celulares que subyacen a la hipertrofia cardíaca (Lorell BH et al., *Circulation* 102: 470-479, 2000; Panidis et al., *J Am Coll Cardiol* 3: 1309-1320, 1984), los factores adicionales que contribuyen a la insuficiencia cardíaca han permanecido inciertos hasta ahora.

45 Por ejemplo, Boluyt y colaboradores han documentado el aumento de genes que codifican componentes de la matriz extracelular (ECM) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con insuficiencia cardíaca (Boluyt et al., *Cardiovasc Res* 46: 239-249, 2000; *Hypertension* 30: 1362-1368, 1997; *Cardiovasc Res* 30: 836-840, 1995; *Eur Heart J* 16 suppl. N: 19-30, 1995). Sin embargo, no está claro si la sobreexpresión de estos genes precedió al síndrome clínico evidente de insuficiencia cardíaca, o si su sobreexpresión fue más bien una consecuencia de un proceso consolidado de insuficiencia activa.

50 También se han empleado otros varios enfoques no sesgados para identificar mecanismos específicos para insuficiencia cardíaca (Korstin S et al., *Circ Res* 92: 715-724, 2003; Hein S et al., *Circulation* 107: 984-991, 2003). Además, estudios recientes han sugerido que se activan específicamente mecanismos inmunitarios en corazones

con insuficiencia (Vasan RS et al., Circulation 107:1486-1491, 2003).

Sin embargo, estos estudios previos comparan a menudo un miocardio de etapa final y tratado con fármacos con un miocardio normal. Por lo tanto, las diferencias obtenidas pueden ser secundarias a la insuficiencia y su tratamiento, y tales estudios no identifican así los factores que pueden conducir a la insuficiencia de un corazón hipertrofiado compensado, que se pueden usar como un marcador para identificar pacientes en riesgo.

En la investigación que condujo a la presente invención, se comparó el perfil de expresión génica de un gran número de genes procedentes de corazones hipertrofiados con insuficiencia, con corazones hipertrofiados que permanecieron compensados. De este modo, se identificaron genes que se expresaron diferencialmente en corazones hipertrofiados con insuficiencia frente a corazones hipertrofiados compensados. En particular, la presente invención, se basa en el hallazgo de que genes no miocíticos particulares son expresados anormalmente en tejido cardíaco enfermo (Ejemplo 1 y 2).

Según la presente invención, se hace uso de marcadores no miocíticos. Esto es, marcadores que derivan de células distintas de miocitos cardíacos. Esto tiene la ventaja de que el método de la invención "sonda" otros procesos distintos de los cambios miocíticos conocidos que se producen en miocitos estresados. Esto abre la oportunidad no sólo de diagnosticar insuficiencia cardíaca, sino también de monitorizar continuamente pacientes con insuficiencia cardíaca conocida, es decir, monitorizar si se producen procesos no miocíticos adversos (por ejemplo inflamación, cicatrización, etc.) que pueden presagiar sucesos adversos importantes.

Según el método de la presente invención, se toma una muestra biológica de un paciente individual. Subsiguientemente, se mide el nivel de uno o más marcadores en dicha muestra mediante técnicas bien conocidas. Típicamente, el nivel se compara con un nivel estándar para determinar si el nivel del marcador es indicativo del potencial del individuo para desarrollar insuficiencia cardíaca. El nivel estándar se basa en el nivel de dicho marcador en sujetos sanos. Si el nivel del marcador es elevado en comparación con el nivel estándar, el sujeto es susceptible de desarrollar CHF o desarrollar complicaciones de insuficiencia cardíaca.

La muestra biológica puede ser cualquier muestra de fluido corporal, tal como sangre, plasma, suero, orina, etc., o muestra de tejido, tal como una biopsia cardíaca. Según una realización preferida de la invención, sin embargo, la muestra biológica es una muestra de plasma derivada de sangre periférica. Las muestras de sangre periférica se pueden tomar fácilmente de los pacientes, y no necesitan procedimientos invasivos complejos tales como cateterización. La muestra biológica se puede procesar según técnicas bien conocidas para preparar la muestra para el ensayo.

Según una realización preferida de la invención el marcador es una proteína. El nivel de proteínas se puede determinar fácilmente por métodos simples y fiables, tales como métodos inmunológicos que usan anticuerpos específicos contra las proteínas.

Preferiblemente, la proteína es galectina-3, puesto que se ha demostrado que el nivel de galectina-3 se expresa temprana y específicamente en corazones propensos a la insuficiencia.

Según otra realización preferida de la invención, la proteína es trombospondina-2. Se ha demostrado que el aumento de la expresión cardíaca de TSP2 identifica a aquellos corazones hipertrofiados que son propensos a desarrollar insuficiencia cardíaca evidente.

El nivel de los marcadores se puede determinar mediante cualquier método adecuado bien conocido. Preferiblemente, el nivel del marcador se mide mediante un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), proporcionando así un método simple, reproducible y fiable.

La presente invención se refiere además al uso de uno o más marcadores no miocíticos para identificar un sujeto susceptible de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo, tal como insuficiencia cardíaca congestiva. Según la invención, se pueden usar varios marcadores no miocíticos. Preferiblemente, el marcador es galectina-3 y/o trombospondina-2.

Los marcadores identificados según la presente invención se pueden usar además en la prevención y/o tratamiento de daño de órgano diana hipertensivo, en particular para la prevención y/o tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva. Por ejemplo, la inhibición de la galectina-3 por acción de, por ejemplo, anticuerpos, y/o la activación de TSP-2 por acción de moduladores adecuados pueden ser beneficiosas para evitar que se produzca una insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, la presente invención se refiere además al uso de galectina-3 y/o moduladores de esta para la fabricación de un medicamento con el fin de prevenir y/o tratar el daño de órgano diana hipertensivo. La invención también se refiere al uso de trombospondina-2 y/o moduladores de esta para la fabricación de un medicamento con el fin de prevenir y/o tratar el daño de órgano diana hipertensivo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos y Figuras.

La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas para la implementación de protocolos estadísticos dados a conocer previamente y los puntos de corte comprensivos para la minería de datos. El filtrado de datos de múltiples etapas estrechó los números de genes expresados diferencialmente en ratas susceptibles a insuficiencia cardíaca hasta 49. HF-S, ratas susceptibles a insuficiencia cardíaca; EST's, etiquetas de secuencias extendidas.

La Figura 2 muestra los resultados de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de transcritos de ARNm de cuatro genes seleccionados en biopsias miocárdicas tomadas de ratas de 10 semanas, (a) TSP2 se sobreexpresó significativamente en aquellas ratas que más tarde evolucionaron a descompensación cardíaca rápida en comparación con aquellas que siguieron compensadas durante el período de estudio de 17 semanas, (b) expresión de osteoactivina, (c) expresión de colágeno VI, (d) nivel de expresión del péptido natriurético de cerebro. Los datos se normalizaron al gen de mantenimiento, ciclofilina. Comp, compensada; Decom, descompensada. *, $p < 0,01$ grupos compensados frente a descompensados; __, $p < 0,05$ SD frente a ratas Ren-2; $n = 4$ cada grupo.

La Figura 3 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones tras la inducción de infarto de miocardio. Todos los ratones carentes de TSP2 (línea discontinua) murieron en 72 horas después de la cirugía ($n = 16$). Excluyendo la muerte post-operatoria inmediata, no se observó mortalidad en ratones de tipo salvaje (línea continua) ($n = 22$).

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra los resultados del análisis densitométrico de contenido de colágeno miocárdico en el día 0 y 48 horas después de MI (10 campos aleatorios por sección). Los ratones carentes de TSP2 fracasaron a la hora de montar una fibrosis reactiva 48 horas después de MI en comparación con los ratones de tipo salvaje. *, $p < 0,01$, razas de tipo salvaje frente a carentes 48 horas después de MI; __, $p < 0,01$, día 0 frente a 48 horas después de MI en ratones de tipo salvaje.

La Figura 5 muestra micrografías electrónicas y fotomicrografías de la pared ventricular izquierda infartada. La sección teñida con hematoxilina/eosina muestra la matriz intacta alrededor del vaso sanguíneo sin signos de hemorragia intersticial en ratones de tipo salvaje (a). Destrucción de tejido extensa y hemorragia intersticial (*) en ratones TSP^{-/-} (b). Micrografías electrónicas de la pared ventricular izquierda infartada (rata de tipo salvaje) (c). Obsérvese la arquitectura vascular y de matriz relativamente bien mantenida. Secciones de ratones carentes de TSP2 mostraron daño extendido de la matriz miocárdica y hemorragia (*) en áreas intersticiales (d).

La Figura 6 muestra los parámetros hemodinámicos de ratas tratadas con HF-S, HF-R y ARB. Evaluación hemodinámica de ratas transgénicas Ren-2 con o sin administración de ARB (0,05 mg/kg/día de candesartán a partir de 7-11 semanas). A, LVW/BW(%), una medida representativa de la hipertrofia ventricular izquierda. B, LW/BW(%), indica el desarrollo de insuficiencia cardíaca congestiva, y C, LVEDP muestra el grado de disfunción diastólica. Tanto los animales de HF-S como HF-R tuvieron hipertrofia ventricular izquierda. Los animales con una puntuación elevada de fibrosis tuvieron mayores LW/BW y LVEDP. Los parámetros se midieron antes del sacrificio. $n = 4$ cada uno para HF-S y HF-R y 8 para ARB. *, $P < 0,05$ en HF-S frente a HF-R y ARB.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis de la fracción volumétrica de colágeno ventricular izquierdo de secciones teñidas con rojo Picrosirius de miocardio de rata. El diagrama de barras muestra la cuantificación del colágeno intersticial del colágeno LV. 1, control; 2, HF-R; 3, HF-S; 4, ARB. $n = 4B6$ cada grupo; #, $P < 0,01$ frente a control; *, $P < 0,05$ HF-S frente a HF-R; **, $P < 0,05$ en HF-R frente a SD.

La Figura 8 muestra una transferencia de punto de genes expresados diferencialmente en ratas Ren-2. El nivel de ARNm de galectina-3 se comparó entre el grupo de ratas tratado con HF-S, HF-R y ARB. La densidad y diámetro de los puntos corresponden directamente al nivel de expresión génica en comparación con los controles SD. A, imágenes escaneadas del formador de imágenes Phosphor de ratas tratadas con HF-S, HF-R y ARB, respectivamente. Los puntos en círculo representan la expresión de ARNm de galectina-3. B, diagrama de barras que muestra la cantidad de galectina-3 cuantificada en unidades densitométricas. $n = 2$, cada grupo y cada muestra se puntuó por duplicado.

Figura 9. Inmunotransferencia para galectina-3, ciclina D1 y E2F-1. Niveles de expresión en homogenados miocárdicos de rata de galectina-3: A1, transferencia representativa; A2, cuantificación en unidades densitométricas normalizada a GAPDH; ciclina D1: B1, transferencia representativa; B2, cuantificación en unidades densitométricas normalizada a GAPDH.

La Figura 10 demuestra la colocalización inmunohistoquímica de galectina-3, macrófagos y MHC-II. Secciones paralelas obtenidas del miocardio de ratas HF-S teñidas con A, anticuerpo monoclonal de ratón anti-galectina-3 contrateñido con hematoxilina; B, anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD68 específico de

macrófagos; C, anticuerpo monoclonal de ratón OX-6 frente a antígeno de MHC-II. Un campo microscópico diferente muestra la infiltración densa de macrófagos, D. Se observó escasamente (E) infiltración de macrófagos en animales HF-R, y morfología miocárdica bien conservada en controles SD, F.

Figura 11. Evaluación electro- y ecocardiográfica de LVH y HF en sujetos humanos, y PCR en tiempo real cuantitativa para evaluar la expresión del gen de galectina-3 miocárdica. A, hipertrofia ventricular izquierda evaluada mediante el criterio de Skowlow y Lyon (SV1+RV5 >35 mm). EF menor de 55% se considera un estado descompensado. B, PCR en tiempo real, que usa sonda de galectina-3 humana. Caracterización de la expresión del gen de galectina-3 en biopsias de miocardio humano. Los resultados se normalizaron al gen de mantenimiento, ciclofilina. N=6, *, P< 0,05 HF frente a LVH.

La Figura 12 muestra la expresión de ARNm de galectina-3 en biopsias de 10 semanas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Trombospondina-2: La expresión incrementada identifica hipertrofia cardíaca propensa a insuficiencia.

La hipertrofia cardíaca aumenta el riesgo de insuficiencia cardíaca (HF), pero hasta ahora ha sido difícil predecir qué miocardio hipertrofiado evolucionará rápidamente a HF. Según la presente invención, se razonó que, además de los genes relacionados con la hipertrofia, genes distintos relacionados con la insuficiencia son expresados antes de que la insuficiencia sea manifiesta, permitiendo así la predicción molecular de los corazones hipertrofiados susceptibles a insuficiencia. Se comparó la expresión del gen cardíaco (12.336 clones) de ratas homocigotas hipertensas que sobreexpresan renina (Ren-2), que evolucionaron a HF a las 12-14 semanas, con la expresión de crías de la misma camada que permanecieron compensadas durante 17 semanas. Las biopsias cardíacas tomadas en la etapa de hipertrofia compensada (10 semanas) permitieron a los inventores ensayar si la expresión alterada de genes identificados antecedió a la progresión posterior a HF. Se identificaron 49 genes que se sobreexpresaron en el miocardio de HF, de los cuales los genes de la matriz comprendían el grupo más grande. La trombospondina-2 (TSP2) se sobreexpresó selectivamente sólo en biopsias de ratas que evolucionaron más tarde a HF, mientras que el péptido natriurético de cerebro (BNP) era elevado en todas las ratas en esta etapa temprana. Para ensayar los efectos de la ausencia de TSP2 en la matriz cardíaca, se indujo infarto de miocardio (MI) en ratones carentes de TSP2; este procedimiento dio como resultado la ruptura cardíaca en todos los ratones carentes de TSP2, pero en ninguno de los ratones de tipo salvaje (WT). En conclusión, TSP2 se identificó como un regulador nuevo y crucial de la integridad de la matriz cardíaca.

Materiales y métodos

Ratas transgénicas y estudios hemodinámicos.

Se obtuvieron ratas Ren-2 homocigotas del Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlín, Alemania. Se estudiaron 30 ratas Ren-2 macho con un antecedente de Sprague Dawley (SD) y 9 ratas SD de edad equivalente, como controles. De 30 ratas Ren-2, 8 se sacrificaron a las 10 semanas, y 8 se trataron con 0,05 mg/kg/día de candesartán, un bloqueador del receptor de angiotensina II tipo I (ARB), de 7-13 semanas. De las 14 ratas Ren-2 sin tratar que quedan, 6 se sacrificaron a las 13 semanas al desarrollar signos clínicos de insuficiencia cardíaca, y se denominaron ratas HF-S. Las 8 ratas Ren-2 que quedan se monitorizaron con atención y se sacrificaron a las 17 semanas, cuando todavía no habían aparecido signos clínicos de insuficiencia. A estas ratas se les denominó ratas HF-R. Los parámetros hemodinámicos se determinaron antes del sacrificio, y el peso del corazón, de los pulmones y peso corporal se midieron después del sacrificio. El procedimiento de cuidado y tratamiento de los animales fue aprobado por el comité de cuidados animales institucional.

Biopsias de ratas Ren-2 de 10 semanas

Se anestesió un segundo grupo de 12 ratas Ren-2 y 4 ratas SD, y se afeitó el tórax anterior en el esternón. Las ratas se fijaron a un tablero duro en la parte superior de una almohadilla calefactora con la ayuda de lazos hechos por nosotros. Se colocó en la tráquea una aguja roma de calibre 20, para que sirva como cánula traqueal. La cánula se conectó a un respirador para roedores de volumen cíclico (modelo 683. Harvard Apparatus, South Natick, MA) en aire ambiente, con un volumen corriente de 2,5 a 3 ml y una frecuencia respiratoria de 80 respiraciones/min. Se llevaron a cabo otros procedimientos con ayuda visual de un microscopio microdisecionador. Se realizó una incisión de 5 mm en el espacio intercostal 4° izquierdo, para tener acceso al tórax. Después de tener una visión clara del corazón, se tomó una biopsia usando una aguja de 0,35 mm hecha a medida, conectada a un taladro que gira lentamente. Todo el procedimiento duró aproximadamente 15 minutos. De las 9 ratas Ren-2 que sobrevivieron a la operación, 5 desarrollaron insuficiencia cardíaca entre 12 y 14 semanas, mientras que las cuatro ratas restantes

permanecieron compensadas hasta las 17 semanas.

Aislamiento de ARN y transcripción inversa

- 5 Se aisló ARN de los ventrículos izquierdos con un kit RNeasy Mini Kit, siguiendo el protocolo RNeasy Mini Protocol (QIAGEN, Hilden, Alemania), y se almacenó a -80°C. La calidad del extracto se midió usando el nanoensayo de ARN total eucariota en un 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos). El ARN se aisló de biopsias de corazón de rata de 10 semanas con el kit PicoPure ARN Isolation Kit (Arcturus, CA, USA), según las instrucciones del fabricante. El ARN se transcribió en ADNc con transcriptasa inversa, usando 250 ng de cebadores aleatorios (Invitrogen Life Technologies, Breda, Países Bajos).

Micromatrices de ADNc

- 10 Los clones de ADNc aislados de una librería de ADNc de rata normalizada se escogieron para análisis en micromatrices usando una librería de ADNc de rata Incyte GEM-2/GEM-3 (total 12.336 genes). Los insertos amplificados mediante PCR de cada ADNc se imprimieron como matrices de alta densidad sobre superficies de vidrio tratadas. Se llevaron a cabo hibridaciones duplicadas en estos elementos de matriz con ARNm de miocardio de dos ratas SD y seis ratas Ren-2, en 3 puntos de tiempo diferentes. Se llevó a cabo la transformación logarítmica de los valores a fin de homogeneizar los datos, y sólo se consideraron expresadas diferencialmente aquellas diferencias en la expresión de >1,7 veces. Se adoptó el protocolo para la minería de datos y su validación, como se detalla previamente (Tan et al., Proc Natl Acad Sci. 99: 11387-11392, 2002; Bandman et al., Ann NY Acad Sci., 975: 77-90, 2002).

Secuenciación, manchado de la membrana, e hibridación de ADNc para macromatrices

- 20 Los clones de los genes expresados diferencialmente, identificados mediante micromatriz, se obtuvieron de Incyte Genomics y se secuenciaron con un cebador 5'-GGTGACACTATAGAAGAGC-3' (Eurogentec, Seraing, Bélgica). Después de confirmar la identidad mediante secuenciación, los insertos plasmídicos se amplificaron mediante una reacción de PCR con los cebadores 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' y 3'-ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5'. Cada clon se manchó entonces por duplicado en membranas de nylon (macromatriz). Las transferencias de punto se escanearon con un formador de imágenes personal fx-fosfo imager (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA). Las señales de hibridación individuales se identificaron y cuantificaron densitométricamente usando el software Quantity One, versión 4.2.3 (BioRad, Munich, Alemania). Como gen de mantenimiento para la normalización interna de las transferencias, se seleccionó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Análisis bioinformático

- 30 Se llevó a cabo el análisis bioinformático de las secuencias proteicas traducidas de 49 genes candidatos específicos de HF, seleccionados del análisis de micromatrices y la estrategia de minería de datos de múltiples etapas. Basándose en las anotaciones de sus funciones biológicas, se escogieron tres genes candidatos, previamente no identificados en miocardio, y que codifican proteínas relacionadas con la matriz, para el ensayo posterior mediante PCR en tiempo real.

35 Cebadores, sondas y PCR en tiempo real

- Los cebadores y las sondas se diseñaron a partir de secuencias de rata disponibles en GenBank™ usando el Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las sondas se diseñaron a partir de sitios de empalme de exones conservados derivados de Ensembl-Mouse Genome Sequencing Consortium y Ensembl-Human Genome Browser, evitando así el reconocimiento por el ensayo de cualquier ADN genómico potencialmente contaminante (Tabla 1). Se encontró que las condiciones de PCR óptimas son 12,5 μ l 2x PCR Master Mix para ensayos Taqman™, con una concentración final de 5mM de MgCl₂, 300 nM de cada cebador, 200 nM de sonda, y 10 ng de molde de ADNc, en un volumen total de 25 μ l. La amplificación y la detección se llevaron a cabo usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los datos de PCR se dieron con relación al nivel de expresión del gen de mantenimiento, ciclofilina A.

45 MI experimental y morfometría en ratones TSP2^{-/-}

- Se indujo infarto de miocardio en 22 ratones de tipo salvaje (raza 129 SvJ) y 16 ratones mutantes carentes de TSP2 (TSP2^{-/-}) ocluyendo la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Como controles, se usaron dos ratones operados falsamente. Estos ratones se eutanasiaron, después de la anestesia con éter, inyectando 1 ml de CdCl₂ 0,1 M en la vena cava. El corazón se fijó para perfusión con formalina tamponada al 5% durante 10 minutos, y se fijó para inmersión toda la noche en formalina tamponada al 10%. Las muestras de tejido de los ratones de tipo salvaje y TSP2^{-/-} se evaluaron usando técnicas microscópicas electrónicas estándar. Para cuantificar el grado de fibrosis, se llevó a cabo una planimetría computerizada en siete campos seleccionados aleatoriamente por sección. Cada campo representó un área de 400 μ m². El área de colágeno se cuantificó selectivamente a partir del intersticio ventricular izquierdo, excluyendo el colágeno perivascular y epicárdico. La fracción de área de colágeno se calculó

como la relación de área teñida por rojo Picrosirius a área miocárdica total por campo. Los detalles del procedimiento se han dado a conocer previamente (Cherayil et al., Proc Natl Acad Sci USA, 87:7324-7328, 1990; Cleutjens et al., Am J pathol., 147: 325-338, 1995).

Análisis estadísticos

- 5 Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM. Los datos para cada grupo de estudio (grupo tratado con candesartán y dos grupos de ratas transgénicas para renina sin tratar) se compararon usando el análisis de varianzas de una vía (ANOVA) en combinación con un análisis post-hoc de Dunnett, para corregir múltiples comparaciones. Como cohorte de control interno, se usaron ratas SD. Los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

10 Resultados

Transición rápida a insuficiencia cardíaca evidente, y muerte en un subconjunto de ratas Ren-2

- Se observaron los ventrículos izquierdo y derecho hipertrofiados en las 8 ratas que se sacrificaron a las 10 semanas, y también en otras ratas sin tratar que se sacrificaron en fechas más tardías. No se observó LVH en los controles de SD. Seis de 14 ratas Ren-2 en placebo pasaron rápidamente a HF clínica evidente entre 12 a 14 semanas, y
15 tuvieron índices funcionales cardíacos deprimidos en comparación con las 8 ratas que permanecieron compensadas durante el período de observación de 17 días. Se observó efusión pleural y caída repentina en $dP/dt_{\max}$ en ratas HF-S; estos cambios no fueron manifestados en ratas HF-R (Tabla 2). El bloqueo de angiotensina II evitó completamente el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíacas (peso de LV/peso corporal %, $2,52 \pm 0,36$, $dP/dt_{\max}$, 8400 ± 202) cuando se evaluó en animales sacrificados a las 13 semanas.

- 20 La micromatriz reveló 49 genes sobreexpresados en ratas susceptibles a insuficiencia cardíaca

- Para el análisis de micromatriz, se examinó en primer lugar la variabilidad biológica en la expresión génica entre los grupos HF-S y HF-R. Los niveles de expresión de la mayoría de los genes en los dos grupos HF-S y HF-R fueron muy similares. De un total de 12.336 genes perfilados para la expresión, sólo 49 genes sobrevivieron la estrategia de minería de datos de múltiples etapas (Figura 1) y se sobreexpresaron en ratas HF-S. La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) trans-hidrogenasa fue el único gen con expresión reducida en miocardio con insuficiencia. De
25 forma notable, se incrementó la expresión de osteoactivina, TSP2, varios procolágenos y trombospondina-1. Muchos de los genes identificados codifican proteínas con funciones conocidas, mientras que otros corresponden a genes de función desconocida, incluyendo nuevos genes y genes no detectados previamente en el corazón.

El análisis bioinformático señaló tres nuevos genes relacionados con la matriz cardíacos

- 30 Puesto que no existe información en cuanto a la función de muchos de los genes sobreexpresados en HF, se sometió a los 49 genes a un análisis bioinformático. Inicialmente, se realizó una clasificación funcional amplia de los genes de susceptibilidad a HF usando el sistema GeneFIND (Gene Family Identification Network Design) (<http://www-nbrf-georgetown.edu>), que combina varias herramientas de búsqueda/alineamiento para proporcionar una familia génica rápida y exacta. Esta estrategia indicó que la mayoría de los genes sobreexpresados codifican
35 proteínas relacionadas con la matriz. De forma notable, las funciones de 3 genes de susceptibilidad seleccionados (osteoactivina, trombospondina-2 y colágeno VI) no se dieron a conocer previamente en el miocardio.

La micromatriz mostró normalización de genes de susceptibilidad a HF mediante bloqueo de angiotensina II

- Para confirmar el papel de la activación del sistema de renina-angiotensina (RAS) en este modelo de insuficiencia cardíaca conducido por angiotensina, se volvió a evaluar la expresión de los genes diana identificados por la
40 micromatriz después de tratar un subgrupo de ratas Ren-2 con una dosis sub-presora de candesartán de 7 a 13 semanas. Además de mejorar la hemodinámica, el tratamiento con ARB evitó la sobreexpresión de todos los genes candidatos relacionados con HF (datos no mostrados).

La biopsia de miocardio a las 10 semanas mostró aumento de TSP-2 en ratas que más tarde evolucionaron rápidamente a HF

- 45 Para evaluar el estado de expresión de los 3 genes relacionados con la matriz en el miocardio antes de que HF se hiciera hemodinámica y clínicamente manifiesta, se desarrolló una técnica para obtener biopsias cardíacas en el corazón de rata que late espontáneamente. Después de la biopsia, se dejó que la rata se recuperara para determinar si demuestra ser resistente o susceptible a insuficiencia cardíaca. Este nuevo enfoque nos permitió establecer los niveles de expresión génica antes de que la insuficiencia fuese aparente. La expresión de TSP2
50 aumentó significativamente en la etapa de hipertrofia temprana (10 semanas) sólo en aquellas ratas que desarrollaron decompensación cardíaca rápida en 12-14 semanas (Figura 2a), mientras que no aumentó en esta etapa en las ratas que subsiguientemente siguieron compensadas, ni en corazones de ratas de control no transgénicas. Los niveles de expresión de otros genes candidatos relacionados con HF, tales como osteoactivina

(Figura 2b) y colágeno VI (Figura 2c), aumentaron en la etapa de hipertrofia temprana tanto en las ratas que después tuvieron insuficiencia, como en aquellas que siguieron compensadas en comparación con los controles. De forma importante, el marcador ampliamente usado de hipertrofia e insuficiencia cardíaca aumentó en la biopsia de 10 semanas en todas las ratas, independientemente de la compensación posterior o insuficiencia, y por lo tanto no pudo distinguir ratas propensas a la insuficiencia de ratas resistentes a la insuficiencia (Figura 2d). Según los estudios de micromatriz iniciales, la expresión de estos 3 genes aumentó adicionalmente en más de 2 veces de sus niveles de expresión de 10 semanas con el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Las ratas compensadas, a pesar de tener osteoactivina, colágeno VI y BNP elevados a las 10 semanas, no tuvieron un incremento significativo adicional en los niveles de expresión de estos genes al sacrificarlas a las 17 semanas (datos no mostrados).

Los ratones sin TSP-2 (TSP^{-/-}) no pueden sobrevivir al infarto de miocardio agudo

En contraste con diversos modelos de rata de insuficiencia cardíaca, no hay modelos de ratón cuidadosamente documentados que desarrollen consistentemente insuficiencia cardíaca en respuesta a sobrecarga de presión. Por lo tanto, se infartó el miocardio anterior en 22 ratones de tipo salvaje y 16 ratones TSP2^{-/-} para enfocarnos en el papel biológico de TSP2 en daño estructural miocárdico agudo y consiguientemente remodelación cardíaca rápida. El infarto no fue tolerado por ratones carentes de TSP2, puesto que todos los ratones murieron de ruptura cardíaca en las primeras 72 horas después de MI. Por otro lado, 100% de los ratones de tipo salvaje que no sucumbieron a complicaciones post-operativas inmediatas sobrevivieron (Figura 3). La morfometría computerizada, 48 horas después de MI, mostró una falta completa aparente de incremento reactivo en colágeno miocárdico en ratones carentes de TSP2 en comparación con ratones de tipo salvaje (0,38" 0,05% y 0,70" 0,04%, respectivamente; p < 0,05) (Figura 4). La microscopía óptica y electrónica reveló una destrucción amplia de la matriz miocárdica en ratones carentes de TSP2. Ninguno de los ratones de tipo salvaje demostró este fenotipo (Figura 5).

Discusión

Se demostró en este estudio que la expresión cardíaca incrementada de TSP2 identifica aquellos corazones hipertrofiados que son propensos a insuficiencia cardíaca evidente. Se demostró además que se requiere TSP2 para montar una respuesta efectiva a la carga cardíaca aguda. Por el contrario, los marcadores conocidos de hipertrofia, como BNP, aumentaron invariablemente en todas las formas de hipertrofia cardíaca, y por lo tanto no se pudieron distinguir entre formas de hipertrofia propensas a la insuficiencia y resistentes a la insuficiencia.

Aunque la familia de trombospondinas se ha estudiado ampliamente en vasculopatías y trombotopatías, no hay informes que sustancien un papel importante para las trombospondinas en insuficiencia cardíaca. Los hallazgos sugieren que TSP2 puede realizar, directa o indirectamente, una función crucial en la biología de la matriz cardíaca.

TSP2 es una glucoproteína matricelular segregada cuyas funciones son diversas e incompletamente incomprendidas. Puesto que no se encontraron ortólogos próximos de TSP2 en los genomas de *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila*, parece que esta proteína ha evolucionado para luchar con la complejidad incrementada de la interacción célula-matriz en vertebrados. Como se evidencia para un papel de TSP2 en la organización de la matriz extracelular, estudios previos en ratones carentes de TSP2 han mostrado que la pérdida de expresión de TSP2 da como resultado fibrillas de colágeno anormalmente grandes, con contornos irregulares. Además, la piel de ratones carentes de TSP2 es frágil y tiene una resistencia a la tracción reducida. Los fibroblastos de la piel carente de TSP2 son defectuosos en su unión a un sustrato, y tienen niveles incrementados de metaloproteínasa 2 de la matriz (MMP-2) en su cultivo. El estudio actual ha identificado dos funciones, aparentemente contradictorias, para TSP2 en el miocardio. En hipertensión crónica en ratas Ren-2, la expresión cardíaca incrementada de TSP2 identifica aquellos animales que son propensos a insuficiencia cardíaca. Aunque esta respuesta parecería indicar que la expresión de TSP2 es perjudicial, es probable que la respuesta refleje una respuesta de lesión aumentada, previamente activada, en ratas que progresa más tarde a insuficiencia evidente, en comparación con la respuesta en ratas que permanecieron compensadas durante un período de tiempo prolongado. Es bien sabido que la expresión de TSP2 es característica de la respuesta a lesión en animales adultos. Por otro lado, en infarto de miocardio experimental en ratones, la presencia de TSP2 protege claramente frente a ruptura cardíaca. Aunque los dos sistemas experimentales son difíciles de comparar debido a que están implicadas especies diferentes y, en el caso de ratones carentes de TSP2, es probable que estén presentes cambios compensatorios complejos, ambos conjuntos de resultados son consistentes con un papel importante para TSP2 a la hora de generar una matriz extracelular completamente funcional después de una lesión. En el caso de curación de herida de piel excisional en ratones carentes de TSP2, parece que la ausencia de TSP2 es beneficiosa debido a que, en esta forma particular de curación de herida, el incremento resultante en la angiogénesis y en MMP2 acelera la curación, a pesar de los cambios estructurales preexistentes en fibras de colágeno que se sabe que están presentes en este tejido. Sin embargo, se sugiere que la debilidad intrínseca previa del tejido cardíaco, debido a anomalías similares en la matriz del miocardio, predispone a la ruptura cardíaca tras el infarto.

Los presentes datos sugieren que la expresión cardíaca incrementada de TSP2 antecede a la progresión a insuficiencia. Puesto que se sabe que las trombospondinas se pueden unir a integrinas, es posible que TSP2 medie efectos profibróticos vía señalización de integrina. Recientemente, Zhang et al. (J Clin Invest 111: 833-841, 2003)

dieron a conocer que los ratones con haploinsuficiencia del gen de la proteína adaptadora, *Grb2*, son resistentes a fibrosis cardíaca en respuesta a sobrecarga de presión. *Grb2* es reclutado en activación mediada por integrina de la cinasa de adhesión focal que puede resultar de estrés mecánico. En nuestro estudio se encontró que $\beta 1$ integrina estaba entre los genes cuya expresión aumentó más claramente en los corazones de ratas Ren-2 hipertensas, y aumentó además en corazones con insuficiencia. Este hallazgo se sustanció por la observación reciente de que el acortamiento de fibroblastos cardíacos *in vitro* incrementó los niveles proteicos de $\beta 1$ integrina (S. Pokharel y Y.M. Pinto, datos no publicados).

Se debería observar que la técnica de tinción con rojo de Picrosirius para la cuantificación de colágeno se basa en el tamaño, alineamiento y empaquetamiento de fibras de colágeno para mostrar polarización visible del color naranja-rojo. Puesto que los ratones carentes de TSP2 tienen una fibrilla de colágeno y estructura de fibras anormales, específicamente menos fibras organizadas y fibrillas irregulares y más grandes, la birrefringencia que se midió se pudo ver afectada por estos cambios.

En conclusión, según la presente invención, se propone que TSP2 funciona como un regulador crucial de la integridad de la matriz cardíaca. Puesto que la formación de la matriz extracelular incrementada caracteriza tanto las formas experimental como clínica de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión, la expresión temprana de TSP2 puede reflejar una respuesta de matriz que es crucial en la transición desde hipertrofia compensada hasta insuficiencia cardíaca. Estas observaciones muestran que la detección temprana de la sobreexpresión cardíaca de TSP2 puede identificar aquellos corazones hipertrofiados que son susceptibles a insuficiencia cardíaca, y puede facilitar la identificación temprana y posiblemente de tratamiento de pacientes que son propensos a evolucionar hasta insuficiencia cardíaca.

EJEMPLO 2

Galectina-3 marca a macrófagos activados en corazones hipertrofiados propensos a insuficiencia

La expresión miocárdica incrementada de proteínas quimioatrayentes de macrófagos y diversas citocinas ha sugerido que los macrófagos están implicados en insuficiencia cardíaca (HF). Sin embargo, no está claro si los macrófagos responden simplemente a lesión ya establecida, o están implicados activamente en las capas tempranas de HF. Para estudiar estos mecanismos en HF hipertensiva, se emplearon ratas TGR(mRen2)²⁷ (Ren-2) hipertensas homocigotas. Estas ratas desarrollan invariablemente hipertrofia cardíaca hacia la 10ª semana, con lo que después algunas permanecen compensadas hasta 17 semanas, mientras que otras evolucionan hacia insuficiencia y muerte a alrededor de 12-14 semanas. Este estudio muestra que la expresión de galectina-3 cardíaca marca específicamente corazones hipertrofiados propensos a la evolución hacia insuficiencia. Parece que los macrófagos son activados temprana y específicamente en corazones hipertrofiados propensos a la insuficiencia, y los mediadores derivados de macrófagos, como galectina-3, pueden contribuir al desarrollo de fibrosis cardíaca y progresión hacia HF.

Materiales y métodos

Ratas transgénicas y estudios hemodinámicos

Se obtuvieron ratas Ren-2 homocigotas del Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlín, Alemania. Se estudiaron 16 ratas macho Ren-2 y 8 controles de edad equivalente procedentes del entorno no transgénico, ratas Sprague Dawley (SD). De las 16 ratas Ren-2, 8 se trataron con 0,05 mg/kg/día de candesartán, un bloqueador del receptor de angiotensina II tipo I (ARB), de 7-13 semanas. En las 8 ratas Ren-2 sin tratar, 4 se sacrificaron a las 13 semanas al desarrollar HF. Las 4 ratas Ren-2 restantes se monitorizaron y se sacrificaron a las 17 semanas cuando no aparecieron signos de insuficiencia clínica. La hemodinámica se tomó a las 10 semanas y antes del sacrificio. El peso del corazón, del pulmón y el peso corporal se midieron después del sacrificio. El procedimiento para el cuidado y tratamiento de los animales fue aprobado por el comité de cuidado de animales institucional.

Biopsias miocárdicas de ratas Ren-2 de 10 semanas

Se anestesió un segundo grupo de 12 ratas Ren-2 y 4 ratas SD, y se colocó en la tráquea una aguja roma de calibre 20 para que sirva como cánula traqueal, que se conectó a un respirador de roedores de volumen cíclico (modelo 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) en aire ambiente con un volumen corriente de 2,5 a 3 ml y una frecuencia respiratoria de 80 respiraciones/minuto. Con la ayuda visual de un microscopio de microdissección, se realizó una incisión de 5 mm en el espacio intercostal 4º izquierdo, para acceder al tórax. La biopsia se tomó usando una aguja de 0,35 mm personalizada.

Micromatrices de ADNc

Para el análisis en micromatrices se escogieron clones de ADNc aislados de una librería de ADNc de rata normalizada (total 12.336 genes) (Incyte Genomics, CA, USA, rata GEM-2/3). Los insertos amplificados mediante PCR de cada ADNc se imprimieron como matriz de alta densidad sobre superficies de vidrio. Se llevaron a cabo

hibridaciones duplicadas en estos chips de vidrio con ARNm miocárdico de dos ratas SD y seis ratas Ren-2, en tres puntos de tiempo diferentes. Los genes diana que mostraron cambios estadísticamente significativos ($P < 0,001$) en la expresión con una sobreexpresión de al menos 2 veces en el grupo HF-S se volvieron a imprimir sobre una submatriz para el análisis posterior, de manera que los genes se evaluaron independientemente cuatro veces para mejorar el nivel de fiabilidad. Se adoptó el protocolo para la minería de datos (Tan FL et al., Proc Natl Acad Sci., 99: 11387-11392, 2002) y validación, como se detalla previamente (Bandman O et al., Ann NY Acad Sci. 975: 77-90, 2002).

Cebadores y sondas

Los cebadores (directo, 5'-CCCGACTGGACCACTGACA-3', inverso, 5'-CAGCATGCGAGGCATGACT-3', y la sonda, 5'-TGCCCTACGATATGCCCTTGCCTG-3') específicos para galectina-3 se diseñaron a partir de secuencias disponibles en GenBank™ usando el Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Aislamiento de ARN y PCR en tiempo real

El ARN se aisló del ventrículo izquierdo de rata con el kit RNeasy Mini Kit siguiendo el protocolo RNeasy Mini Protocol (QIAGEN, Hilden, Alemania), y se almacenó a $B80^{\circ}\text{C}$. El ARN se aisló de biopsias de corazón de rata con el kit PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Se encontró que las condiciones óptimas de PCR fueron $12,5\ \mu\text{L}$ 2x PCR Master Mix para ensayos Taqman™, con una concentración final de 5 mM de MgCl_2 , 300 nM de cada cebador, 200 nM de sonda y 10 ng de molde de ADNc en un volumen total de 25 μL .

Secuenciación, manchado de la membrana e hibridación de ADNc para macromatriz

Los clones de los genes expresados diferencialmente, identificados mediante micromatriz, se obtuvieron de Incyte Genomics y se secuenciaron con el cebador 5'-GGTGACACTATAGAAGAGC-3' (Eurogentec, Seraing, Bélgica). Después de confirmar la identidad, los insertos plasmídicos se amplificaron mediante reacción de PCR con los cebadores 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' y 3'-ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5'. Cada clon se manchó entonces por duplicado en membranas de nailon (macromatriz). Las transferencias de puntos se escanearon con el formador de imágenes personal fx-phospho imager (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA).

Aislamiento de proteína y transferencia Western

El aislamiento de la proteína y la transferencia Western se llevaron a cabo como se describe previamente. Anticuerpos primarios (galectina-3, Bioreagents; ED-1 y OX-6, un regalo de Dr. M. de Winther, Departamento de Genética Molecular, Universidad de Maastricht, Países Bajos) se diluyeron 1/1000 en disolución salina tamponada con Tris con Tween-20 (TBS-T). El anticuerpo secundario (IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante, Cell Signaling Technology) se diluyó 1/2000 en TBS-T. Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL, USA) según las instrucciones del fabricante.

Inmunohistoquímica, citoquímica de galectina y microscopía confocal

La expresión de galectina-3 y los sitios de unión accesibles se visualizaron mediante un anticuerpo monoclonal específico anti-galectina-3 y galectina-3 biotinilada, como se describe previamente (Gabies et al., Anal Biochem.: 189: 91-94, 1990). Como se detalla en otra parte (Andre et al., Chembiochem. 2: 822-830, 2001), la galectina-3 se biotiniló en condiciones que conservan la actividad. En microscopía de barrido por láser confocal, los sitios de unión de galectina se detectaron mediante avidina marcada con FITC. Se usó un anticuerpo secundario marcado con rojo Texas para visualizar inmunocitoquímicamente el antígeno nuclear proliferante (PCNA). Otros detalles sobre el procedimiento están disponibles en otra parte (Broers et al., J Cell Sci.: 112 (Pt 20): 3463-3475, 1999).

Ensayos de proliferación de fibroblastos cardíacos y de incorporación de prolina

Se aislaron fibroblastos cardíacos de rata a partir de ratas Sprague-Dawley neonatales de 2 días como se describe previamente (Pokharel et al., Hypertension, 40: 155-161, 2002). Las células se cultivaron en modificación de Dulbecco de medio Eagle (DMEM) modificado con 10% de suero fetal bovino (FBS), junto con 1% de L-glutamato, 50 U/ml de penicilina, y 0,1 g/l de estreptomycin, y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Veinticuatro horas después de la siembra, las células se hicieron quiescentes mediante incubación con medio que contiene 0,5% de FBS durante 24 horas. Las células se trataron entonces con galectina-3 recombinante murina (control, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 30 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas. El número de células que se dividen se determinó mediante ensayo de incorporación de metil- ^3H timidina radiomarcada (0,5 μCi por pocillo). La radioactividad se midió en la mezcla de fibroblastos y líquido de centelleo usando un contador beta LKB-Wallace (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, UK).

El colágeno segregado se midió usando el ensayo de incorporación de ^3H prolina. De forma breve, se sembraron

fibroblastos cardíacos en placas de 6 pocillos a una confluencia de 90B100%. Durante las 24 horas finales de incubación, se añadieron 15 μ Ci/ml de L-[3 H]prolina. La [3 H]prolina incorporada del medio de acondicionamiento se precipitó con ácido tricloroacético al 10% (TCA), y se contó con el contador de centelleo.

Análisis estadísticos

- 5 Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Los datos para cada estudio se compararon usando el análisis de varianzas de una vía (ANOVA) en combinación con un análisis post-hoc de Dunnett, para corregir múltiples comparaciones, usando como cohorte de control interno ratas SD. Los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

10 Función cardíaca deteriorada y fibrosis cardíaca en ratas HF-S

- Se observaron los ventrículos izquierdo y derecho hipertrofiados en 8 ratas tratadas con placebo. Por el contrario, no hubo ningún incremento en LV en las ratas tratadas con candesartán y en los controles no transgénicos. Cuatro de 8 ratas sin tratamiento desarrollaron HF clínica evidente entre 12-14 semanas, lo que estuvo acompañado por índices de función cardíaca deprimida. Las cuatro ratas que quedan permanecieron compensadas durante el período de estudio de 17 semanas. HF evidente con efusión pleural (peso del pulmón/peso corporal %: HF-S, 10,61 $\pm$ 0,7 frente a HF-R, 4,97 $\pm$ 0,2, $P < 0,001$) y presión diastólica final ventricular izquierda elevada (LVEDP) fueron manifiestas en ratas HF-S, que no estaban presentes en ratas tratadas con HF-R y o ARB (Figura 6 a, b y c). A las 10 semanas, todas las ratas Ren-2 tratadas con placebo tuvieron LVH pero ningún signo hemodinámico de descompensación (peso de LV/peso corporal %: Ren-2, 3,88 $\pm$ 0,08 frente a controles no transgénicos 2,15 $\pm$ 0,2, y dP/dt_{max} : Ren-2, 8556 $\pm$ 296 frente a controles no transgénicos 8780 $\pm$ 373). El contenido de colágeno miocárdico, determinado mediante densitometría asistida por ordenador, reveló un mayor grado de fibrosis cardíaca en las ratas HF-S en comparación con las ratas HF-R. ARB normalizó LVH y el contenido de colágeno miocárdico, de manera que siguió siendo comparable al de razas de antecedentes normotensas (Figura 7).

La micromatriz revela abundancia de genes inmunorrelacionados en ratas susceptibles a HF

- 25 En primer lugar, se examinó la variabilidad biológica en la expresión génica entre los grupos de HF-S y HF-R. Los niveles de expresión de la mayoría de los genes entre pares de muestras procedentes de ambos grupos se correlacionaron enormemente. Nos centramos en los genes expresados diferencialmente entre los corazones hipertrofiados con insuficiencia y sin insuficiencia. Se realizó la transformación logarítmica de los valores, y sólo se consideró que estaban expresadas diferencialmente las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en niveles de expresión que superan 2 veces el umbral. La galectina-3 sobresalió como el gen más prominentemente sobreexpresado, con una elevación mayor de 5 veces en ratas con HF (Tabla 3). De interés, los genes de los receptores del antígeno II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) y de inmunoglobulina estuvieron entre estos genes sobreexpresados.

La micromatriz revela normalización de genes con susceptibilidad a HF mediante bloqueo de angiotensina II

- 35 Para validar los genes expresados diferencialmente en HF, se confirmó primero la identidad de los clones secuenciando y volviendo a manchar consiguiendo estos genes sobre membrana de nailon (macromatriz) para la hibridación repetida en muestras biológicas separadas. Esto también produjo una sobreexpresión de siete genes de mayor índice, identificados inicialmente por la micromatriz. Para confirmar el papel de la activación del sistema de renina-angiotensina (RAS) en este modelo de HF dirigido por angiotensina, se volvió a evaluar la expresión de los genes diana identificados mediante micromatriz después de tratar un subgrupo de ratas Ren-2 con una dosis subpresora de candesartán desde siete hasta 13 semanas. El bloqueo de angiotensina II evitó completamente el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíacas. A nivel de la expresión génica, evitó la sobreexpresión de todos los genes candidatos relacionados con HF. Notablemente, también se evitó la expresión del gen de galectina-3.

La transferencia Western muestra expresión elevada de galectina-3 en miocardio con insuficiencia

- 45 Dado el incremento transcriptomal robusto en galectina-3, nos centramos en sus niveles proteicos en el miocardio. Comparable a los resultados obtenidos en micro/macromatrices, se observó el mayor nivel de expresión de galectina-3 en el mismo grupo de animales que tuvo el grado más alto de fibrosis cardíaca y desarrolló rápidamente descompensación cardíaca a las 13 semanas (HF-S, 94,6 $\pm$ 8,9; HF-R, 35 $\pm$ 5,6 ; $P < 0,01$) (Figura 8 a y b).

Colocalización de positividad de CD68, antígeno de MHC-II y galectina-3

- 50 Se monitorizó la distribución de galectina-3 en el miocardio de rata mediante inmunohistoquímica. Histológicamente, las ratas susceptibles a HF revelaron áreas con parches de y fibrosis. La arquitectura de los tejidos en las áreas no afectadas se conservó bien. Por el contrario, estas áreas de fibrosis elevada no se observaron en ratas tratadas con ARB ni en ratas SD, ni tampoco en ratas HF-R que no sufren insuficiencia hipertrofiadas. De forma importante, las

áreas positivas a galectina-3 mostraron un daño tisular pronunciado y un nivel elevado de fibrosis. Morfológicamente, las células positivas a galectina-3 fueron más bien grandes. Para confirmar la suposición de que estas células fueron macrófagos, se analizaron las secciones en serie con un anticuerpo específico de macrófagos (ED-1). Las áreas positivas a galectina-3 se colocaron con la tinción específica de macrófagos. Estos macrófagos también expresaron fuertemente el antígeno de MHC-II, indicando un papel activo de estas células en la presentación de antígenos. Estas características no fueron evidentes en ratas HF-R ni en controles no transgénicos.

Sitios de unión de galectina-3 en fibroblastos cardíacos

Habiendo definido la expresión fuerte de galectina-3 en macrófagos, se determinó si la galectina-3 se une a fibroblastos cardíacos. Se usó la galectina-3 biotinilada para visualizar los sitios de unión de galectina-3 en fibroblastos cardíacos. En células permeabilizadas con 0,1% de Triton, la presencia de sitios de unión de galectina-3 dio como resultado una tinción citoplásmica así como perinuclear difusa en células en reposo (Figura 10a). Por el contrario, los fibroblastos proliferantes mostraron una mayor tinción alrededor del núcleo, revelando una alteración relacionada con la mitosis en el perfil de tinción (Figura 10 b). Este patrón se monitorizó independientemente mediante microscopía confocal. De hecho, estos experimentos confirmaron la presencia compacta de ligandos de galectina-3 accesibles alrededor del núcleo en fibroblastos cardíacos proliferantes (es decir, positivos a PCNA) (Figura 10 c, d y e), evocador del reflejo de la activación del ciclo celular en el estado sobreexpresado de galectina-3.

Proliferación fibroblástica inducida por galectina-3 y producción de colágeno

Habiendo proporcionado de este modo pruebas de la presencia de sitios accesibles en los fibroblastos cardíacos, se determinó si la galectina-3 estimula el crecimiento de fibroblastos cardíacos. Usando galectina-3 recombinante, se llevaron a cabo ensayos de proliferación. Se añadió galectina-3 en diferentes concentraciones (0, 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$) con o sin enriquecimiento sérico. Se observó un incremento significativo en la proliferación de fibroblastos cardíacos con 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de galectina-3 exógena durante 24 horas (galectina-3 a 30 $\mu\text{g/ml}$, 347" 17,5 recuentos por minuto (cpm); galectina-3 a 10 $\mu\text{g/ml}$, 309 " 4,8 cpm; control, 145" 4,8; $p < 0,01$). Después se monitorizó la producción de colágeno mediante fibroblastos cardíacos con la adición de galectina-3 exógena usando ensayos de incorporación de prolina radioactiva. Con 30 $\mu\text{g/ml}$ de galectina-3 en el medio, la incorporación de prolina aumentó en aproximadamente 66% (galectina-3 a 30 $\mu\text{g/ml}$, 1066" 56 compuesto; control, 707" 52,8 cpm; $p < 0,05$). Concentraciones menores de galectina-3 no produjeron efectos significativos (galectina-3 a 10 $\mu\text{g/ml}$, 992" 72 cpm; $p = 0,13$).

La biopsia miocárdica a las 10 semanas mostró una expresión elevada de galectina-3 en ratas que más tarde evolucionaron rápidamente hacia HF

Para evaluar el estado de expresión de galectina-3 en el miocardio antes de que HF se hiciese hemodinámica y clínicamente manifiesta (es decir, 10 semanas), se desarrolló una técnica para obtener biopsias cardíacas en el corazón de rata que late espontáneamente. Después de la biopsia, se dejó que la rata se recuperase para determinar si demostraría ser flexible o más bien susceptible a HF. Medida mediante PCR en tiempo real, la expresión miocárdica del gen de galectina-3 se incrementó sólo en las ratas que más tarde evolucionaron a HF (unidades arbitrarias, 5,8" 0,17), mientras que se expresó en niveles relativamente menores en las ratas que permanecieron subsiguientemente compensadas (3,4" 0,2), y en corazones de ratas de control no transgénicas (2,5" 0,033) (Figura 12).

Discusión

El estudio actual está dirigido a identificar los mecanismos reclutados específicamente en los ventrículos hipertrofiados que llegaron a la insuficiencia. Se demostró que galectina-3, una proteína expresada por macrófagos, es expresada temprana y específicamente en corazones hipertrofiados propensos a la insuficiencia. Además, se estableció que la galectina-3 se une a sitios de unión intracelulares en fibroblastos cardíacos y activa la proliferación de fibroblastos cardíacos y la producción de colágeno, sugiriendo que esto puede contribuir a la rigidez miocárdica y probablemente a la evolución hacia HF.

Estudios previos han sugerido un papel para macrófagos y las respuestas inflamatorias en HF. Sin embargo, estos estudios han dejado la cuestión sin responder sobre si la activación de los macrófagos antecedió o simplemente acompañó a HF. Además, también faltó una explicación sobre los mecanismos específicos que relacionan a los macrófagos con fibrosis cardíaca.

Identificada en primer lugar como un antígeno sobre la superficie de macrófagos peritoneales, la galectina-3 es el único miembro de tipo quimera de la familia de galectinas. Tiene un grupo lectina que comparte especificidad independiente de calcio con β -galactósidos así como proteínas, y está localizado en las copas fagocíticas y fagosomas de los macrófagos. Además de sus acciones antiapoptóticas y promotoras del crecimiento, la galectina-3 también regula la quimiotaxis de monocitos, quimioquinesis y modula la disponibilidad de las citocinas. Además,

estudios recientes también han sugerido que la galectina-3 desempeña un papel crítico en la fagocitosis por macrófagos cuando se reticula mediante el receptor $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$).

De forma interesante, se observó también la sobreexpresión de $Fc\gamma R$ en nuestros modelos de HF (Tabla 3).

La biopsia obtenida de ratas de 10 semanas mostró una expresión de galectina-3 incrementada sólo en las ratas que pasaron a insuficiencia rápida. Dadas las acciones proinflamatorias y promotoras del crecimiento de fibroblastos de la galectina-3, la expresión incrementada en esta etapa puede contribuir a un entorno que conduzca a insuficiencia. Según los hallazgos, la galectina-3 expresada por análogos hepáticos de macrófagos (es decir, células de Kupffer) ha estado implicada en la inducción de la síntesis de colágenos formadores de fibrillas en exceso en el hígado. Esto sugiere que la galectina-3 es un mediador profibrótico relacionado con macrófagos y todavía otra citocina de infiltrado inflamatorio con el potencial para influir en la remodelación cardíaca en condiciones caracterizadas por infiltración de macrófagos. Una hipótesis alternativa sobre cómo galectina-3 podría añadirse a la evolución hacia HF surge del descubrimiento de galectina-3 como el tercer receptor para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE-3), que tienen un papel crítico en la reticulación de colágeno y rigidez miocárdica.

También se documentó que la galectina-3 se une a receptores intracelulares e induce proliferación de fibroblastos cardíacos y acentúa la producción de colágeno. Aunque originalmente descubierta como una proteína que se une a hidratos de carbono, se sabe que la galectina-3 interacciona específicamente con dianas intracelulares, además de con glucoconjugados. Estudios previos han propuesto varias moléculas como sitios de unión a galectina-3, incluyendo la proteína de unión a Mac-2, y laminina. Sin embargo, todavía no se sabe qué induce la migración perinuclear rápida de elementos de unión a galectina-3 en células proliferantes. Tanto si es una exportación de sitios de unión a galectina-3 desde el núcleo en división (*migración centrifuga*) o como si es una transición dirigida de cistólica a nuclear (*migración centripeta*) de estos receptores, es necesaria una exploración adicional.

El estudio actual sugiere un papel clave para la activación del sistema inmunitario y la activación de galectina-3 en la progresión desde hipertrofia ventricular izquierda hasta HF, y demuestra una relación entre factores proinmunitarios y profibróticos. La expresión incrementada de galectina-3 que antecede a HF puede reflejar la activación temprana y aberrante de macrófagos en ventrículos hipertrofiados con insuficiencia. A su vez, la galectina-3 puede transmitir señales desde macrófagos activados hacia fibroblastos cardíacos. La detección periférica de galectina-3 puede servir como un predictor de HF, y la inhibición terapéutica de galectina-3 puede convertirse en una nueva diana terapéutica para contrarrestar la fibrosis cardíaca excesiva.

EJEMPLO 3

Evaluación de galectina-3 en suero humano

Se midieron los niveles de galectina-3 en el suero de pacientes con cardiopatía. Se empleó un kit comercialmente disponible para medir galectina-3 mediante ELISA. Los resultados se resumen en las Tablas 4-6. Se demostró que galectina-3 está significativamente elevada en el suero de pacientes con cardiopatía tal como insuficiencia cardíaca, LVH. Además, se encontró un límite superior para los niveles de galectina-3 en sujetos de control sanos, que se sobrepasó en la mayoría de los pacientes con CHF.

Según la presente invención, de este modo se ha demostrado por primera vez que la medición de galectina-3 en el suero de sujetos humanos distingue de forma fiable a sujetos enfermos de sujetos sanos, y de este modo proporciona información adicional sobre los procesos de enfermedades no miocíticas, en conjunción con marcadores miocíticos conocidos (BNP).

Datos de las tablas:

LVH = hipertensos, hipertrofia

CHF = insuficiencia cardíaca

Infl = vasculopatía inflamatoria

Poscon = grupo mixto de enfermedades

Infarto = pacientes con infarto

Sanos = controles sanos

Tabla 1. Secuencias de cebadores de RT-PCR cuantitativa en tiempo real y sondas para transcritos de genes candidatos

Gen/cebador	Secuencia (5'=3')	Posición	Especie
Ciclofilina A (M19533)			
Fwd	GGGAGAAAGGATTTGGCTATAAGG	167-190	Rata
Sonda	TGAAGTCACCACCCTGGCACATGAAT	219-244	
Rev	GCCACCAGTGCCATTATGG	249-267	
Trombospondina 2 (XM_214778)			
Fwd	GAAATGGTCTACTTCTCAGACCTCAAG	603-629	Rata
Sonda	CCCTGCTCTCTAGGCATCTCTGCACTCAT	631-659	
Rev	GCACACTGCTGGAGCTGGA	791-809	
Osteoactivina (NM_002510)			
Fwd	GGACTTCATTGTGACCTGCAAA	1350-1371	Rata
Sonda	CCACTCCCACGGAAGCCTGTACGAT	1376-1400	
Rev	ACCCTGTTCTGGGCGATCT	1421-1439	
Colágeno VI (TC322135)			
Fwd	CCCTCCTTGCAGGCAGAAC	816-834	Rata
Sonda	ATGCCTTGCAGATCAATAACACAGCAGTAGG	845-875	
Rev	CAGGAGGACCGAGAGCTCAT	897-916	
Péptido natriurético de cerebro (M25297)			
Fwd	GCTGCTTTGGGCAGAAGATAGA	350-371	Rata
Sonda	CCTCAGCCCGTCACAGCCCAA	394-414	
Rev	GCCAGGAGGTCTTCCTAAAACA	416-437	

Las sondas se marcaron en las posiciones 5' y 3' con el informador 6-carboxifluoresceína y el extintor de la fluorescencia 6-carboxitetrametilrodamina, respectivamente. La posición de los cebadores y sondas se anotó según las secuencias derivadas de GenBank (los números de acceso se dan en paréntesis). Fwd, directo; Rev, inverso.

5 Tabla 2. Comparación de parámetros hemodinámicos en ratas de 10 semanas (hipertrofia, sin HF), 12 a 14 semanas (evolucionaron a HF consolidada) y 17 semanas (hipertrofia compensada)

Parámetros	10 semanas		12-14 semanas		17 semanas	
	(n=8)		(n=6)		(n=8)	
	SD	Ren-2	SD	Ren-2	SD	Ren-2
LVW/BW	2,15"0,2	3,88"0,08*	2,21"0,5	3,91"0,9*	2,57"0,12	3,60"0,5*
dP/dt _{max}	9010"373	8556"296	9297"221	3764"198 ^{*,#}	7612"124	7814"658
- dP/dt _{max}	8943"976	8200"482	9648"514	3251"312 ^{*,#}	6937"845	6967"654

LVW/BW, peso ventricular izquierdo corregido para peso corporal; dP/dt_{max} (mmHg/s), tasa máxima de elevación de tensión LV; -dP/dt_{min}, tasa máxima de caída de tensión de LV; *, P < 0,05 frente a ratas SD de edad similar; #, P < 0,01 frente a ratas Ren-2 de 10 semanas y 17 semanas.

Tabla 3. Secuencias para cebadores de PCR semicuantitativa y de RT-PCR cuantitativa en tiempo real y sondas de

transcritos de genes candidatos

Gen/cebador	Secuencia (5' → 3')	Especie
Ciclofilina A (NM_021130)		
Fwd	TGCTGGACCCAACACAAATG	Humana
Sonda	TTCCCAGTTTTTCATCTGCACTGCCA	
Rev	TGCCATCCAACCACTCAGTC	
Galectina-3 (NM_002306)		
Fwd	CTCGCATGCTGATAACAATTCTG	Humana
Sonda	CGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATT	
Rev	GCAACATCATTCCTCTTTGG	
MCP-1 (M57441)		
Fwd	GCAGGTCTCTGTACGCTTCT	Rata
Rev	GATGATCCCAATGAGTCGGCT	

Las sondas se marcaron en las posiciones 5' y 3' con el informador 6-carboxifluoresceína y el extintor de la fluorescencia 6-carboxitetrametilrodamina, respectivamente. La posición de los cebadores y sondas se anotó según las secuencias derivadas de GenBank (los números de acceso se dan en paréntesis). Fwd, directo; Rev, inverso.

5

Tabla 4. Galectina-3, descriptores

	N	Media	Desviación std.	Error std.	95% de Intervalo de Confianza para Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
LVH	22	6,253	1,457	0,311	5,607	6,899	3,7	8,8
Chf	39	9,392	1,845	0,295	8,794	9,990	5,0	13,1
Infl	15	7,427	1,678	0,433	6,498	8,356	4,6	10,5
poscon	3	6,660	,871	0,503	4,496	8,824	5,9	7,6
infarct	6	6,317	1,262	0,515	4,992	7,641	5,3	8,5
Sanos	26	4,717	1,125	0,221	4,262	5,171	2,8	6,8
Total	111	7,169	2,390	0,227	6,720	7,619	2,8	13,1

Tabla 5. ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	373,605	5	74,721	30,832	0,000
En los grupos	254,464	105	2,423		
Total	628, 069	110			

Tabla 6. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: Galectina-3 Bonferroni

GRUPO (I)	GRUPO (J)	Diferencia media (I-J)	Error std.	Sig.	95% de Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
LVH	chf	-3,139*	0,415	0,000	-4,385	-1,892
	infl	-1,173	0,521	0,397	-2,739	0,392
	poscon	-0,407	0,958	1,000	-3,285	2,471
	infarct	-6,348E-02	0,717	1,000	-2,217	2,090
	sanos	1,536*	0,451	0,014	0,182	2,891
chf	LVH	3,139*	0,415	0,000	1,892	4,385
	infl	1,965*	0,473	0,001	0,544	3,386
	poscon	2,732	0,933	0,063	-6,994E-02	5,534
	infarct	3,075*	0,683	0,000	1,024	5,126
	sanos	4,675*	0,394	0,000	3,491	5,859
infl	LVH	1,173	0,521	0,397	-0,392	2,739
	chf	-1,965*	0,473	0,001	-3,386	-0,544
	poscon	0,767	0,985	1,000	-2,191	3,724
	infarct	1,110	0,752	1,000	-1,149	3,369
	sanos	2,710*	0,505	0,000	1,194	4,226
poscon	LVH	0,407	0,958	1,000	-2,471	3,285
	chf	-2,732	0,933	0,063	-5,534	6,994E-02
	infl	-0,767	0,985	1,000	-3,724	2,191
	infarct	0,343	1,101	1,000	-2,963	3,650
	sanos	1,943	0,949	0,647	-0,908	4,794
infarct	LVH	6,348E-02	0,717	1,000	-2,090	2,217
	chf	-3,075*	0,683	0,000	-5,126	-1,024
	infl	-1,110	0,752	1,000	-3,369	1,149
	poscon	-0,343	1,101	1,000	-3,650	2,963
	sanos	1,600	0,705	0,380	-0,518	3,718
sanos	LVH	-1,536*	0,451	0,014	-2,891	-0,182
	chf	-4,675*	0,394	0,000	-5,859	-3,491
	infl	-2,710*	0,505	0,000	-4,226	-1,194
	poscon	-1,943	0,949	0,647	-4,794	0,908
	infarct	-1,600	0,705	0,380	-3,718	0,518
*. La diferencia media es significativa al nivel de 0,05.						

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Universiteit Maastricht	
	<120> Método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar insuficiencia cardíaca determinando el nivel de galectina-3 o trombospondina-2.	
	<130> 2M/2BH90	
10	<140> PCT/EP2004/010879	
	< 141> 2004-09-27	
	<150> EP 03078161.1	
	< 151> 2003-10-09	
	<160> 29	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	< 211> 19	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
20	<220>	
	< 223> cebado	
	<400> 1	
	ggtgacacta tagaagagc	19
25	<210> 2	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> 5'cebador	
30	<400> 2	
	accatgatta cgccaagctc	20
	<210> 3	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> 5'-cebador	
	<400> 3	
5	acgacggcca gtgaattgaa	20
	<210> 4	
	< 211> 19	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> cebador directo	
	<400> 4	
	cccgactgga ccactgaca	19
	<210> 5	
15	< 211> 19	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador inverso	
20	<400> 5	
	cagcatgcga ggcattgact	19
	<210> 6	
	< 211> 24	
	< 212> ADN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> sonda	
	<400> 6	
	tgccctacga tatgcccttg cctg	24
30	<210> 7	
	< 211> 24	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	

	< 223> cebador	
	<400> 7 gggagaaagg atttgggtat aagg	24
5	<210> 8 < 211> 26 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> sonda	
10	<400> 8 tgaagtcacc accctggcac atgaat	26
	<210> 9 < 211> 19 < 212> ADN < 213> Artificial	
15	<220> < 223> cebador	
	<400> 9 gccaccagtg ccattatgg	19
20	<210> 10 < 211> 27 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> cebador	
25	<400> 10 gaaatggtct acttctcaga cctcaag	27
	<210> 11 < 211> 29 < 212> ADN < 213> Artificial	
30	<220> < 223> sonda	
	<400> 11	

	ccctgctctc taggcatctc tgcactcat	29
5	<210> 12 < 211> 19 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> cebador <400> 12 gcacactgct ggagctgga	19
10	<210> 13 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> cebador	
15	<400> 13 ggacttcatt gtgacctgca aa	22
20	<210> 14 < 211> 25 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> sonda	
25	<400> 14 ccactccac ggaagcctgt acgat	25
30	<210> 15 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> cebador <400> 15 accctgtttc tgggcgatct	20
35	<210> 16 < 211> 19	

	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador	
5	<400> 16 ccctccttgc aggcagaac	19
	<210> 17	
	< 211> 31	
10	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> sonda	
	<400> 17 atgccttgca gatcaataac acagcagtag g	31
15	<210> 18	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
20	< 223> cebador	
	<400> 18 caggaggacc gagagctcat	20
	<210> 19	
	< 211> 22	
25	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador	
	<400> 19 gctgctttgg gcagaagata ga	22
30	<210> 20	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
35	<220>	

	< 223> cebador	
	<400> 20 cctcagcccg tcacagcca a	21
5	<210> 21 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> cebador	
10	<400> 21 gccaggaggt cttcctaaaa ca	22
	<210> 22 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Artificial	
15	<220> < 223> cebador	
	<400> 22 tgctggaccc aacacaaatg	20
20	<210> 23 < 211> 27 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> sonda	
25	<400> 23 ttcccagttt tttcatctgc actgcca	27
	<210> 24 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Artificial	
30	<220> < 223> cebador	
	<400> 24	

	tgccatccaa ccactcagtc	20
5	<210> 25 < 211> 23 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> cebador	
10	<400> 25 ctcgcatgct gataacaatt ctg	23
	<210> 26 < 211> 26 < 212> ADN < 213> Artificial	
15	<220> < 223> sonda	
	<400> 26 cgggtgaagcc caatgcaaac agaatt	26
20	<210> 27 < 211> 21 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> cebador	
25	<400> 27 gcaacatcat tccctctttg g	21
	<210> 28 < 211> 21 < 212> ADN < 213> Artificial	
30	<220> < 223> cebador	
	<400> 28 gcaggtctct gtcacgcttc t	21
35	<210> 29 < 211> 21	

< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> cebador

5

<400> 29
gatgatccca atgagtcggc t

21

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo o complicaciones de insuficiencia cardíaca, que comprende:
 - (a) determinar en una muestra biológica procedente de dicho sujeto el nivel de un marcador no miocítico seleccionado del grupo que consiste en galectina-3 y trombospondina-2;
 - (b) comparar el nivel de dicho marcador con un nivel estándar, y
 - (c) determinar el riesgo de desarrollar daño de órgano diana hipertensivo o complicaciones de insuficiencia cardíaca si el nivel de dicho marcador es elevado en comparación con el nivel estándar.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de plasma o suero derivada de sangre periférica.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el nivel del marcador se mide mediante un ensayo inmunosorbente.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el marcador es galectina-3.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el marcador es trombospondina-2.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, en el que el daño de órgano diana hipertensivo es insuficiencia cardíaca.

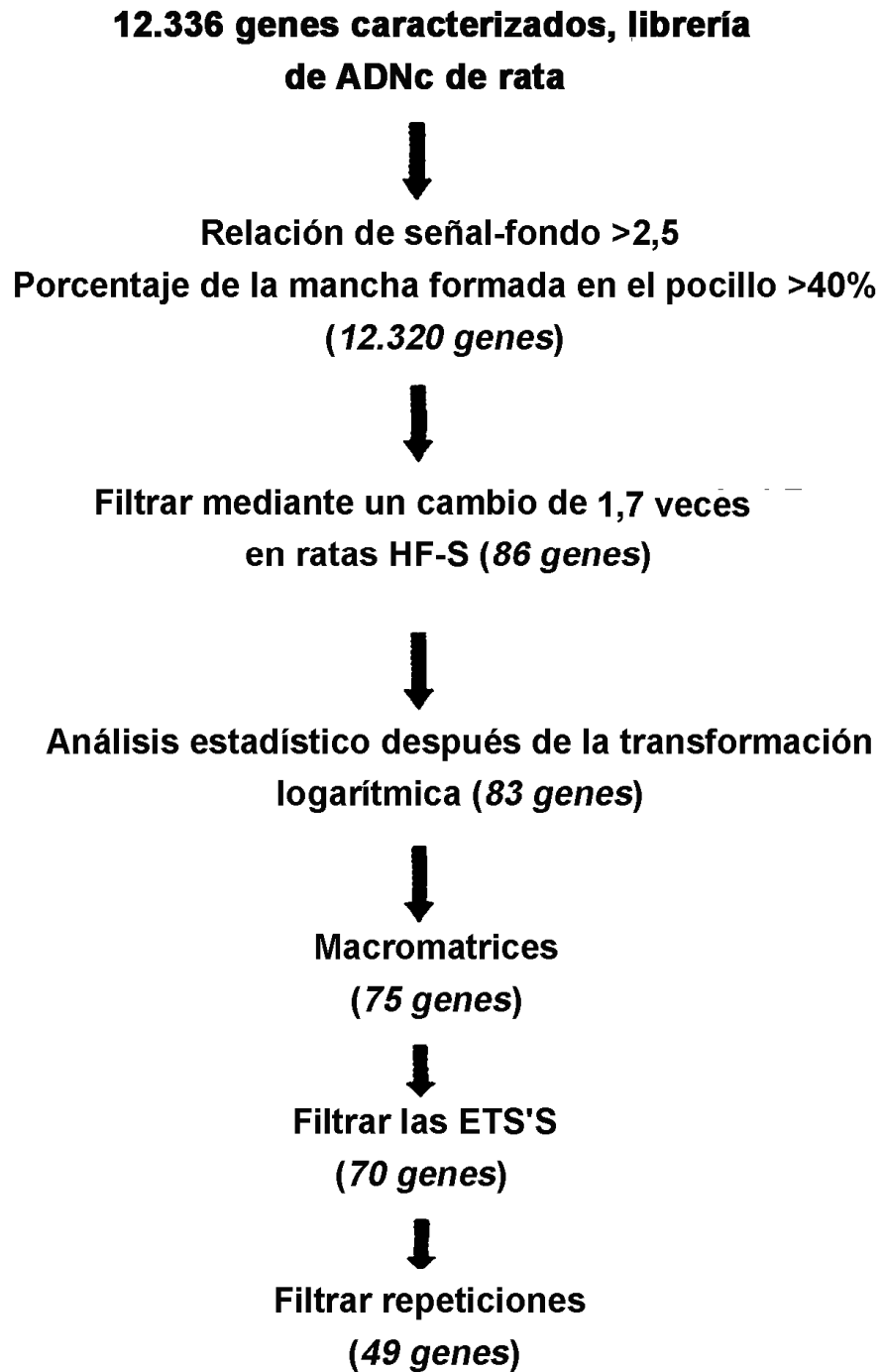


FIG. 1

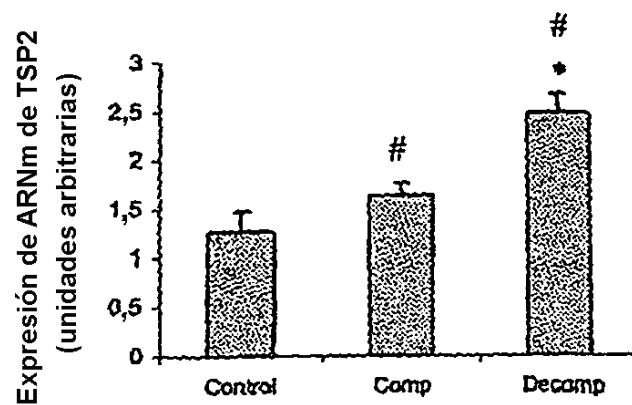


FIG. 2A

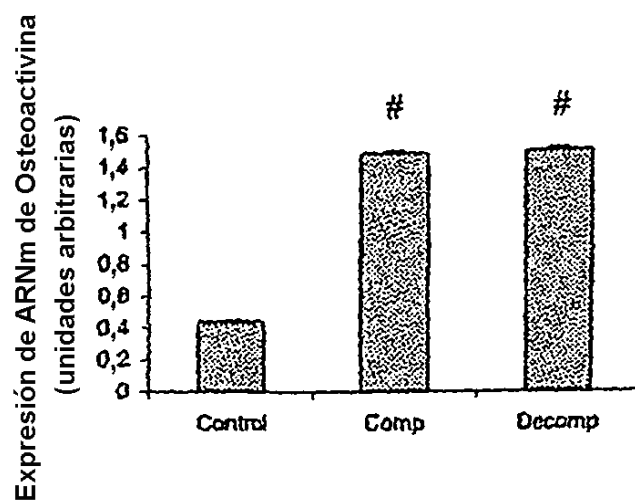


FIG. 2B

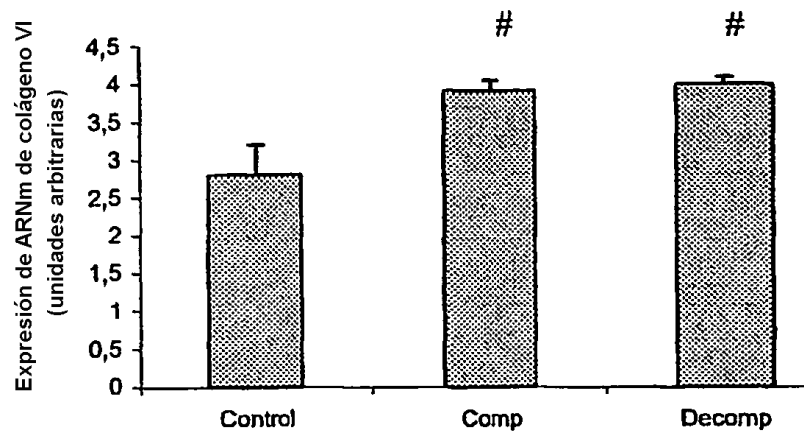


FIG. 2C

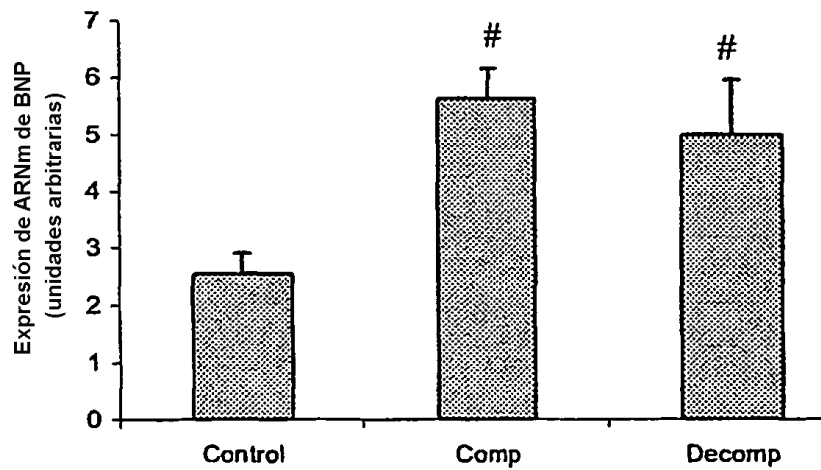


FIG. 2D

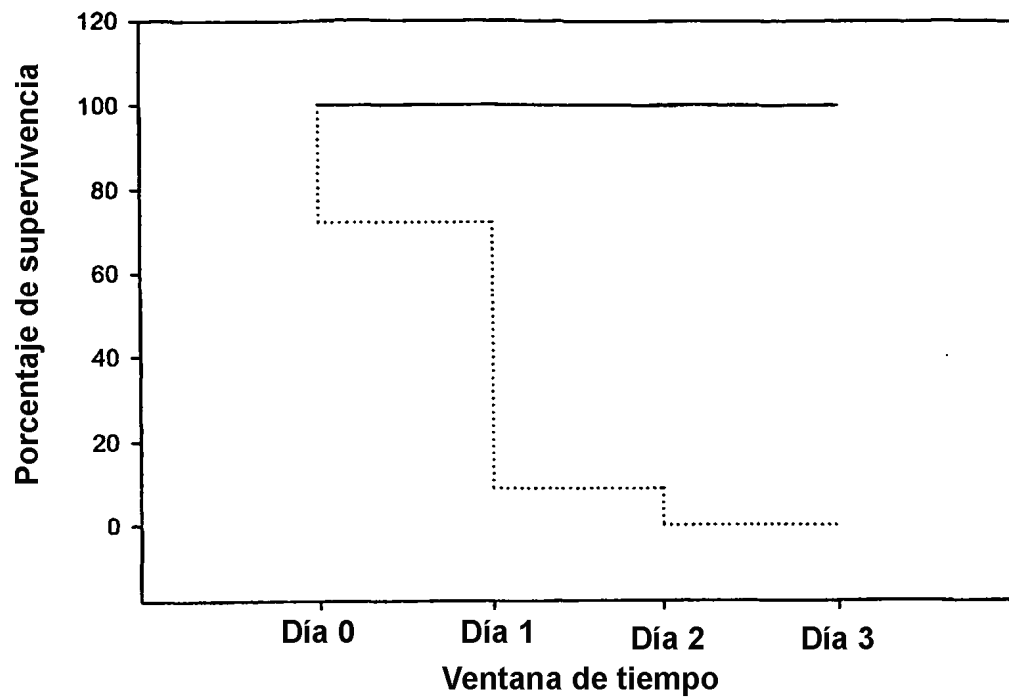


FIG. 3

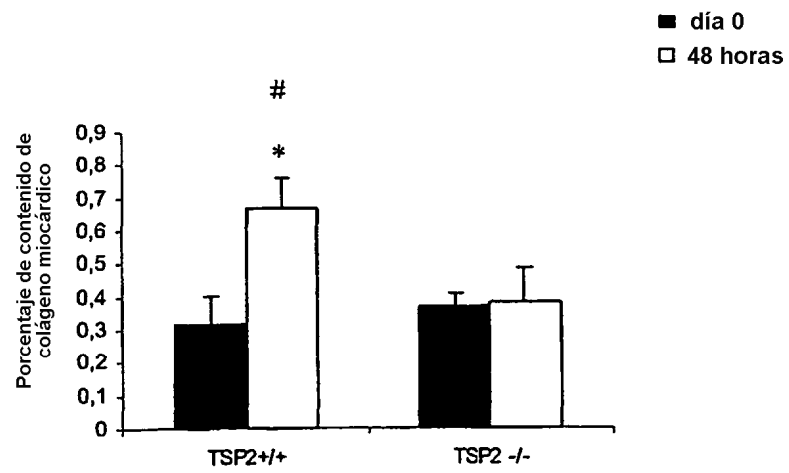


FIG. 4

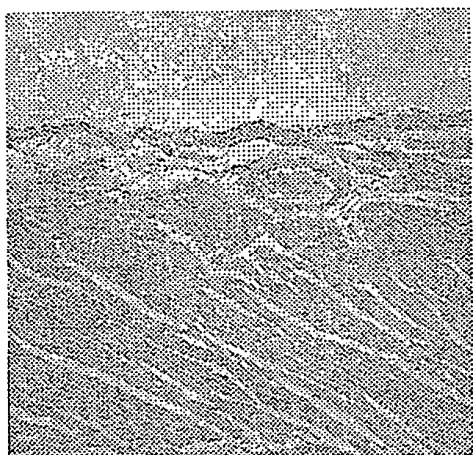


FIG. 5A

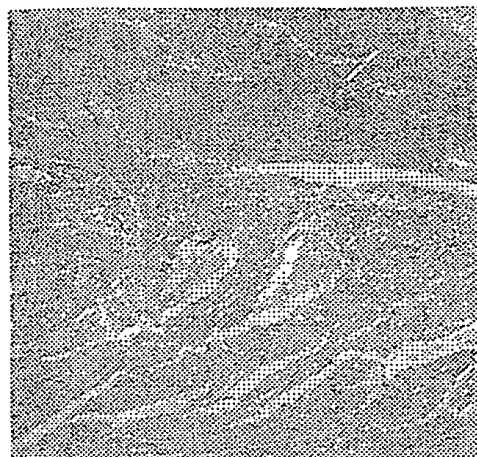


FIG. 5B

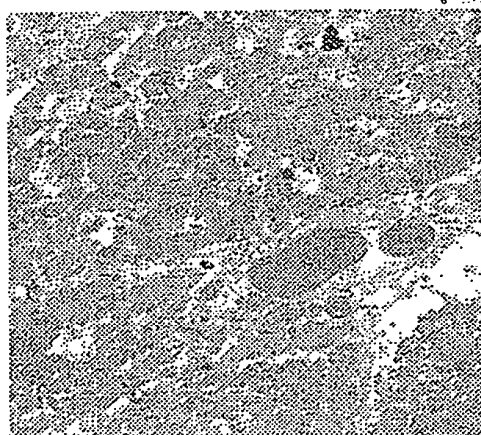


FIG. 5C

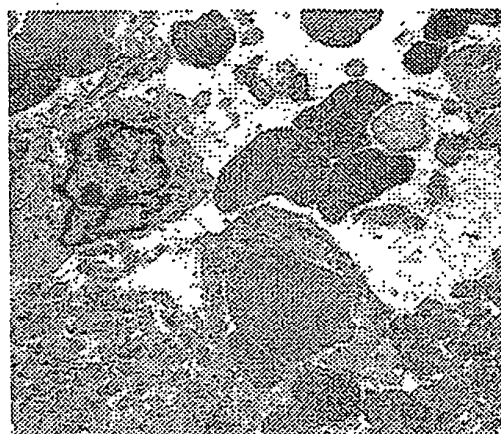


FIG. 5D

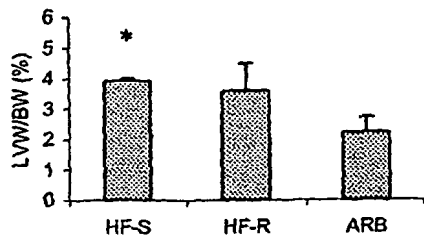


FIG. 6A

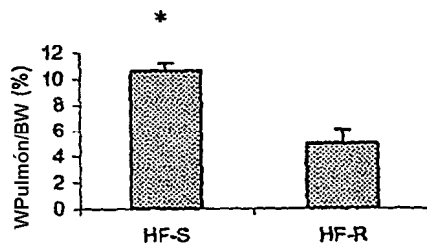


FIG. 6B

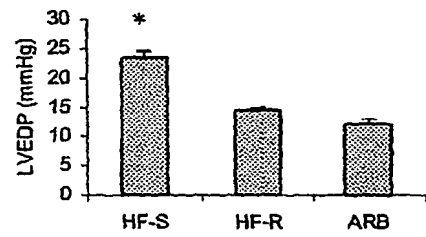


FIG. 6C

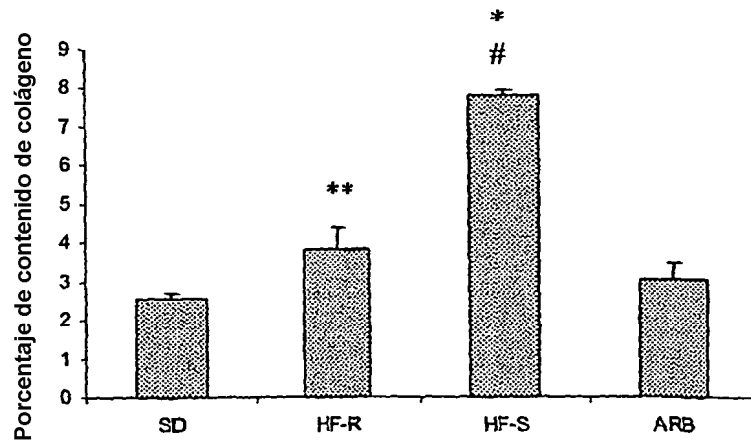


FIG. 7

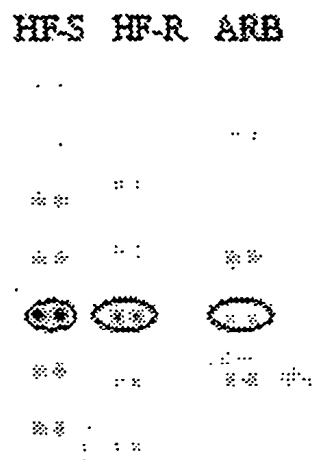


FIG. 8A

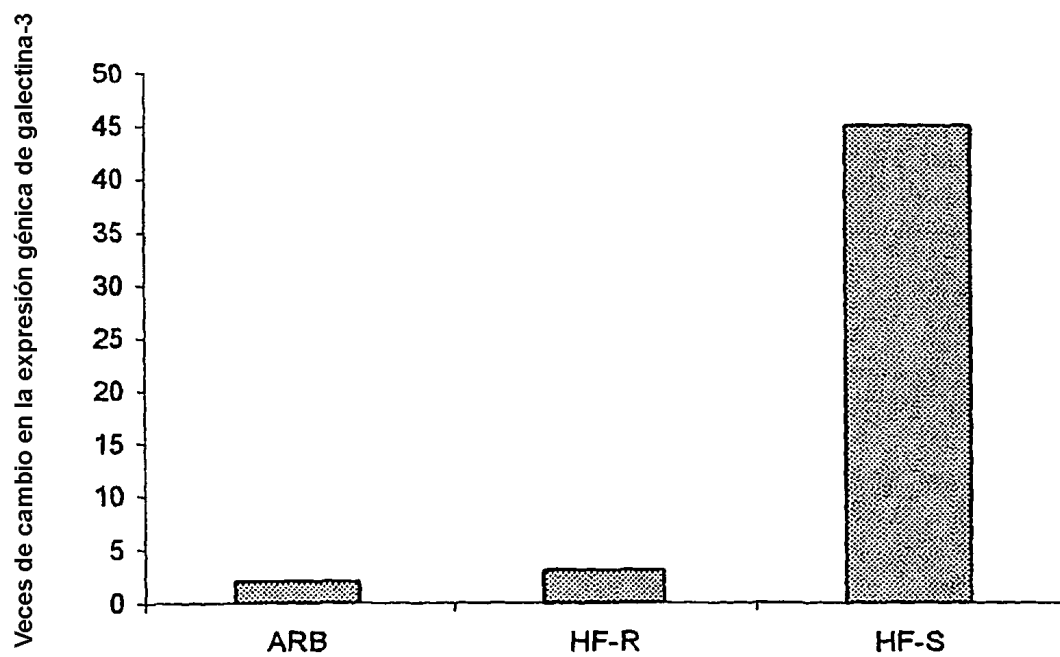


FIG. 8B

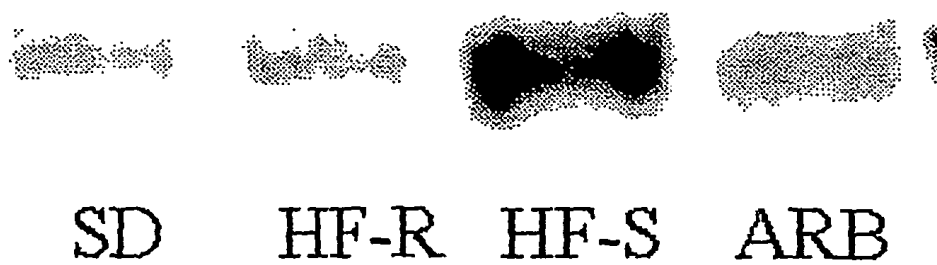


FIG. 9A1

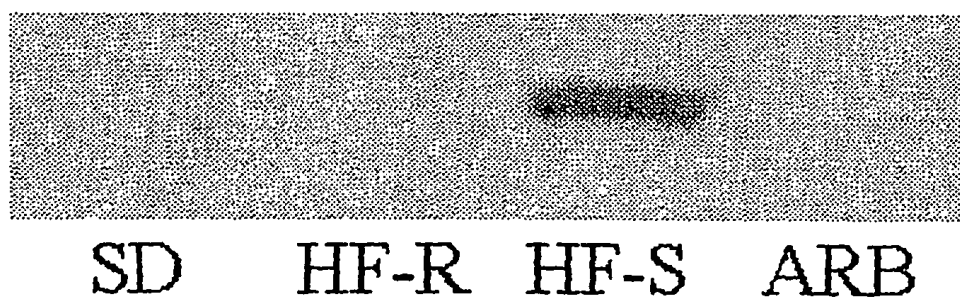


FIG. 9B1

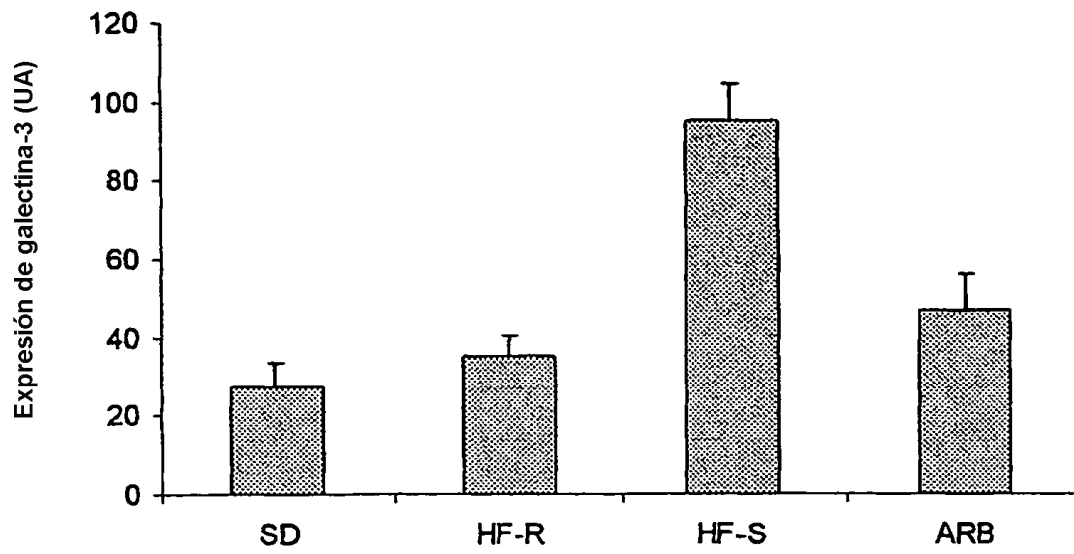


FIG. 9A2

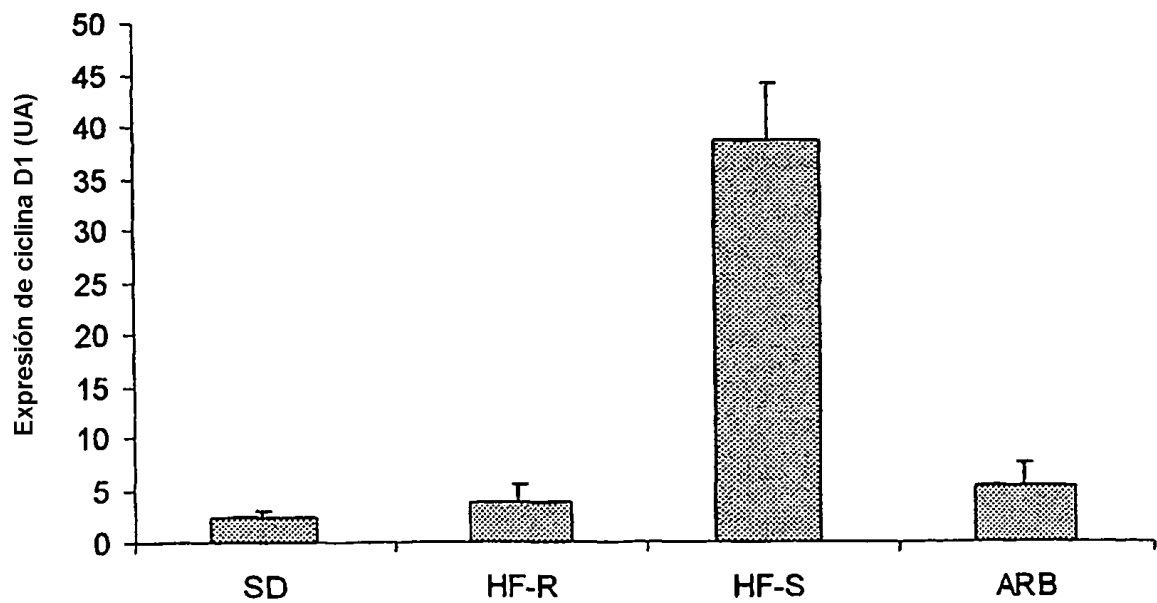


FIG. 9B2

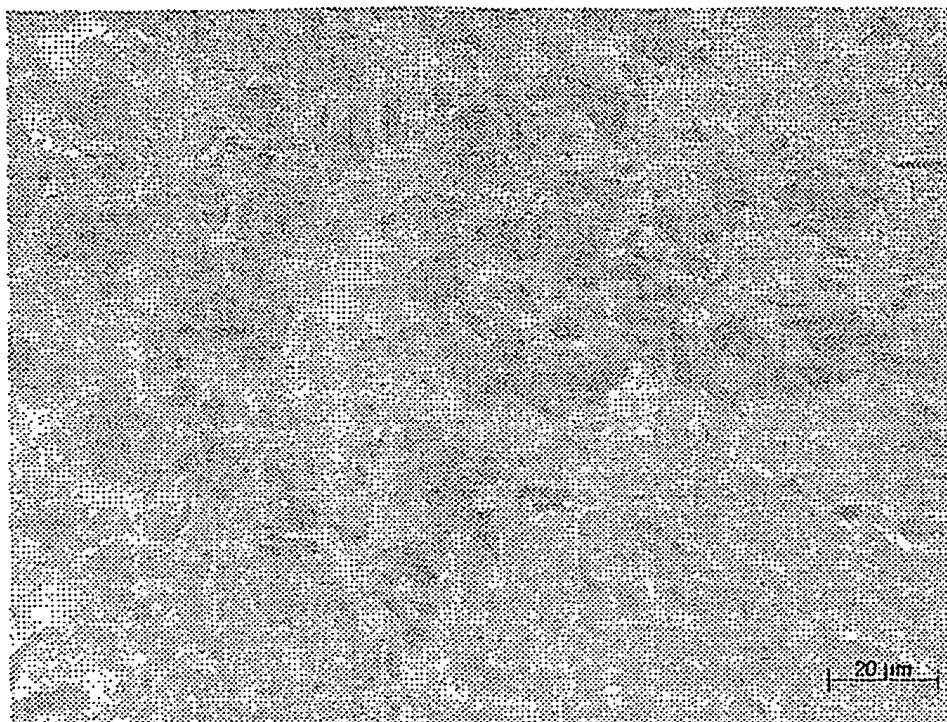


FIG. 10A

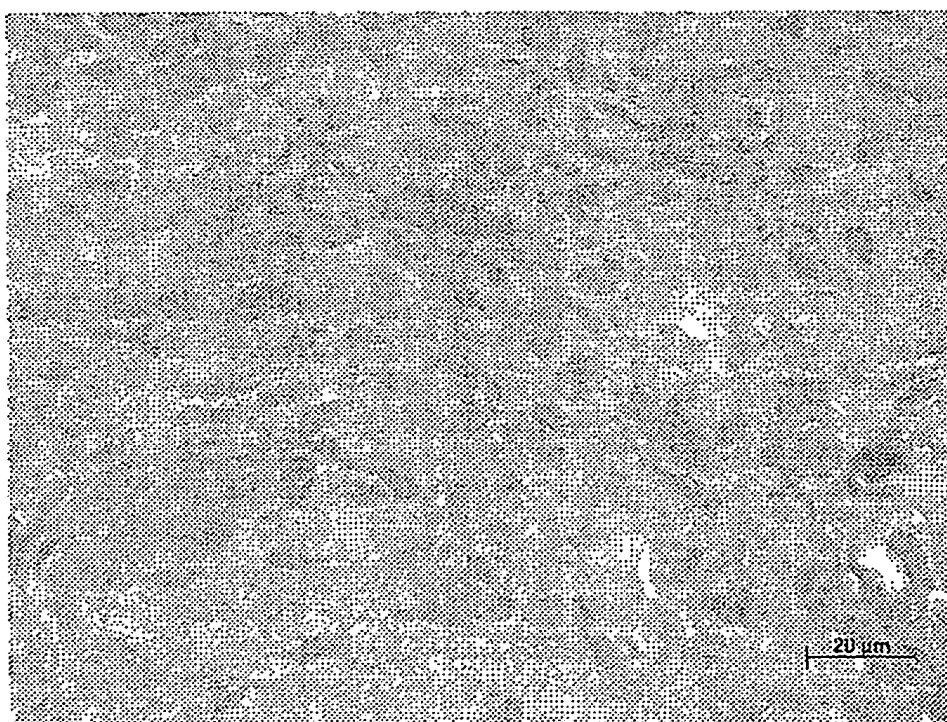


FIG. 10B



FIG. 10C

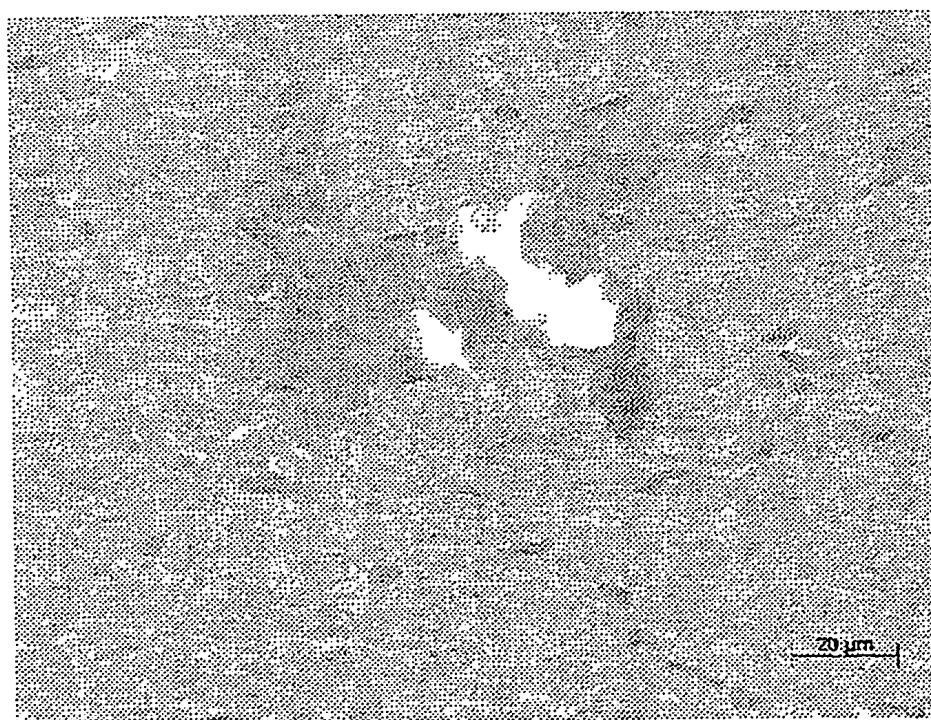


FIG. 10D

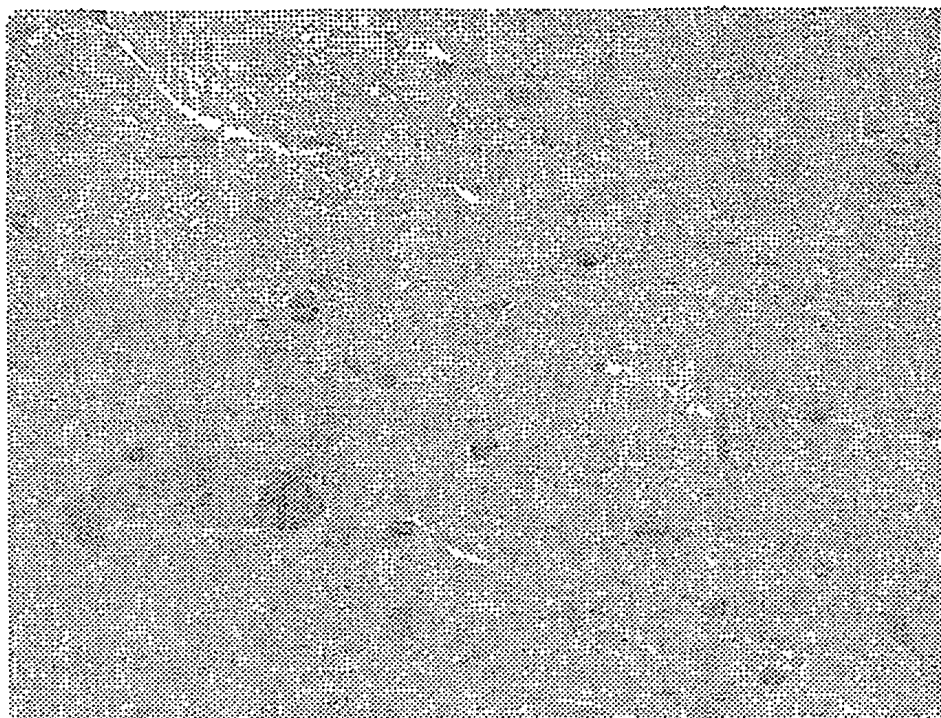


FIG. 10E

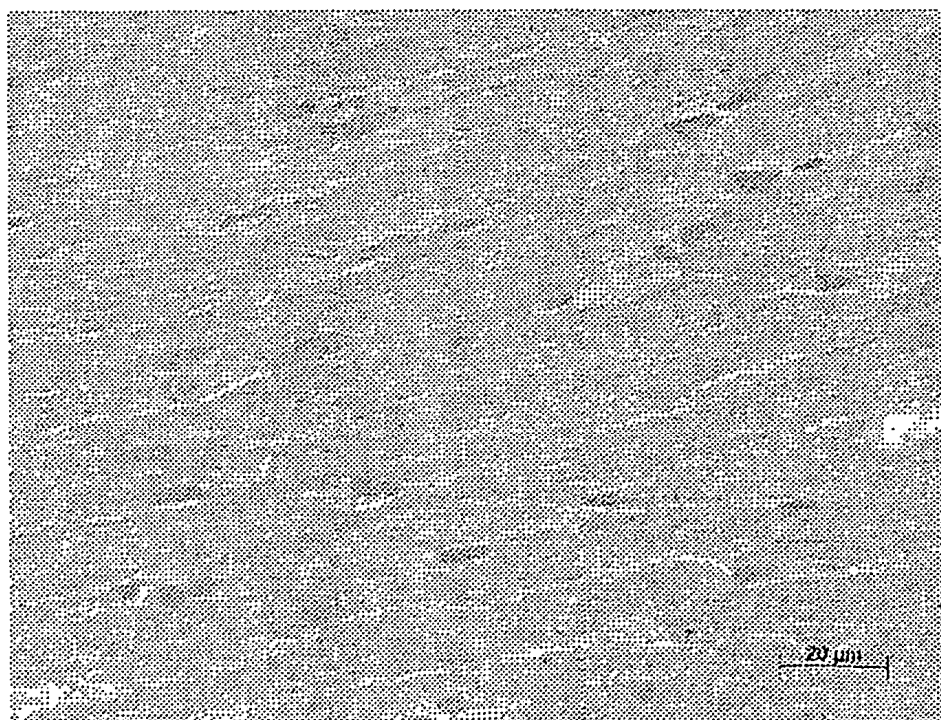


FIG. 10F

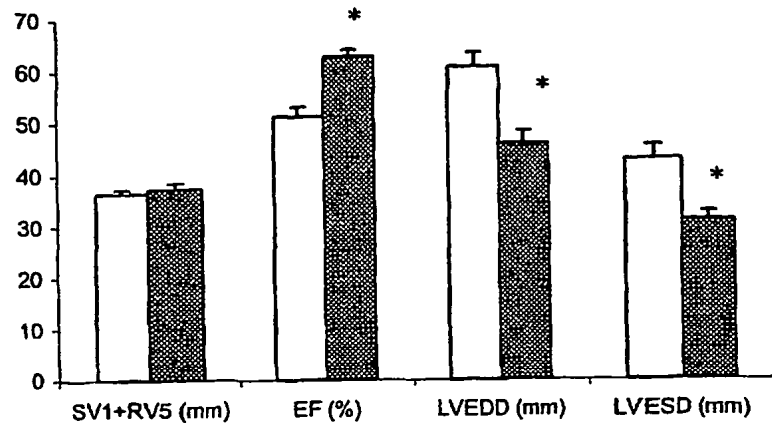


FIG. 11A

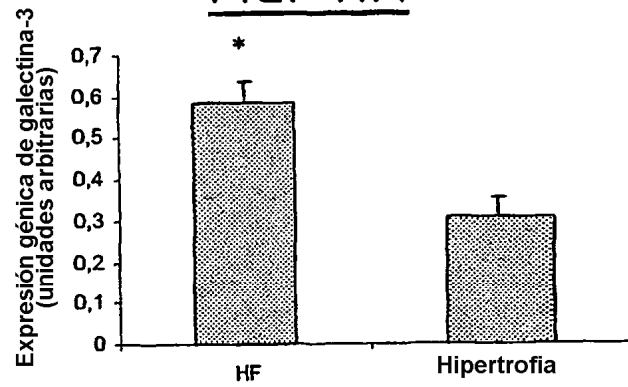


FIG. 11B

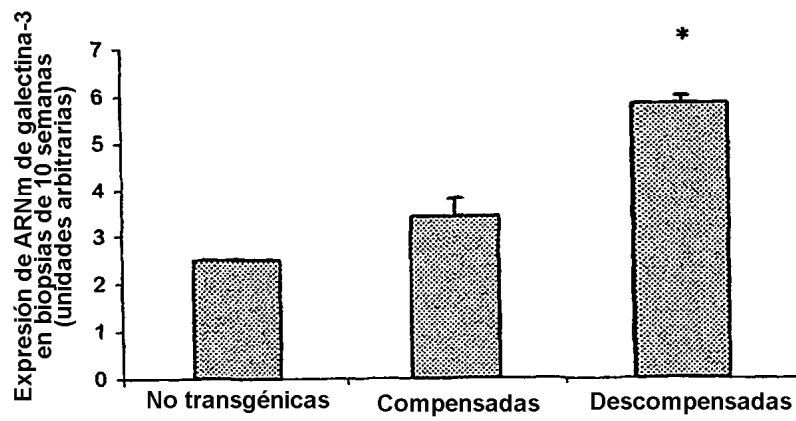


FIG. 12