

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 955**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2009** **PCT/GB2009/002454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010** **WO10041046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2009** **E 09748433 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016** **EP 2342570**

54 Título: **Secretogranina II como marcador de una enfermedad cardíaca**

30 Prioridad:

10.10.2008 GB 0818650

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

06.02.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITETET I OSLO (100.0%)
PO Box 1072 Blindern
0316 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**ROSJO, HELGE;
CHRISTENSEN, GEIR;
OMLAND, TORBJORN y
STRIDSBERG, MATS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 599 955 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

Secretogranina II como marcador de una enfermedad cardíaca

- 5 La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico de una función cardíaca deteriorada / una enfermedad cardíaca, para el diagnóstico de los procesos fisiopatológicos subyacentes activados en los individuos con una función cardíaca deteriorada / una enfermedad cardíaca, para la monitorización de los individuos con una función cardíaca deteriorada / una enfermedad cardíaca, incluyendo la monitorización de la terapia y/o la estimación del pronóstico en individuos con una función cardíaca deteriorada / una enfermedad cardíaca.
- 10 Los trastornos con las enfermedades cardíacas, que pueden definirse como todas las enfermedades relacionadas con una patología en el corazón, bien debidas a una lesión directa en el propio corazón o bien secundarias a tensiones sobre el corazón procedentes de otras fuentes, es decir, hipertensión, se caracterizan generalmente por una función cardíaca deteriorada o alterada. La enfermedad cardíaca afecta a un gran número de personas en todo el mundo, y en particular en el mundo occidental, y los trastornos o las enfermedades cardíacas son responsables de una reducción en la calidad de vida y de una muerte prematura en una proporción significativa de pacientes. La enfermedad cardíaca aparece en hombres, en mujeres y en niños de ambos sexos, pero es particularmente prevalente en los hombres y en los ancianos o en las personas de mediana edad.
- 15 La insuficiencia cardíaca, es decir, la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC o IC), puede definirse como un síndrome en el que el corazón es incapaz de bombear sangre suficiente para satisfacer las necesidades de los órganos periféricos en términos de oxígeno y de nutrientes celulares en reposo y/o durante un esfuerzo, alternativamente únicamente a unas presiones o a unos volúmenes diastólicos anormalmente elevados (Colucci WS, Braunwald E., Pathophysiology of Heart Failure, pág. 509. En Braunwald's Heart Disease 7ª Edición, ed. Braunwald E. Elsevier Saunders 2004, Filadelfia, PA).
- 20 Existen varias causas diferentes de insuficiencia cardíaca, de las cuales la más habitual en el mundo occidental es la enfermedad arterial coronaria. Otras causas habituales son la cardiomiopatía (primaria o secundaria), la hipertensión, las enfermedades valvulares y los defectos congénitos.
- 30 Aproximadamente el 70 % de las insuficiencias cardíacas en el mundo occidental están provocadas por una enfermedad arterial coronaria, que habitualmente es debida a una aterosclerosis. La aterosclerosis dará como resultado un estrechamiento de los vasos del corazón dando lugar a un inadecuado suministro de sangre al miocardio y a los cardiomiocitos (las células musculares cardíacas). Dichos trastornos cardíacos que implican una reducción en el suministro sanguíneo al corazón a menudo reciben el término general de insuficiencia cardíaca isquémica, y la insuficiencia cardíaca isquémica (o cardiomiopatía isquémica) es el principal grupo etiológico de insuficiencia cardíaca en el mundo occidental.
- 35 Una reducción en el suministro de sangre al corazón puede manifestarse por sí misma como una angina de pecho (dolor en el pecho debido a un inadecuado suministro de oxígeno al miocardio), un infarto agudo de miocardio (que es el resultado de una oclusión arterial coronaria aguda que provoca un daño en el miocardio con tejido cicatricial; dicha área no puede sostener la función muscular cardíaca), y muertes súbitas debidas a arritmias mediadas por una disfunción en la homeostasis del calcio de los cardiomiocitos, y más específicamente, debida a una disfunción del receptor de rianodina de los cardiomiocitos ventriculares. Si el suministro sanguíneo al corazón se reduce con el tiempo, o si el miocardio ha sido sustancialmente debilitado por un infarto con tejido cicatricial, la función cardíaca quedará debilitada con una reducción en la capacidad de bombeo que dará lugar a la manifestación clínica de una insuficiencia cardíaca sistólica crónica. Sin embargo, la insuficiencia cardíaca también puede aparecer en presencia de una función de bombeo ventricular izquierdo normal. Esta afección, que a menudo se denomina insuficiencia cardíaca diastólica o insuficiencia cardíaca con la función de eyección conservada, también da como resultado una incapacidad del corazón para bombear sangre suficiente para satisfacer las necesidades de los órganos periféricos en términos de oxígeno y de nutrientes celulares en reposo y/o durante el esfuerzo, alternativamente únicamente a unas presiones o a unos volúmenes diastólicos anormalmente elevados (Guidelines European Society of Cardiology., Eur Heart J. 2008; 29: 2388-2442).
- 40 Claramente, siendo la enfermedad cardíaca tan habitual en todo el mundo, se ha asociado un gran esfuerzo para intentar desarrollar tratamientos y terapias. Algunos tratamientos no farmacológicos incluyen una reducción en la ingesta de sodio, una restricción de líquidos, una modificación en la dieta, pérdida de peso, monitorización del peso y programas de ejercicio controlado. En los casos más serios, los trastornos cardíacos pueden ser tratados mediante medios quirúrgicos, por ejemplo, una cirugía de derivación coronaria, una angioplastia coronaria, la colocación de un marcapasos, la implantación de un desfibrilador (por ejemplo, de un CDI - un dispositivo cardiodesfibrilador implantable) o de una bomba mecánica (por ejemplo, un dispositivo de ayuda al ventrículo izquierdo, un LVAD), una remodelación quirúrgica del corazón, un trasplante o incluso el implante de un corazón artificial.
- 45 Existen varios tratamientos farmacéuticos disponibles y son bien conocidos y están documentados en la materia. Dichos tratamientos implican, por ejemplo, el uso de diuréticos, de vasodilatadores, de fármacos inotrópicos tales como la digoxina, de anticoagulantes, de bloqueantes β , de agonistas de la aldosterona, de inhibidores de la enzima
- 50
- 55
- 60
- 65

conversora de la angiotensina (ECA) o de bloqueantes del receptor de la angiotensina de tipo 2 (BRA).

Aunque el tratamiento ha mejorado sustancialmente en los años recientes (por ejemplo, unas mejores estrategias de tratamiento para síndromes coronarios agudos han reducido la mortalidad relacionada con el infarto de miocardio (IM) temprano), la mortalidad y la morbilidad por una enfermedad cardíaca todavía es sustancial. Además, dado que sobreviven más pacientes a un IM inicial, también más pacientes desarrollan una insuficiencia cardíaca post-IM. Adicionalmente, la tasa de admisión en el hospital es elevada y la enfermedad cardíaca es la causa individual más común de admisiones en el Reino Unido y en los Estados Unidos.

Por lo tanto, la carga de la enfermedad cardíaca, y en particular de la insuficiencia cardíaca, está aumentando, y por lo tanto existe una necesidad de mejores herramientas de diagnóstico y de predicción del riesgo (pronóstico) para los pacientes que padecen todos los tipos de enfermedad cardíaca (Jessup M et al. N Engl J Med 2003; 348: 2007-2018). Éste es especialmente el caso, ya que la enfermedad cardíaca y la insuficiencia cardíaca a menudo son difíciles de diagnosticar, particularmente en el departamento de urgencias o en un entorno de cuidados urgentes. Esta dificultad en el diagnóstico es debida al hecho de que los síntomas pueden ser inespecíficos y los hallazgos físicos no siempre son lo suficientemente sensibles como para usarlos como una base para un diagnóstico preciso. Por ejemplo, aunque una ecocardiografía podría considerarse un buen medio de diagnóstico en diversas enfermedades cardíacas, no siempre es fácilmente accesible ya que la mayoría de los médicos no son competentes para la realización de una ecocardiografía, y puede no reflejar siempre una afección aguda. Adicionalmente, un mal diagnóstico de la enfermedad cardíaca puede ser potencialmente mortal debido a que algunos de los tratamientos son peligrosos para los pacientes con otras afecciones. Por todas estas razones, son muy deseadas unas pruebas diagnósticas y pronósticas mejoradas o alternativas que sean menos subjetivas y que puedan llevarse a cabo rápida y fácilmente en los pacientes en el punto de tratamiento o en una situación de emergencia.

Unas mejores herramientas para la identificación de los procesos fisiopatológicos subyacentes o de los procesos activados en los pacientes individuales también sería un sustancial progreso, ya que los pacientes que padecen la misma enfermedad cardíaca podrían tener diferentes ejes fisiopatológicos activados, por ejemplo, inflamación, actividad neuroendocrina, remodelado del miocardio, apoptosis/necrosis, regulación disfuncional del calcio de los cardiomiocitos.

Es más probable que una metodología individualizada para los pacientes con una enfermedad cardíaca mejore el tratamiento y el cuidado del paciente, y por lo tanto el pronóstico. Unas mejores herramientas para la monitorización de los pacientes tanto antes del tratamiento, es decir, en la situación de "conducta expectante" antes de la cirugía, por ejemplo, una cirugía valvular cardíaca, o antes de empezar un tratamiento farmacéutico, como durante o después del tratamiento, para evaluar el efecto del tratamiento y buscar signos de fracaso de la terapia, también sería beneficiosa para el tratamiento, el cuidado y el pronóstico del paciente.

También sería de ayuda ser capaces de identificar a los individuos con una enfermedad cardíaca subclínica, es decir, a los individuos con una función cardíaca alterada pero sin síntomas manifiestos, y por lo tanto una enfermedad cardíaca no reconocida. Si pudieran identificarse dichos individuos, entonces podrían llevarse a cabo unas medidas como las terapias protectoras adecuadas para intentar prevenir el progreso de la enfermedad cardíaca.

El campo de los biomarcadores se ha expandido drásticamente durante la última década. El éxito y la implementación clínica de las troponinas específicas cardíacas (TnI, TnT) y de los péptidos natriuréticos (BNP, NT-proBNP) han estimulado el interés en la identificación de nuevos y potencialmente mejores biomarcadores cardiovasculares que las troponinas y los péptidos natriuréticos. La estrategia de combinar un grupo de biomarcadores que mide diferentes aspectos de la enfermedad cardiovascular en una metodología multimarcador también ha recibido atención, pero hasta la fecha la calidad de los biomarcadores existentes no es lo suficientemente buena como para que esta metodología guíe estrategias de tratamiento.

Por lo tanto, puede observarse que existe una necesidad de biomarcadores alternativos y preferentemente mejorados de la enfermedad cardíaca, tanto para su uso solos, en forma de un marcador individual, como para su uso junto con otros biomarcadores en un ensayo multimarcador. La identificación de nuevos biomarcadores puede tener potencialmente implicaciones clínicas para un gran número de pacientes.

La cromogranina B (CgB) y la secretogranina II (SgII, Sg2, prosecretoneurina o cromogranina C) son unas proteínas de 50 kDa y de 67 kDa, respectivamente, (pesos moleculares calculados), que son parte de una familia de proteínas ácidas denominada familia de proteínas granina.

La proteína más investigada de esta familia es la cromogranina A (CgA). Durante las dos últimas décadas, la CgA se ha usado clínicamente como biomarcador diagnóstico de tumores neuroendocrinos, tales como feocromocitomas, carcinoides y neuroblastomas (O'Connor DT et al., N Engl J Med 1986; 314: 1145-51, Syversen U et al., Eur J Gastroenterol Hepatol 1993; 5: 1043-1050, Hsiao RJ et al., J Clin Invest 1990; 85: 1555-1559). Sin embargo, últimamente también se ha demostrado que el nivel de CgA aumenta con la gravedad de la insuficiencia cardíaca (Ceconi C et al, Eur Heart J 2002; 23: 967-974), y que es un factor pronóstico independiente de la mortalidad y del

desarrollo de una insuficiencia cardíaca en diferentes grupos de pacientes con síndromes coronarios agudos (Omland T et al., Am J Med 2003; 14: 25-30, Estensen ME et al., Am Heart J. 2006; 152: 927. e1-e6, Jansson AM et al., Eur Heart J. 2009; 30: 25-32). Por lo tanto, parece que la CgA está asociada con, y es un marcador de, la gravedad de la enfermedad cardiovascular, y especialmente del desarrollo de una insuficiencia cardíaca.

Sin embargo, un factor de confusión, que posiblemente reduce el mérito de la CgA como importante biomarcador cardiovascular, es el aumento de los niveles de CgA observados después del uso tanto de bloqueantes del receptor de la histamina de tipo 2 (bloqueantes H2) como de inhibidores de la bomba de protones (IBP) debido a la hiperplasia de las células neuroendocrinas en el estómago, y por lo tanto, a un gran aumento en la secreción de la CgA (Sanduleanu S et al., Aliment Pharmacol Ther 1999; 13: 145-153, Sanduleanu S et al., Eur J Clin Invest 2001; 31 (9): 802-811, Giusti M et al., European Journal of Endocrinology 2004; 150: 299-303). Los bloqueantes H2 y los IBP son unos medicamentos habituales tomados para cualquier tipo de problemas del tracto gastrointestinal superior, tales como la enfermedad por reflujo gastroesofágico, las úlceras de estómago, entre otros, y son usados frecuentemente por, y recomendados en, pacientes con una enfermedad cardíaca, para proteger frente a los problemas en el tracto gastrointestinal superior, que es un importante efecto secundario bien conocido del uso de anticoagulantes (Saini SD et al., Arch Intern Med 2008; 168: 1684-1690). Al aumentar en gran medida los niveles de CgA en circulación, estos medicamentos son unos importantes factores de confusión para el uso de la CgA como biomarcador en la enfermedad cardíaca, ya que en este contexto, la CgA no reflejará el estado cardíaco del individuo, sino más bien la medicación tomada. En realidad, el mérito de la CgA como biomarcador cardiovascular en pacientes que toman bloqueantes H2 o IBP todavía no se ha investigado, ya que estos pacientes han sido excluidos hasta ahora de los estudios publicados sobre la CgA y la enfermedad cardiovascular.

Mucho menos se sabe actualmente sobre la CgB y la SgII (y de hecho, de los otros miembros de la familia de proteínas granina). Sin embargo, se sabe que tanto la CgB como la SgII actúan como pro-peptidos a partir de los cuales se producen otros péptidos (Taupenot L et al., New Engl J Med 2003; 348: 1134-1149, Helle KB. Biol Rev. 2004; 79: 769-794).

Wen et al. (2007, Hum. Mol. Genet., 16 (14), 1752-1764) informan de que una variante ancestral de la *Secretogranina II* confiere una regulación a través de los factores de transcripción PHOX2 y la asociación con la hipertensión.

Por lo tanto, los estudios sobre la CgB y la SgII son bastante mínimos en esta etapa. Por ejemplo, aunque se ha llevado a cabo la medición de la CgB circulante en pacientes con tumores neuroendocrinos (Stridsberg et al., 2007, 139: 80-83), se demostró que la CgB era significativamente menos sensible como biomarcador de los tumores neuroendocrinos que la CgA (Stridsberg M et al., 2005, Reg Peptides; 125: 193-199, Stridsberg M et al., 2004, Reg Peptides; 117: 219-227). El caso es el mismo para la SgII (Stridsberg M et al., 2008, Reg Peptides; 148: 95-98). Stridsberg et al. (1995, J. Endocrinol., 144 (1), 49-59) describen la medición de la cromogranina A, de la cromogranina B (secretogranina I), de la cromogranina C (secretogranina II) y de la pancreastatina en el plasma y en la orina de pacientes con tumores carcinoides y con tumores pancreáticos endocrinos.

De hecho, se sabe que la CgB está presente a un nivel mucho menor que la CgA en la sangre (y en otros líquidos corporales) de los individuos normales (Stridsberg M et al., 2005, Reg Peptides; 125: 193-199, Stridsberg M et al., 2004, Reg Peptides; 117: 219-227). Esto mismo es cierto para la SgII, aunque aquí los niveles son incluso menores (Stridsberg M et al., 2008, Reg Peptides; 148: 95-98).

Por lo tanto, al contrario que en el caso de la CgA, el fundamento para el potencial uso de los niveles circulatorios, o de los niveles en otros líquidos corporales, de la CgB o de la SgII como biomarcadores de enfermedad es incierto y todavía no se ha comprobado.

Un estudio reciente (Heidrich et al., 2008, Circulation Research, 102 (10): 1230-8) ha demostrado que la CgB es expresada intracelularmente en los cardiomiocitos y es un regulador intracelular de la señalización y de la producción del BNP. Sin embargo, no se ha demostrado que la CgB tenga un papel extracelular o que sea secretada desde el tejido cardíaco, lo que significa que, al contrario que el BNP, la CgB tendría un potencial práctico limitado como biomarcador de la enfermedad cardíaca. De hecho, existen numerosos ejemplos de importantes proteínas intracelulares del corazón que no son secretadas, y que por lo tanto no tienen ningún potencial real como biomarcadores de la enfermedad cardíaca, ya que no son detectables en una muestra circulatoria ni en ninguna otra de un líquido corporal.

Por lo tanto, antes de la presente invención, no había ninguna sugerencia en la materia de que los niveles de líquidos corporales, en particular los niveles en circulación, de la CgB o de la SgII, podrían usarse como biomarcadores en el diagnóstico o en el pronóstico de la enfermedad cardíaca. Sin embargo, sorprendentemente, ahora se ha averiguado que pueden usarse los niveles de la CgB y de la SgII en un líquido corporal de un sujeto, por ejemplo, en una muestra circulatoria o en una muestra de saliva, para diagnosticar la presencia y también la gravedad clínica de la enfermedad cardíaca. En una realización alternativa, pueden usarse los niveles de la SgII en un líquido corporal de un sujeto, por ejemplo, en una muestra circulatoria o en una muestra de saliva, en el pronóstico de la futura gravedad, transcurso y resultado de la enfermedad cardíaca. En el presente documento

también se divulga que pueden usarse los niveles de la CgB en un líquido corporal de un sujeto, por ejemplo, en una muestra circulatoria o en una muestra de saliva, en el pronóstico de la futura gravedad, transcurso y resultado de la enfermedad cardíaca.

Por lo tanto, se ha averiguado que la CgB y la SgII son nuevos biomarcadores cardiovasculares que están relacionados tanto con el diagnóstico como con el pronóstico de la enfermedad cardíaca en pacientes individuales, ya que los niveles de la CgB y de la SgII están regulados según la gravedad de la insuficiencia cardíaca, con los mayores niveles en circulación para la clase funcional más alta de la New York Heart Association (NYHA), clasificación que está aceptada como un robusto indicador de la gravedad de la insuficiencia cardíaca y está estrechamente relacionada con el pronóstico del paciente. Adicionalmente, el potencial de estas proteínas como marcadores usados para establecer el riesgo en pacientes con una enfermedad cardíaca está reflejado por la estrecha asociación encontrada entre los niveles de la CgB y de la SgII en la sangre periférica y en la saliva y los pacientes con una desregulación del calcio de los cardiomiocitos, un criterio *sine qua non* de muerte cardíaca súbita, y en los pacientes con una insuficiencia cardíaca isquémica.

De forma importante y ventajosa, los métodos de la presente invención que implican la medición de los niveles de la CgB y de la SgII para el diagnóstico de la enfermedad cardíaca son mejores que los métodos de la técnica anterior que implican la medición de la CgA. A este respecto, se ha demostrado sorprendentemente que los métodos con la CgB y la SgII descritos en el presente documento son más precisos que los ensayos que implican la medición de la CgA.

Esto es evidente cuando se compara la capacidad de discriminación entre individuos sanos y pacientes con una enfermedad cardíaca para la CgB, la SgII y la CgA en el mismo grupo de pacientes, con un área bajo la curva característica de eficacia diagnóstica (ROC-AUC) claramente superior para la CgB y la SgII en comparación con la CgA. El ROC-AUC es considerado el ensayo óptimo para la evaluación de la utilidad diagnóstica de un biomarcador (Pepe MS et al., 2004, Am. J. Epidemiology; 159: 882-890). Por lo tanto, se ha averiguado que la CgB y la SgII tienen una sensibilidad y una especificidad superiores para el diagnóstico de la enfermedad cardíaca frente a la CgA a lo largo del espectro total de valores de corte.

El trabajo experimental descrito en el presente documento también muestra que la expresión génica de la CgB miocárdica está más estrechamente relacionada con la gravedad de la enfermedad cardíaca que la expresión génica del BNP (la gravedad de la enfermedad medida por los pesos pulmonares del animal), mientras que el aumento relativo en la expresión génica de la SgII en la enfermedad cardíaca era muy superior al aumento en la expresión génica del BNP desde la situación inicial, apoyando y reforzando ambos el papel de la CgB y de la SgII como importantes nuevos biomarcadores cardiovasculares. Adicionalmente, tanto los niveles miocárdicos como en circulación de la CgB y de la SgII se correlacionaban estrechamente con el remodelado del miocardio, según se evaluó por la masa del ventrículo izquierdo (otro indicador de la gravedad de la enfermedad cardíaca), lo que indica que estas proteínas también miden la respuesta hipertrófica compensadora del miocardio durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, reflejando otro importante papel de la CgB y de la SgII como biomarcadores cardiovasculares. Los niveles de la CgB y de la SgII en sangre y en saliva también están aumentados en los pacientes con una taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica (TVPC), un trastorno cardíaco únicamente relacionado con el calcio, una afección y un proceso fisiopatológico que actualmente no es detectado por los biomarcadores cardíacos convencionales, una ecocardiografía ni otros procedimientos de imagen cardíacos tales como una RM cardíaca.

Una ventaja adicional que tienen los métodos de la presente invención sobre los ensayos que implican la medición de los niveles de la CgA es que los niveles de la CgB y de la SgII no se ven afectados por los bloqueantes H2 ni por los IBP ya que, al contrario que la CgA, no se considera que sean producidos a las células neuroendocrinas del estómago (Stridsberg M et al., 2005, Reg Peptides; 125: 193-199, Stridsberg M et al., Regulatory Peptides 2007; 139: 80-83, Stridsberg M et al., 2008, Reg Peptides; 148: 95-98). Esto también fue confirmado en nuestros datos, en los que los niveles en circulación de la CgB y de la SgII no se veían afectados por el uso de IBP, mientras que los niveles de la CgA aumentaban claramente en los usuarios de IBP en comparación con los pacientes con insuficiencia cardíaca que no usaban IBP.

Otra ventaja potencial del uso de la CgB y de la SgII en lugar de la CgA es que se ha informado de que se ven menos afectados por una disminución en la función renal en comparación con la CgA (Stridsberg M et al., 2005, Reg Peptides; 125: 193-199, Stridsberg M et al., 2008, Reg Peptides; 148: 95-98), siendo la disminución en la función renal también un importante factor de confusión en el uso de la CgA como biomarcador cardiovascular. Por lo tanto, parece que la CgB y la SgII son unos mejores biomarcadores cardiovasculares que la CgA.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico de la enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, en el que dichos fragmentos de secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para la determinación de la gravedad clínica de la enfermedad cardíaca o un método para el pronóstico de la enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, en el que dichos fragmentos de secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

La presente invención también proporciona una entidad que tiene la capacidad de unirse a la secretogranina II o a fragmentos de la misma, para su uso en el diagnóstico *in vivo* de la enfermedad cardíaca en un sujeto que tiene una enfermedad cardíaca o que potencialmente tiene una enfermedad cardíaca, que comprende la administración de una cantidad apropiada de una entidad que tiene la capacidad de unirse a la secretogranina II o a fragmentos de la misma, al sujeto, y la detección mediante imagen de la presencia y/o de la cantidad y/o de la ubicación de dicha entidad en el sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

La presente invención también proporciona un método para ensayar el potencial terapéutico de una sustancia para el tratamiento de una enfermedad cardíaca, que comprende la administración de una sustancia de prueba a un animal de experimentación que padece una enfermedad cardíaca y la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en dicho animal, preferentemente una disminución o una reducción en los niveles de secretogranina II es indicativa de que la sustancia de prueba tiene un potencial terapéutico, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para la identificación de un eje fisiopatológico activado en un sujeto con una enfermedad cardíaca, para la identificación de un sujeto con una enfermedad cardíaca que requiere una monitorización más intensa, o para la identificación de un sujeto con una enfermedad cardíaca que podría beneficiarse de una intervención terapéutica temprana, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para la monitorización del progreso o de la gravedad de una enfermedad cardíaca, para la evaluación de la eficacia de la terapia de una enfermedad cardíaca, para la monitorización del progreso de la terapia de una enfermedad cardíaca o para la monitorización de un individuo sano, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, preferentemente en el que un aumento en el nivel de secretogranina II, o de los fragmentos de la misma, es indicativo de la progresión o del aumento en la gravedad de la enfermedad cardíaca o son signos tempranos del desarrollo de la enfermedad cardíaca, o en el que una disminución en el nivel de la secretogranina II, o de los fragmentos de la misma, es indicativa de una mejora o de una reducción en la progresión, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

En el presente documento también se divulga un método para el diagnóstico de una enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en un líquido corporal de dicho sujeto. Los métodos de la invención pueden comprender opcionalmente la comparación del nivel de la CgB o de la SgII encontrado en dicho sujeto con un nivel de control.

Sin embargo, debería apreciarse que, aunque el nivel de control para comparación debería derivarse generalmente mediante el ensayo de un conjunto de sujetos de control apropiado, los métodos de la invención no implicarían necesariamente la realización de ensayos activos en dicho conjunto de sujetos de control, sino que generalmente implicaría una comparación con un nivel de control que ha sido previamente determinado a partir de los sujetos de control.

El diagnóstico de un aumento en el nivel de la CgB o de la SgII en un sujeto es indicativo de una enfermedad cardíaca.

Preferiblemente, el nivel del biomarcador en cuestión es determinado mediante el análisis de una muestra de prueba que se obtiene o se extrae a partir de dicho sujeto mediante un medio apropiado. La determinación se lleva a cabo, por lo tanto, preferentemente *in vitro*.

Para la realización de un diagnóstico positivo, el nivel del biomarcador en la muestra de prueba o en el sujeto está aumentado, preferentemente significativamente aumentado, en comparación con el nivel encontrado en una muestra o en un sujeto de control apropiado. Más preferentemente, los niveles significativamente aumentados son estadísticamente significativos, preferentemente con un valor de probabilidad de $< 0,05$.

Contemplado de una forma alternativa, un aumento en el nivel del biomarcador de $\geq 10\%$, $\geq 15\%$, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 35\%$ en comparación con el nivel que se encuentra en una muestra o en un sujeto de control apropiado (es decir, cuando se compara con un nivel de control) es indicativo de un diagnóstico positivo, es decir, de la presencia de una enfermedad cardíaca. Por otro lado, un nivel del biomarcador del 10% o más, del 15% o más o del 20% o más, por debajo del nivel encontrado en una muestra o en un sujeto de control apropiado (es decir, cuando se compara con un nivel de control) es indicativo de un diagnóstico negativo, es decir, de la ausencia de una enfermedad cardíaca.

Alternativamente, pueden usarse unos valores de corte apropiados para la realización del diagnóstico. En dichos métodos, si el nivel del biomarcador está por encima del nivel de corte apropiado (el nivel de corte de "inclusión") entonces se realiza un diagnóstico positivo (es decir, el diagnóstico de una enfermedad cardíaca). Si el nivel del biomarcador está por debajo del nivel de corte de "exclusión", entonces se realiza un diagnóstico negativo, es decir, se considera que los sujetos no tienen una enfermedad cardíaca. Los niveles de un biomarcador entre los niveles de corte de "inclusión" y "exclusión" representan un área gris, es decir, los niveles de biomarcador en los que el diagnóstico es incierto y se requieren ensayos adicionales.

Los métodos apropiados para la determinación de los valores de corte para el diagnóstico de un individuo con una afección o que excluyen/disminuyen la probabilidad de una afección son bien conocidos y están documentados en la materia, y pueden usarse cualquiera de estos (Antman EM., 2002, NEJM, 346 (26): 2079-2082, Maisel AS et al., 2002, NEJM; 347 (3): 161-168). Los valores de corte pueden diferir dependiendo de la afección en cuestión y del método de ensayo usado para la medición de la CgB o de la SgII, y por lo tanto, preferentemente, los valores de corte apropiados deberían ser determinados para la afección en particular y el método de ensayo que se va a usar. Esto puede ser fácilmente realizado por una persona experta en la materia.

En los métodos diagnósticos de la presente invención, los niveles de corte de "inclusión" ejemplares para el diagnóstico de una enfermedad cardíaca, en particular de una insuficiencia cardíaca, son $\geq 1,60$ nmol/l para la CgB (o los fragmentos de la misma) y $\geq 0,145$ nmol/l para la SgII (o los fragmentos de la misma), y unos niveles de corte de "exclusión" ejemplares son $< 1,45$ nmol/l para la CgB (o los fragmentos de la misma) y $< 0,135$ para la SgII (o los fragmentos de la misma), unos niveles de la CgB $\geq 1,45$ - $< 1,60$ nmol/l y unos niveles de la SgII $\geq 0,135$ - $\geq 0,145$ nmol/l pueden representar por lo tanto un "área gris", es decir, unos niveles del biomarcador en los que el diagnóstico es incierto y se requieren ensayos adicionales. Esta metodología es similar a la metodología actualmente en uso clínico con los péptidos natriuréticos para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca (Isaac DL., 2008, Curr Opin Cardiol; 23: 127-133). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, dado que los niveles de corte pueden diferir según la afección evaluada y el método usado para la medición de la CgB y de la SgII en una muestra, los niveles proporcionados en este documento son particularmente aplicables a los métodos en los que los niveles de la CgB y de la SgII se determinan mediante un ensayo (por ejemplo, un ensayo de radioinmunoensayo) que mide los epítomos CgB439-451 o SgII154-165, por ejemplo, según se describe en cualquier parte del presente documento, y al diagnóstico de una insuficiencia cardíaca. Estos niveles también son de particular relevancia con respecto a los niveles de estos marcadores encontrados en líquidos corporales específicos, por ejemplo, en la saliva, o como en este caso, en muestras circulatorias, por ejemplo, en la sangre. Además, estos niveles son de particular relevancia en las muestras tomadas a partir de sujetos humanos.

Por lo tanto, en las realizaciones preferidas de la invención, un nivel de la CgB (o de fragmentos de la misma) de al menos $1,60$ nmol/l o un nivel de la SgII (o de fragmentos de la misma) de al menos $0,145$ nmol/l, si se miden mediante un radioinmunoensayo que mide los epítomos CgB439-451 o SgII154-165 (o un valor equivalente para la CgB o para la SgII si se miden mediante un ensayo alternativo, por ejemplo, que refleja un aumento en el nivel del biomarcador de, por ejemplo, $\geq 10\%$ en comparación con el nivel encontrado en la muestra o el sujeto de control apropiado) medido en la sangre, es indicativo de un diagnóstico positivo, es decir, de la presencia de una enfermedad cardíaca. Dichos niveles son particularmente apropiados para las muestras circulatorias.

De forma similar, en la saliva, unos niveles de la CgB de al menos $0,40$ nmol/l y unos niveles de la SgII de al menos $0,040$ nmol/l parecen reflejar una enfermedad cardíaca, por ejemplo, según se encuentra en los pacientes con una insuficiencia cardíaca isquémica y en los pacientes con TVPC. Por otro lado, en la saliva, un nivel de la CgB (o de fragmentos de la misma) de menos de $0,40$ nmol/l o un nivel de la SgII (o de fragmentos de la misma) de menos de $0,040$ nmol/l es indicativo de un diagnóstico negativo, es decir, de la ausencia de una enfermedad cardíaca.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas adicionales de la invención, un nivel de la CgB (o de fragmentos de la misma) medido en la sangre de menos de $1,45$ nmol/l o un nivel de la SgII (o de fragmentos de la misma) de menos de $0,135$ nmol/l, si se mide mediante un radioinmunoensayo que mide los epítomos CgB439-451 o SgII154-165 (o un valor equivalente para la CgB o para la SgII si se mide mediante un ensayo alternativo, por ejemplo, que refleje un nivel del biomarcador de, por ejemplo, un 10% o más por debajo de lo que se encuentra en una muestra o en un sujeto de control apropiado), es indicativo de un diagnóstico negativo, es decir, de la ausencia de una enfermedad cardíaca.

De forma análoga, en la saliva, un nivel de la CgB (o de fragmentos de la misma) de menos de $0,40$ nmol/l o un nivel

de la SgII (o de fragmentos de la misma) de menos de 0,040 nmol/l si se mide mediante un radioinmunoensayo que mide los epítomos CgB439-451 o SgII154-165 (o un valor equivalente para la CgB o para la SgII si se mide mediante un ensayo alternativo, por ejemplo, que refleje un nivel del biomarcador de, por ejemplo, un 10 % o más por debajo de lo que se encuentra en una muestra o en un sujeto de control apropiado), es indicativo de un diagnóstico negativo, es decir, de la ausencia de una enfermedad cardíaca.

En los resultados descritos en el presente documento se ha demostrado que los niveles en circulación tanto de la CgB como de la SgII estaban significativamente aumentados en los sujetos con una enfermedad cardíaca en comparación con los sujetos de control ($p = 0,007$ y $p < 0,001$, respectivamente). Los niveles de ambas, CgB y SgII, también demostraron ser excelentes para la discriminación entre individuos enfermos y sanos (ROC-AUC: CgB = 0,70, $p = 0,001$ y SgII = 0,84, $p = 0,0001$).

El sistema de clasificación de la New York Heart Association (NYHA) divide la enfermedad cardíaca en cuatro clases, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Clase I de la NYHA: paciente con una enfermedad cardíaca pero sin limitaciones resultantes en la actividad física; Clase II: paciente con una enfermedad cardíaca que da como resultado una ligera limitación en la actividad física. Clase III: paciente con una enfermedad cardíaca que da como resultado una acusada limitación en el rendimiento físico. Se sienten bien si descansan. Clase IV: paciente con una enfermedad cardíaca que da como resultado una incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin molestias. Puede haber presentes síntomas durante el reposo.

Los métodos descritos en el presente documento son adecuados para el diagnóstico de todas las clases de insuficiencia cardíaca. En las realizaciones preferidas de la invención, los métodos se usan para el diagnóstico de pacientes de las clases III y IV de la NYHA, ya que una mayor proporción de estos pacientes tendrá unos niveles por encima de los límites de corte de "inclusión" para cualquier ensayo particular usado para la medición de la CgB o de la SgII. Los métodos descritos en el presente documento son considerados de igual mérito en todas las clases de la NYHA para un pronóstico preciso y para la monitorización de los pacientes.

En el presente documento se ha demostrado que no sólo puede usarse un aumento en el nivel de la CgB o de la SgII para el diagnóstico de la presencia de una enfermedad cardíaca, sino que el nivel de la CgB o de la SgII muestra una asociación significativa con la gravedad de la enfermedad cardíaca.

Por lo tanto, en el presente documento también se divulga un método para la determinación de la gravedad clínica de una enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en un líquido corporal de dicho sujeto. Dicho método o un método para la determinación de la gravedad clínica de una enfermedad cardíaca en un sujeto de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente la comparación del nivel encontrado en dicho sujeto con un nivel de control.

El nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en un sujeto, es indicativo de la gravedad de la enfermedad cardíaca, aumentando el nivel de la CgB o de la SgII al aumentar la gravedad de la enfermedad cardíaca. Por lo tanto, un aumento en el nivel es indicativo de la gravedad de la enfermedad cardíaca y cuanto más aumente el nivel de la CgB o de la SgII, mayor será la probabilidad de una forma más grave de la enfermedad, por ejemplo, de una enfermedad de la clase a III o IV de la NYHA, o equivalente.

También puede usarse la medición sucesiva (periódica) de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, para monitorizar la gravedad de la enfermedad cardíaca buscando un aumento o una disminución en los niveles con el tiempo. Como se ha demostrado que los niveles altos están asociados con un peor estado funcional, el uso de una medición sucesiva de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, también puede usarse para guiar y monitorizar la terapia, tanto en un contexto de enfermedad subclínica, es decir, en la situación de "conducta expectante" antes del tratamiento o de la cirugía, por ejemplo, antes de una cirugía valvular cardíaca o de empezar una terapia farmacéutica, como durante o después del tratamiento para evaluar el efecto del tratamiento y buscar signos de fracaso de la terapia.

Para un uso pronóstico y para la monitorización de individuos con una enfermedad cardíaca, se asume que hay una asociación lineal entre la gravedad de la enfermedad cardíaca/riesgo y los niveles de la CgB y de la SgII, teniendo los pacientes con menos riesgo o los pacientes con una enfermedad cardíaca menos grave unos niveles cercanos a los límites de corte de "exclusión", pero estando cualquier aumento en el nivel asociado con un aumento en la gravedad de la enfermedad cardíaca o con un empeoramiento del pronóstico. Esto también es comparable con la metodología usada actualmente con los péptidos natriuréticos para la estimación del riesgo (Mills RM., 2008, JACC; 51 (24): 2336-2338). Por lo tanto, es probable que cualquier aumento en el nivel de la CgB o de la SgII represente una enfermedad cardíaca más grave o un empeoramiento del pronóstico. Además, en general, cuanto mayor es el aumento, mayor es la gravedad de la enfermedad cardíaca o peor es el pronóstico. Por ejemplo, se considera que unos niveles de la CgB (o de un fragmento) $\geq 1,80$ nmol/l o unos niveles de la SgII (o de un fragmento) $\geq 0,180$ nmol/l están asociados con una enfermedad cardíaca especialmente grave o con un pronóstico especialmente malo. Asimismo, un aumento en el nivel del biomarcador del ≥ 20 %, ≥ 25 %, ≥ 30 % o ≥ 35 % en comparación con el nivel encontrado en una muestra o en un sujeto de control apropiado (es decir, cuando se compara con un nivel de

control) es indicativo de una enfermedad cardíaca especialmente grave o de un pronóstico especialmente malo. Adicionalmente, cualquier aumento $\geq 20\%$ (por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 35\%$) en el valor del biomarcador de la situación inicial de un individuo durante ensayos sucesivos del biomarcador se considera que aumenta claramente la gravedad de la enfermedad cardíaca o que empeora el pronóstico, incluso cuando los niveles del biomarcador están por debajo de los límites de corte de "inclusión".

Por lo tanto, en las realizaciones preferidas de la invención, un nivel de la CgB (o de un fragmento) de al menos 1,80 nmol/l o un nivel de la SgII (o de un fragmento) de al menos 0,180 nmol/l si se mide mediante un radioinmunoensayo que mide los epítomos CgB439-451 o SgII154-165 (o un valor equivalente para la CgB o para la SgII si se mide mediante un ensayo alternativo, por ejemplo, que refleje un aumento en el nivel del biomarcador de, por ejemplo, $\geq 20\%$ o en comparación con el nivel encontrado en una muestra o en un sujeto de control apropiado) es indicativo de una enfermedad cardíaca especialmente grave o de un pronóstico especialmente malo. Dichos niveles son particularmente apropiados para las muestras circulatorias.

Aunque los métodos de la presente invención pueden usarse para la determinación de la gravedad clínica de la enfermedad cardíaca evaluada mediante cualquier medición clínica apropiada, una medición típica y preferida de la gravedad clínica se evalúa mediante la valoración de la clase de la NYHA.

En los resultados descritos en este documento, se ha demostrado que los niveles en circulación de la CgB y de la SgII están regulados según la gravedad de la enfermedad cardíaca en los seres humanos (prueba de tendencia: CgB: $p = 0,001$, SgII: $p < 0,001$; individuos clasificados como controles, clase II de la NYHA, clase III de la NYHA y clase IV de la NYHA). Por lo tanto, puede apreciarse que se ha encontrado una estrecha asociación entre los niveles en circulación de la CgB y de la SgII y la gravedad de la enfermedad cardíaca. Los datos de los modelos experimentales también apoyan la regulación de la CgB y de la SgII según la gravedad de la enfermedad cardíaca, ya que hemos encontrado estrechas relaciones entre el peso de los pulmones de los animales (que reflejan una congestión pulmonar secundaria a una insuficiencia de la bomba miocárdica) y la cantidad de CgB y de SgII en el miocardio tanto a nivel de ARNm como de proteína. La regulación de la producción de la CgB y de la SgII en el miocardio en proporción con la gravedad de la insuficiencia cardíaca también se ve reflejada en la estrecha correlación encontrada entre los niveles de CgB y de SgII y la respuesta hipertrófica compensatoria en el ventrículo izquierdo. Aquí, la gravedad de la insuficiencia cardíaca es evaluada mediante la medición de la masa del ventrículo izquierdo.

Además, se ha observado que la expresión de la CgB muestra una asociación más fuerte con el peso del pulmón del animal (gravedad de la enfermedad) que la asociación entre la expresión del BNP y el peso del pulmón. Adicionalmente, en un análisis multivariado, la expresión génica de la CgB se asociaba independientemente con el peso de los pulmones de los animales (es decir, la gravedad de la enfermedad) ($p = 0,003$), mientras que la asociación entre la expresión génica del BNP y el peso de los pulmones de los animales estaba atenuada, y únicamente tenía una significación límite ($p = 0,08$). El aumento relativo en la expresión génica de la SgII tras la aparición de una enfermedad cardíaca también era sustancialmente mayor que el cambio en la expresión génica del BNP. Estos resultados, junto con los mayores ROC-AUC para los niveles en circulación de la CgB y de la SgII en comparación con los de la CgA en la enfermedad humana, apoyan claramente el hecho de que los métodos que implican la determinación de los niveles de la CgB y de la SgII muestran unas ventajas y unas mejoras con respecto a los métodos que implican los biomarcadores cardíacos usados actualmente.

En el presente documento también se divulga un método para el pronóstico de una enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en un líquido corporal de dicho sujeto.

Dicho método o un método para el pronóstico de una enfermedad cardíaca en un sujeto de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente la comparación entre el nivel encontrado en dicho sujeto y un nivel de control.

El nivel es indicativo del pronóstico para el sujeto. Un aumento en el nivel en dicho sujeto es indicativo de un mal pronóstico para el paciente con una enfermedad cardíaca. Por el contrario, un nivel en el intervalo de control o inferior, por ejemplo, por debajo de los límites de "exclusión", es indicativo de un buen pronóstico.

Como se ha mencionado anteriormente, para un uso pronóstico se asume que hay una asociación lineal entre el riesgo y los niveles de la CgB y de la SgII, teniendo los pacientes con bajo riesgo unos niveles cercanos a los límites de corte de "exclusión", pero asociándose cualquier aumento en el nivel con un empeoramiento del pronóstico. Esto también es comparable con la metodología usada actualmente con los péptidos natriuréticos para la estimación del riesgo (Mills RM., 2008, JACC; 51 (24): 2336-2338). Por lo tanto, es probable que cualquier aumento en el nivel de la CgB o de la SgII represente un empeoramiento del pronóstico. Además, en general, cuanto mayor es el aumento, peor es el pronóstico. Por ejemplo, se considera que unos niveles de la CgB (o de un fragmento) $\geq 1,80$ nmol/l o unos niveles de la SgII (o de un fragmento) $\geq 0,180$ nmol/l están asociados con un pronóstico especialmente malo. Asimismo, un aumento en el nivel del biomarcador del $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 35\%$ en comparación con el nivel

que se encuentra en una muestra o en un sujeto de control apropiado (es decir, cuando se compara con un nivel de control), es indicativo de un pronóstico especialmente malo. Adicionalmente, cualquier aumento $\geq 20\%$ (por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 35\%$) en el valor del biomarcador de la situación inicial de un individuo durante ensayos sucesivos del biomarcador se considera claramente que empeora el pronóstico, incluso cuando los niveles del biomarcador están por debajo de los límites de corte de "inclusión".

Por lo tanto, en las realizaciones preferidas de la invención, un nivel de la CgB (o de un fragmento) de al menos 1,80 nmol/l o un nivel de la SgII (o de un fragmento) de al menos 0,180 nmol/l si se mide mediante un radioinmunoensayo que mide los epítomos CgB439-451 o SgII154-165 (o un valor equivalente para la CgB o para la SgII si se mide mediante un ensayo alternativo, por ejemplo, que refleje un aumento en el nivel del biomarcador de, por ejemplo, $\geq 20\%$ en comparación con el nivel que se encuentra en una muestra o en un sujeto de control apropiado), es indicativo de un pronóstico especialmente malo. Dichos niveles son particularmente apropiados para las muestras circulatorias.

La medición sucesiva (periódica) de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, también puede usarse con fines pronósticos para buscar un aumento o una disminución en los niveles con el tiempo.

El término "pronóstico", según se usa en el presente documento, se refiere a, e incluye, una predicción del riesgo de la gravedad de la enfermedad o del curso y el resultado clínico probable asociado con una enfermedad. Asociada con esta, también está la capacidad de clasificar o discriminar a los pacientes según la probabilidad de si las diversas opciones de tratamiento pueden ser beneficiosas o perjudiciales para un individuo, es decir, el uso de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, para guiar el tratamiento. En el caso de una enfermedad cardíaca, que ese sujeto de la presente invención, dicha predicción del curso y el resultado clínico incluye una predicción de cualquier curso o resultado clínicamente relevante, por ejemplo, la predicción de la tasa de morbilidad y mortalidad, de la probabilidad de recuperación, de la probabilidad de admisión en el hospital, de la probabilidad de un acontecimiento cardiovascular posterior, la predicción de una reducción en los acontecimientos cardiovasculares totales, la predicción de un retraso en el tiempo hasta el primer acontecimiento cardiovascular, la probabilidad de desarrollar complicaciones potencialmente mortales, o en general la predicción de la velocidad de desarrollo de la enfermedad cardíaca. Preferiblemente, los métodos pronósticos de la presente invención se usan para la predicción de la morbilidad o de la mortalidad. Por lo tanto, el riesgo de morbilidad y de mortalidad está aumentado en los pacientes con un aumento en los niveles de la CgB o de la SgII.

Para la estratificación del riesgo de un individuo, tanto previamente sano como enfermo (y de hecho, para todos los aspectos de la invención descritos en el presente documento) puede usarse la SgII, o fragmentos de la misma, individualmente, representando el biomarcador de la SgII un biomarcador único, y por lo tanto se evalúa sólo, o pueden usarse los biomarcadores CgB y SgII en combinación, o finalmente, puede usarse el biomarcador SgII tanto individualmente como junto con CgB, como parte de un grupo más amplio de diferentes biomarcadores cardiovasculares (metodología multimarcador).

La medición de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, también puede usarse para el diagnóstico o para la identificación del proceso fisiopatológico subyacente activado en un individuo, tanto en un contexto de enfermedad subclínica, es decir, un deterioro de la función cardíaca pero sin síntomas clínicos evidentes, y por lo tanto, una enfermedad cardíaca no reconocida, como en individuos con una enfermedad cardíaca establecida. Este aspecto puede ser beneficioso en la determinación de la terapia, de los esquemas de seguimiento y del establecimiento del pronóstico.

Siguiendo con el análisis anterior sobre los métodos diagnósticos y pronósticos de la invención, también pueden usarse para la identificación de los sujetos que requieren una monitorización más intensa o de los sujetos que podrían beneficiarse de una intervención terapéutica temprana para la enfermedad cardíaca, por ejemplo, mediante una cirugía, una terapia farmacéutica o una terapia no farmacéutica.

En el presente documento también se divulga un método para la identificación de los sujetos que requieren una monitorización más intensa o de los sujetos que podrían beneficiarse de una intervención terapéutica temprana, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en un líquido corporal de dicho sujeto.

Los métodos de la invención también pueden usarse para monitorizar el progreso de la enfermedad cardíaca en un sujeto. Dicha monitorización puede tener lugar antes, durante o después del tratamiento de la enfermedad cardíaca mediante una cirugía o una terapia.

Después de dicha cirugía o terapia, pueden usarse los métodos de la presente invención para monitorizar el progreso de la enfermedad cardíaca, para evaluar la eficacia de la terapia o para monitorizar el progreso de la terapia, es decir, puede usarse para una monitorización activa de la terapia. En dichos casos, las mediciones sucesivas (periódicas) de los niveles de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, para evaluar los cambios en dichos niveles de biomarcadores, permitirán la evaluación de si la cirugía o la terapia de la enfermedad cardíaca ha sido eficaz o no, o hasta qué punto, de si la enfermedad cardíaca ha vuelto a aparecer o no, o ha

empeorado en el sujeto, y también el probable resultado clínico (pronóstico) de la enfermedad cardíaca si reaparece o empeora.

Igualmente, los métodos de la presente invención pueden usarse en la monitorización activa de pacientes que no han sido sometidos a cirugía ni a terapia, por ejemplo, para monitorizar el progreso de la enfermedad en pacientes sin tratar. De nuevo, unas mediciones sucesivas permitirán una evaluación de si la enfermedad cardíaca ha empeorado o no, o hasta qué punto, permitiendo por tanto, por ejemplo, tomar una decisión más razonada sobre si es necesaria o recomendable una intervención terapéutica.

Dicha monitorización puede llevarse a cabo incluso en un individuo sano, por ejemplo, un individuo que se cree que está en riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca, con objeto de obtener una indicación temprana e idealmente preclínica de la enfermedad cardíaca.

Generalmente, en dichas realizaciones, un aumento en el nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, es indicativo de la progresión de la enfermedad cardíaca o son signos tempranos de desarrollo de una enfermedad cardíaca. Por el contrario, una disminución en el nivel es indicativa de una mejora o de una reducción en la progresión.

En el presente documento también se divulga un método para la monitorización de un sujeto con una enfermedad cardíaca o de un individuo sano, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en un líquido corporal de dicho sujeto.

Por lo tanto, la asociación observada entre el aumento en los niveles de la CgB o de la SgII y la presencia y la gravedad de la insuficiencia cardíaca, también permitirá una monitorización activa de los pacientes y que tenga lugar su tratamiento, y el seguimiento de los resultados clínicos. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden usarse para guiar la gestión de la enfermedad cardíaca y preferentemente para optimizar la terapia.

Como se ha mencionado anteriormente, la identificación de unos biomarcadores de calidad para una enfermedad cardíaca permitiría una metodología multimarcador para el diagnóstico (y también para el pronóstico). Por lo tanto, los métodos de la presente invención que comprenden la determinación de los niveles de la SgII, o de fragmentos de la misma, o los métodos también divulgados en el presente documento que comprenden la determinación de los niveles de la CgB, o de fragmentos de la misma, podrían usarse no sólo en lugar de la medición de otros biomarcadores (es decir, usarse como marcadores individuales), sino que también podrían usarse en combinación, o además de, la medición de uno o más de otros biomarcadores conocidos que se sabe que están asociados con una enfermedad cardíaca (es decir, en un ensayo multimarcador).

Por lo tanto, los métodos preferidos de la invención comprenden adicionalmente la determinación del nivel, preferentemente del nivel en un líquido corporal, de uno o más de otros biomarcadores asociados con una enfermedad cardíaca.

Algunos "otros biomarcadores" adecuados podrían ser cualquiera de los ya documentados en la materia (Braunwald E., 2008, NEJM; 2148-2159) e incluyen las troponinas específicas cardíacas tales como TnI y TnT, péptidos natriuréticos tales como ANP, BNP y NT-proBNP y otros biomarcadores secretados secundarios a una tensión/estrés en los cardiomiocitos tales como ST2 y pro-adrenomedulina, marcadores de inflamación tales como la proteína C reactiva (CRP) y varias citocinas/quimiocinas, marcadores de remodelado extracelular tales como las MMP y las TIMP, otros marcadores de necrosis/apoptosis aparte de las troponinas tales como la proteína de ácido graso de tipo cardíaco, marcadores de actividad neuroendocrina tales como catecolaminas, aldosterona, angiotensina II y la granina CgA, marcadores de estrés oxidante tales como mieloperoxidasa y otros marcadores asociados con, y que reflejan, ejes fisiopatológicos activados en una enfermedad cardíaca.

Los ensayos multimarcador preferidos implican al menos la determinación de la CgB y de la SgII, de la CgB y de los péptidos natriuréticos (por ejemplo, el BNP), de la SgII y de los péptidos natriuréticos (por ejemplo, el BNP), o de la CgB y de la SgII y de los péptidos natriuréticos (por ejemplo, el BNP). Opcionalmente también puede medirse una o más de las troponinas específicas cardíacas o uno o más marcadores de la respuesta inflamatoria. La CgA también es un biomarcador adicional preferido para ser usado junto con la CgB y/o la SgII. Sin embargo, a veces se prefiere que los métodos de la invención no impliquen la determinación de los niveles de la CgA. Igualmente se contempla que puedan usarse los métodos de la invención junto con uno o más biomarcadores que pudieran ser identificados en un futuro.

Una realización adicional de la invención proporciona el uso de los métodos de diagnóstico o de pronóstico de la invención tanto solos como junto con otros métodos de diagnóstico o de pronóstico conocidos para una enfermedad cardíaca.

En el presente documento también se divulga un kit para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad cardíaca que comprende un agente adecuado para la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en una muestra. Los agentes preferidos son anticuerpos dirigidos contra la CgB o la SgII, o fragmentos de

las mismas. Otros agentes preferidos son moléculas de CgB y de SgII marcadas, o fragmentos de las mismas. En los aspectos preferidos, dichos kits son para su uso en los métodos de la invención según se describe en el presente documento.

Los términos "enfermedad o trastorno cardíaco", según se usan en el presente documento, se refieren a enfermedades y trastornos cardíacos en los que la función cardíaca está deteriorada o alterada de una forma perjudicial. En particular, estos términos incluyen una enfermedad cardíaca subclínica o preclínica, es decir, enfermedades en las que la función cardíaca está deteriorada pero no muestra síntomas evidentes de una enfermedad cardíaca (en ocasiones se denomina enfermedad cardíaca no reconocida), así como una enfermedad cardíaca clínica o evidente. Por lo tanto, estos términos engloban todas las enfermedades asociadas con una patología en el corazón, bien debida a una lesión directa en el propio corazón, o bien secundaria a una tensión sobre el corazón procedente de otras fuentes, por ejemplo, hipertensión, y que generalmente se caracterizan por una función cardíaca deteriorada, por ejemplo, una insuficiencia cardíaca.

Algunos ejemplos típicos de dichas enfermedades son las insuficiencias cardíacas isquémicas (cardiomiopatías isquémicas) tales como la angina de pecho y los síndromes coronarios agudos (angina de pecho inestable e infarto agudo de miocardio), insuficiencia cardíaca, cardiomiopatías, enfermedad valvular cardíaca, arritmias (por ejemplo, fibrilación auricular, taquicardias supraventriculares, arritmias ventriculares), enfermedad cardíaca congénita, afecciones asociadas con una hipertrofia de las células del corazón (hipertrofia cardíaca), por ejemplo, una hipertrofia del ventrículo izquierdo, afecciones asociadas con un rechazo después de un trasplante cardíaco y una hipertrofia miocárdica secundaria a una tensión sobre el corazón (según se observa, por ejemplo, en la hipertensión arterial). Asimismo, una función cardíaca reducida secundaria a otras enfermedades, por ejemplo, diabetes sacarina, enfermedades del tejido conectivo (inmunopatías), vasculitis, o secundaria a un tratamiento médico, por ejemplo, quimioterapia o radioterapia en pacientes oncológicos, también son algunos ejemplos de afecciones cubiertas por estas reivindicaciones.

El principal subgrupo de insuficiencia cardíaca es la insuficiencia cardíaca isquémica crónica, es decir, una cardiomiopatía isquémica crónica. Otro subgrupo de insuficiencia cardíaca incluye la cardiomiopatía no isquémica crónica, incluyendo la cardiomiopatía dilatada idiopática y la cardiomiopatía debida a la hipertensión, a una enfermedad valvular o a defectos congénitos.

La enfermedad arterial coronaria (EAC), denominada también insuficiencia cardíaca isquémica (ICI), es un ejemplo adicional de una enfermedad cardíaca que puede dar lugar a varias consecuencias clínicas: al desarrollo de una angina de pecho estable, a síndromes coronarios agudos (angina de pecho inestable e infarto agudo de miocardio) y a una insuficiencia cardíaca isquémica crónica o a una cardiomiopatía. Por lo tanto, la EAC puede dar lugar a una insuficiencia cardíaca (es decir, a una cardiomiopatía isquémica crónica), pero claramente no es idéntica a una insuficiencia cardíaca. Otro ejemplo de una enfermedad cardíaca es la enfermedad de la arteria coronaria por el trasplante (una afección crónica del corazón trasplantado).

Otros ejemplos de enfermedades cardíacas son la miocarditis aguda y la cardiomiopatía dilatada aguda.

Los métodos de la presente invención son eficaces para el diagnóstico o el pronóstico de la insuficiencia cardíaca independientemente de la causa de la enfermedad. Por ejemplo, la insuficiencia cardíaca puede ser el resultado de una enfermedad primaria o puede ser secundaria a otra enfermedad. En una realización preferida de la invención, la insuficiencia cardíaca que se va a diagnosticar o a pronosticar es secundaria a una cardiomiopatía dilatada idiopática (IDCM) y/o a una enfermedad isquémica coronaria (enfermedad arterial coronaria - EAC). Los resultados presentados en el presente documento sugieren que los métodos de la invención son particularmente eficaces para la evaluación de las enfermedades cardíacas asociadas con una función del calcio desregulada y una etiología isquémica.

Los resultados presentados en el presente documento apoyan la idea de que la familia de la granina en general, y particularmente los biomarcadores SgII y CgB, son marcadores asociados con, e indicativos de, una desregulación en la señalización del Ca^{2+} *in vivo*. Por lo tanto, se cree que la SgII y la CgB van a ser biomarcadores útiles para cualquier enfermedad cardíaca mediada o asociada o relacionada con el calcio, por ejemplo, enfermedades cardíacas asociadas con una señalización o una función desregulada o de otro modo disfuncional del Ca^{2+} en el corazón, por ejemplo, enfermedades asociadas a una regulación del calcio en los cardiomiocitos desregulada o de otro modo disfuncional. Algunos ejemplos preferidos de dichas enfermedades son la isquemia miocárdica aguda, hipertrofia miocárdica, el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, varios tipos de arritmias y de taquicardias (por ejemplo, taquicardias ventriculares) y la muerte cardíaca súbita causada, por ejemplo, por arritmias mediadas por una disfunción en la homeostasis del calcio de los cardiomiocitos, y más específicamente, debida a una disfunción en la función del receptor de la rianodina en los cardiomiocitos ventriculares. Cuando se trata de arritmias, aunque algunas formas son inocuas, generalmente son extremadamente difíciles de diagnosticar ya que los síntomas pueden variar, y la muerte cardíaca súbita puede ser la primera manifestación. La taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica (TVPC) es un ejemplo de dicha enfermedad arritmogénica en la que puede producirse una muerte cardíaca súbita y es el prototipo de ejemplo de una enfermedad cardíaca mediada por el calcio. Los nuevos marcadores para el diagnóstico de dichas arritmias tienen, por lo tanto, una gran demanda, y los resultados

presentados en el presente documento para los pacientes con TVPC demuestran que puede usarse la determinación de los niveles de la CgB o de la SgII para el diagnóstico de dichas enfermedades.

La TVPC es una forma heredable de trastorno arritmogénico causado por una taquicardia ventricular polimorfa inducida por el ejercicio o emocional en ausencia de una enfermedad cardíaca estructural detectable. Debido a la tendencia al desarrollo de una taquicardia ventricular y la posterior fibrilación ventricular, la TVPC es un trastorno especialmente peligroso, también en individuos jóvenes. Un mecanismo para la propensión al desarrollo de arritmias es la manipulación disfuncional del calcio (Ca^{2+}) en los cardiomiocitos y un receptor de rianodina poroso (RyR), bien como consecuencia de una mutación en el propio receptor, o bien debido a una mutación en la calsecuestrina, una proteína de unión al Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS). El diagnóstico se basa actualmente en la identificación de los pacientes mediante unos antecedentes típicos del paciente con un síncope inducido por estrés, o unos antecedentes de muerte súbita la familia, y la confirmación del diagnóstico mediante un cribado genético molecular de los genes que codifican para el receptor cardíaco de la rianodina y la calsecuestrina. Sin embargo, dado que los síntomas pueden variar y que la muerte cardíaca súbita puede ser la primera manifestación, son necesarios nuevos marcadores para la identificación y el diagnóstico de la TVPC. También es probable que la capacidad para monitorizar pacientes con TVPC sea valiosa, ya que los informes han indicado una elevada probabilidad de acontecimientos en pacientes que son tratados según las directrices actuales.

Por lo tanto, las enfermedades cardíacas mediadas o asociadas con el calcio, tales como las enfermedades cardíacas asociadas con una señalización o una función desregulada o de otro modo disfuncional del Ca^{2+} , por ejemplo, una isquemia miocárdica aguda, una hipertrofia miocárdica, el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, varios tipos de arritmias y de taquicardias (por ejemplo, TVPC o taquicardias ventriculares) y la muerte cardíaca súbita, son algunas enfermedades cardíacas preferidas para los métodos de la presente invención.

Los resultados presentados en el presente documento también muestran un uso particular de los métodos de la presente invención en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca isquémica, por ejemplo, en pacientes admitidos en el hospital con el síntoma primario de dolor pectoral, y en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda, por ejemplo, en pacientes admitidos al hospital con el síntoma primario de disnea. La mejora en el diagnóstico de dichos pacientes, particularmente en el contexto clínico, por ejemplo, en su admisión en el hospital, es claramente ventajosa.

Algunos tipos preferidos de enfermedades cardíacas que van a ser diagnosticadas o pronosticadas según la presente invención son una enfermedad cardíaca preclínica, enfermedades cardíacas asociadas con una señalización o una función desregulada o de otro modo disfuncional del Ca^{2+} , por ejemplo, una isquemia miocárdica aguda, una hipertrofia miocárdica, el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, varios tipos de arritmias y de taquicardias (por ejemplo, TVPC o taquicardias ventriculares) y la muerte cardíaca súbita, síndromes coronarios agudos, enfermedades que implican una hipertrofia de las células cardíacas (hipertrofia cardíaca), en particular una hipertrofia del ventrículo izquierdo, una enfermedad cardíaca isquémica, cardiomiopatías, una enfermedad valvular cardíaca o una insuficiencia cardíaca (por ejemplo, una insuficiencia cardíaca compensada o descompensada).

Algunos ejemplos especialmente preferidos son insuficiencia cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca compensada o descompensada), insuficiencia cardíaca isquémica, cardiomiopatías y TVPC.

Como se ha aludido anteriormente de forma resumida, la insuficiencia cardíaca es un trastorno habitual del corazón y puede ser definido como cualquier trastorno estructural o funcional que reduce la capacidad del corazón para llenarse o para bombear una cantidad suficiente de sangre por todo el cuerpo. Por lo tanto, la insuficiencia cardíaca incluye síndromes en los que el corazón es incapaz de bombear sangre suficiente para satisfacer las necesidades de los órganos periféricos, por ejemplo, en términos de oxígeno y de nutrientes celulares, en reposo y/o durante un esfuerzo, alternativamente únicamente a unas presiones o a unos volúmenes diastólicos anormalmente elevados. Este término también incluye tanto las formas descompensadas de insuficiencia cardíaca con congestión pulmonar (por ejemplo, la insuficiencia cardíaca descompensada aguda, ADIC) como las formas compensadas de insuficiencia cardíaca. De hecho, los datos presentados en el presente documento demuestran que los niveles de la CgB y de la SgII están aumentados en los pacientes con las formas descompensada o compensada de la insuficiencia cardíaca, lo que indica que la presente invención es útil en los pacientes con cualquiera de estas formas de insuficiencia cardíaca.

Existen diversas causas diferentes de insuficiencia cardíaca, de las cuales la más habitual en el mundo occidental es la enfermedad arterial coronaria. Otras causas habituales son la cardiomiopatía (primaria o secundaria), la hipertensión, las enfermedades valvulares y los defectos valvulares congénitos.

A menudo, la causa es una disminución en la contractilidad del ventrículo izquierdo (insuficiencia cardíaca sistólica) que da como resultado una disminución en el flujo sanguíneo coronario (por ejemplo, una insuficiencia cardíaca causada por una enfermedad isquémica coronaria), pero la incapacidad para bombear unas cantidades adecuadas de sangre también puede estar causada por daños en las válvulas cardíacas, una presión externa alrededor del corazón, enfermedades primarias del músculo cardíaco (por ejemplo, una cardiomiopatía dilatada idiopática) o cualquier otra anomalía que hace que el corazón sea una bomba menos eficaz.

Una reducción en el llenado diastólico cardíaco también puede dar lugar a una incapacidad para bombear sangre suficiente para satisfacer las necesidades de los órganos periféricos en términos de oxígeno y de nutrientes celulares durante el reposo y/o durante el esfuerzo, alternativamente únicamente a unas presiones o a unos volúmenes diastólicos anormalmente elevados, aunque la función cardíaca sistólica está conservada. Esto se denomina insuficiencia cardíaca diastólica o insuficiencia cardíaca con la fracción/función de eyección ventricular izquierda conservada y también se ha reconocido como una parte importante del síndrome de insuficiencia cardíaca. El uso de la SgII, o de fragmentos de la misma, en el diagnóstico o el pronóstico de una insuficiencia cardíaca diastólica es una realización adicional de la invención. El uso de la CgB, o de fragmentos de la misma, en el diagnóstico o el pronóstico de una insuficiencia cardíaca diastólica también se divulga en el presente documento.

La insuficiencia cardíaca se puede manifestar de cualquiera de estas dos formas: (1) mediante una disminución en el gasto cardíaco (insuficiencia anterógrada) o (2) por una obstrucción de la sangre en las venas por detrás del corazón izquierdo o derecho (insuficiencia retrógrada). El corazón puede fallar como una unidad completa, o bien pueden fallar independientemente entre sí el lado izquierdo o el lado derecho. De cualquier forma, este tipo de insuficiencia cardíaca da lugar a una congestión circulatoria, y como resultado, también se denomina insuficiencia cardíaca congestiva (ICC o IC). Por lo tanto, el término insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) también se usa en el presente documento para indicar la insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca puede dividirse adicionalmente en dos fases, la insuficiencia cardíaca aguda (a corto plazo e inestable) y la insuficiencia cardíaca crónica (a largo plazo y relativamente estable). Hemos averiguado que el aumento en los niveles de la CgB y de la SgII tanto en la insuficiencia cardíaca aguda como en la crónica, en comparación con los sujetos de control, indica que la invención actual tendrá la misma importancia en los pacientes con una insuficiencia cardíaca tanto aguda como crónica.

Dado que los síntomas y los hallazgos clínicos pueden variar ampliamente entre los pacientes, el diagnóstico de la enfermedad cardíaca en general, y especialmente de la insuficiencia cardíaca, puede ser difícil. De hecho, la enfermedad cardíaca, y en particular la insuficiencia cardíaca, a menudo quedan sin diagnosticar, particularmente cuando los síntomas son leves. Los mejores métodos de diagnóstico usados actualmente son tediosos, caros, requieren equipos especiales y no son generalmente fáciles de realizar en el paciente encamado. Por ejemplo, habitualmente se usa una ecocardiografía o una radiografía de tórax para apoyar el diagnóstico clínico de una insuficiencia cardíaca, o se usa un electrocardiograma (ECG) para la identificación de arritmias, de una insuficiencia cardíaca isquémica, de una hipertrofia ventricular derecha e izquierda, y de la presencia de un retraso o de anomalías en la conducción (por ejemplo, un bloqueo de la rama izquierda). Los métodos tales como los rayos X tienen el inconveniente adicional de que también pueden ser perjudiciales para el paciente debido a la radiación.

Por lo tanto, los métodos tales como los de la presente invención, que permiten el diagnóstico a través de una simple prueba de un biomarcador que puede ser llevada a cabo rápida y fácilmente con una muestra fácilmente obtenible, tal como, por ejemplo, una muestra de sangre o de otro líquido biológico o corporal fácilmente disponible (por ejemplo, una prueba de orina o de saliva), tienen una gran demanda.

Por lo tanto, en la presente invención puede observarse que se ha reconocido que unos niveles aumentados, elevados o generalmente altos de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, son marcadores de la presencia de, o del futuro resultado (pronóstico) de, una enfermedad cardíaca, y en particular de una insuficiencia cardíaca, de una insuficiencia cardíaca isquémica y de enfermedades cardíacas mediadas por el calcio, tales como enfermedades cardíacas asociadas con una señalización o una función desregulada o de otro modo disfuncional del Ca^{2+} . La CgB, la SgII o los fragmentos de las mismas también son biomarcadores que pueden ayudar en la monitorización del tratamiento y en el diagnóstico / la identificación de un eje/ejes fisiopatológicos activados en los pacientes con una enfermedad cardíaca.

La referencia en el presente documento a "CgB" o a "SgII" incluye la referencia a todas las formas de la CgB o de la SgII (según sea apropiado) que podría haber presente en un sujeto, incluyendo los derivados, los mutantes y los análogos de las mismas, en particular los fragmentos de las mismas o las formas modificadas de la CgB, de la SgII o de sus fragmentos. Algunas formas modificadas ejemplares y preferidas incluyen las formas de estas moléculas que han sido sometidas a modificaciones post-traduccionales, tales como una glucosilación o una fosforilación.

Como se ha analizado anteriormente, la CgB y la SgII son pro-péptidos con múltiples sitios de reconocimiento para las endopeptidasas. Por lo tanto, en los métodos de la invención descritos en el presente documento, los fragmentos de la SgII, en particular los fragmentos naturales, pueden ser analizados como una alternativa a la propia SgII (la SgII completa). En los métodos de la invención, estos fragmentos son la secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II. En los métodos también divulgados en el presente documento puede analizarse cualquier fragmento de la CgB o de la SgII, en particular los fragmentos naturales, como una alternativa a la propia CgB o SgII (la CgB o la SgII completa). Algunos ejemplos de dichos fragmentos se describen en la materia, tales como la crombacina y la secretolitina para la CgB y la secretoneurina (SN) para la SgII, que es un pequeño péptido de 33 aminoácidos (Taupenot L et al. New Engl J Med 2003; 348: 1134-1149), aunque es bastante posible que en el futuro se identifiquen otros fragmentos.

Para la SgII, los fragmentos preferidos son aquellos que contienen el epítipo de la SgII correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 de la SgII o 172-186 de la SgII, por ejemplo, la SN. Para la CgB, los fragmentos preferidos son aquellos que contienen el epítipo CgB correspondiente a los residuos 439-451 de la CgB o el extremo C-terminal de la CgB (y en particular el que contiene el epítipo de núcleo NLAAMDLELQKIA). Los epítipos de la SgII 154-165, de la SgII 172-186, de la CgB 439-451 o el extremo C-terminal de la CgB (en particular, el epítipo de núcleo NLAAMDLELQKIA), han sido todos identificados en el presente documento como importantes en el diagnóstico de la enfermedad cardíaca.

A continuación se describen las secuencias de aminoácidos de la CgB y de la SgII sin sus secuencias de señalización, y los restos de aminoácidos de los fragmentos de la CgB y de la SgII, según se describen en el presente documento, pueden ser determinados mediante la referencia a estas secuencias.

CgB

MPVDNRNHNHNEGMVTRCIIEVLSNALSKSSAPPITPECRQVLKTSRKDVKDKE
TTENENTKFEVRLLRDPADASEAHSSSRGEAGAPGEEDIQGPTKADTEKW
AEGGGHSRERADEPQWSLYPSDSQVSEEVKTRHSEKSQREDEEEEEGENYQ
KGERGEDSSEKHLLEPGETQNAFLNERKQASAIKKEELVARSETHAAGHS
QEKTHSREKSSQESGEEAGSQENHPQESKGQPRSQESEESEGEEDATSEVDKR
RTRPRHHHGRSRPDRSSQGGSLPSEEKGHPQEESEESNVSMASLGEKRDHHS
THYRASEEEPEYGEIEKGYPGVQAPEDLEWERYRGRGSEFYRAPRPQSEES
WDEEDKRNYPSELDKMAHGYPGESEEEERGLEPGKGRHHRGRGGEPRAYF
MSDTREEKRFLGEGHHRVQENQMDKARRHPQGAWKELDRNYLNYGEEGA
PGKWQQQGDLDQTKENREEARFQDKQYSSHTAEKRLGELFNPYYDPL
QWKSSHFERRDNMNDNFLEGEENELTLNEKNFFPEYNYDWWEKKPFSED
VNWGYEKRNLARVPKLDLKRQYDRVAQLDQLLHYRKKSAEFPDFYDSEEP
VSTHQEAENEKDRADQTVLTEDEKKELLENLAAMDLELQKIAEKFSQRG

SgII

SFQRNQLLQKEPDLRLLENVQKFPSPMIRALEYIENLRQQAHEESSPDYNP
YQGVSVPLQQKENGDESHLPERDSLSEEDWMRIILEALRQAENEPQSAPKEN
KPYALNSEKNFPMDSDDYETQQWPERKLKHMQFPMPYBENS RDNPFKRT
NEIVEEQYTPQSLATLESVFQELGKLTGPNNQKRERMDEEQKLYTDDDDY
KANNIAYEDVVGGEDWNPVEEKIESQTQEEVRDSKENIEKNEQINDEM KRS
GQLGIQEEDLRKESKDQLSDDVSKVIAYLKRLVNAAGSGRLQNGQNGERAT
RLFEEKPLDSQSIYQLIEISRLQIPPEDLIEMKLTGEKPNGSVEPERELDLPVDL
DDISEADLDHPDLFQNRMLSKSGYPKTPGRAGTEALPDGLSVEDILNLLGME
SAANQKTSYFPNPYNQEKVLPRLPYGAGRSRSNQLPKAAWIPHVENRQMA
YENLNDKDQELGEYLARMLVKYPEIINSNQVKRVPQGSSDDLQEEEQIE
QAIKEHLNQGSSETDKLAPVSKRFPVGPPKNDDTPNRQYWDEDLLMKVLE
YLNQEKAEKGREHIAKRAMENM

- 15 Una referencia en el presente documento a un "líquido corporal" incluye una referencia a todos los líquidos derivados del cuerpo de un sujeto. Algunos ejemplos de líquidos incluyen la sangre (incluyendo todos los componentes derivados de la sangre, por ejemplo, plasma, suero, etc.), la orina, la saliva, las lágrimas, las secreciones bronquiales o el mucus. Preferiblemente, el líquido corporal es un líquido circulatorio (especialmente la sangre un componente de la sangre), la orina o la saliva. Un líquido corporal especialmente preferido es la sangre o un
- 20 componente de la sangre, en particular plasma o suero, especialmente el plasma. Otro líquido corporal especialmente preferido es la saliva.

- El "aumento" en los niveles o el nivel "aumentado" de la CgB o de la SgII según se describe en el presente documento incluye cualquier aumento o elevación medible del marcador en cuestión, cuando el marcador en
- 25 cuestión se compara con un nivel de control. Dicho nivel de control puede corresponderse con el nivel del marcador equivalente en unos sujetos o en unas muestras de control apropiadas, por ejemplo, puede corresponderse con un nivel de corte o con el intervalo encontrado en una población de control o de referencia. Alternativamente, dicho nivel de control puede corresponderse con el nivel del marcador en cuestión en el mismo sujeto individual, o en una muestra de dicho sujeto, medido en un punto temporal anterior (por ejemplo, la comparación con un nivel "en la
- 30 situación inicial" en ese sujeto). Este tipo de nivel de control (es decir, el nivel de control de un sujeto individual) es particularmente útil para las realizaciones de la invención en las que se están realizando mediciones sucesivas o

periódicas de la CgB o de la SgII en individuos tanto sanos como enfermos, buscando cambios en los niveles de la CgB o de la SgII. A este respecto, un nivel de control apropiado será el propio valor de la situación inicial, estable, nulo, previo o seco del individuo (según sea apropiado) por oposición al nivel de control o de corte encontrado en la población general. Los niveles de control también pueden denominarse niveles "normales" o niveles "de referencia".

El nivel de control puede ser una figura o un intervalo individual. Además, como se ha mencionado anteriormente, dicha comparación con un nivel de control, generalmente no implicaría la realización de ensayos activos con sujetos de control como parte de los métodos de la presente invención, sino que generalmente implicaría una comparación con un nivel de control que ha sido determinado previamente a partir de los sujetos de control y que era conocido por la persona que lleva a cabo los métodos de la invención.

Como estará claro a partir de los análisis del presente documento, los métodos de la presente invención pueden implicar mediciones o determinaciones únicas o individuales del nivel de la CgB o de la SgII en un sujeto, o pueden implicar múltiples mediciones o determinaciones durante un periodo de tiempo, por ejemplo, durante la monitorización en curso de la enfermedad cardíaca. Las determinaciones del nivel se llevan a cabo generalmente cuando el paciente está en reposo. Sin embargo, como alternativa, particularmente si la enfermedad cardíaca en cuestión está exacerbada o aumentada por el ejercicio o por otros estreses, por ejemplo, en pacientes con sospecha de TVPC o de insuficiencia cardíaca isquémica, entonces las determinaciones del nivel pueden llevarse a cabo en unas condiciones apropiadas de ejercicio o estrés controlado.

Preferiblemente el aumento en el nivel será significativo, más preferentemente clínica o estadísticamente significativo, lo más preferentemente clínica y estadísticamente significativo.

Los métodos para la determinación de la significación estadística de las diferencias en los niveles de un biomarcador en particular son bien conocidos y están documentados en la materia. Por ejemplo, en el presente documento, un aumento en el nivel de un biomarcador en particular generalmente se contempla como significativo si una comparación estadística mediante el uso de una prueba de significación, tal como la prueba de la t de Student, la prueba de suma de rangos de la U de Mann-Whitney, la prueba de la χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según sea apropiado, muestra un valor de probabilidad de $< 0,05$. En los Ejemplos se proporcionan más detalles de los métodos apropiados de análisis estadístico.

Sin embargo, idealmente cualquier prueba también debe ser de valor clínico. Para probar la capacidad de discriminación del biomarcador para distinguir entre los sujetos sanos y los enfermos, la prueba de elección se considera que es el área bajo la curva de la curva característica de eficacia diagnóstica (ROC-AUC). Con el ROC-AUC se obtiene una medida de la sensibilidad y de la especificidad de un biomarcador a lo largo de la totalidad del espectro de los valores de corte, y las pruebas con unas elevadas ROC-AUC (por ejemplo, una ROC-AUC de 0,7 o por encima, tales como las descritas en el presente documento) se consideran posiblemente clínicamente importantes. La ROC-AUC puede usarse tanto para la evaluación diagnóstica como para el mérito pronóstico de una prueba. Además, para la evaluación del mérito pronóstico puede usarse tanto un análisis de regresión logística como un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox.

En términos simples, para un ensayo diagnóstico, un valor de la ROC-AUC de 0,7 para la CgB indica que cuando se compara un paciente con una enfermedad cardíaca en un estado óptimo y estable con un paciente de control, existe una probabilidad del 70 % de que el nivel de la CgB sea mayor en el paciente con la enfermedad cardíaca con respecto al control. Para la SgII, se ha demostrado que el valor del ROC-AUC es de 0,84, lo que significa que la probabilidad correspondiente es del 84 %. Por lo tanto, estos dos marcadores muestran una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la enfermedad cardíaca.

La "disminución" en los niveles o un nivel "disminuido" o un nivel "menor" o una "reducción" en el nivel de la CgB o de la SgII según se describe en el presente documento incluye cualquier disminución o reducción medible del marcador en cuestión cuando el marcador en cuestión se compara con un nivel de control. Dicho nivel de control puede corresponderse con el nivel del marcador equivalente en unos sujetos o en unas muestras de control apropiadas. Alternativamente y preferentemente, dicho nivel de control puede corresponderse con un nivel del marcador en cuestión en el mismo sujeto individual, o en una muestra de dicho sujeto, medido en un punto temporal anterior (por ejemplo, la comparación con un nivel "en la situación inicial" en ese sujeto). Este tipo de nivel de control (es decir, el nivel de control de un sujeto individual) es particularmente útil para las realizaciones de la invención en las que se están realizando mediciones sucesivas o periódicas de la CgB o de la SgII en individuos tanto sanos como enfermos, buscando cambios en los niveles de la CgB o de la SgII. A este respecto, un nivel de control apropiado será el propio valor en la situación inicial, estable, nulo, previo o seco del individuo (según sea apropiado) por oposición al nivel de control encontrado en la población general. El nivel de control puede ser una figura o un intervalo individual. Además, como se ha mencionado anteriormente, dicha comparación con un nivel de control, generalmente no implicaría la realización de ensayos activos con sujetos de control como parte de los métodos de la presente invención, sino que generalmente implicaría una comparación con un nivel de control que ha sido determinado previamente a partir de los sujetos y que era conocido por la persona que lleva a cabo los métodos de la invención.

Preferiblemente la disminución en el nivel será significativa, más preferentemente clínica o estadísticamente significativa, lo más preferentemente clínica y estadísticamente significativa.

Los métodos para la determinación de la significación estadística de las diferencias en los niveles de un biomarcador en particular son bien conocidos y están documentados en la materia. Por ejemplo, en el presente documento, una disminución en el nivel de un biomarcador en particular generalmente se contempla como significativa si una comparación estadística mediante el uso de una prueba de significación, tal como la prueba de la t de Student, la prueba de suma de rangos de la U de Mann-Whitney, la prueba de la χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según sea apropiado, muestra un valor de probabilidad de $< 0,05$. En los Ejemplos se proporcionan más detalles de los métodos apropiados de análisis estadístico.

Los sujetos o las muestras de control apropiadas para su uso en los métodos de la invención serán fácilmente identificados por una persona experta en la materia. Dichos sujetos también podrían denominarse sujetos "normales" o población de referencia. Algunos ejemplos de sujetos de control apropiados incluirían sujetos sanos (por ejemplo, individuos que no tienen antecedentes de ninguna forma de enfermedad cardíaca (o ningún antecedente de la enfermedad cardíaca en particular que se está ensayando) ni ninguna otra enfermedad simultánea, o sujetos que no padecen, y que preferentemente no tienen antecedentes de haber padecido, ninguna forma de enfermedad cardíaca, en particular individuos que no padecen, y que preferentemente no tienen antecedentes de haber padecido, la enfermedad cardíaca que se está ensayando. Preferiblemente los sujetos de control no son usuarios habituales de ninguna medicación. Los sujetos de control preferidos tienen un ECG normal según la evaluación de un cardiólogo.

También debería apreciarse que, aunque se prefiere la medición de los niveles circulatorios de estos biomarcadores por razones de precisión, facilidad y velocidad de ensayo, y de relevancia fisiológica, también es posible diagnosticar y pronosticar una enfermedad cardíaca mediante la determinación de los niveles de estos biomarcadores en otras muestras, tales como tejido cardíaco, por ejemplo, el miocardio, o en otros líquidos corporales tales como los descritos en cualquier parte del presente documento, por ejemplo, en la saliva. En el presente documento también se divulgan métodos para el diagnóstico de una enfermedad cardíaca, para la determinación de la gravedad de una enfermedad cardíaca o para el pronóstico de una enfermedad cardíaca en un sujeto, según se describe en el presente documento, comprendiendo dichos métodos determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en dicho sujeto.

El nivel de la CgB o de la SgII en circulación en un sujeto puede ser determinado mediante el análisis de cualquier muestra circulatoria apropiada del sujeto, por ejemplo, de sangre (por ejemplo, de suero o de plasma) o potencialmente de otro líquido corporal fácilmente accesible (por ejemplo, de orina, de saliva). Los niveles son generalmente menores en la saliva y en la orina que los correspondientes niveles en circulación, pero estos niveles también pueden ser determinados. Una muestra preferida para analizar es plasma o saliva.

Los niveles de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en una muestra, por ejemplo, en una muestra de un líquido corporal, por ejemplo, en una muestra de sangre, de suero, de plasma, de orina o de saliva, o en muestras tisulares, pueden medirse mediante cualquier ensayo apropiado, muchos de los cuales son bien conocidos y están documentados en la materia, y algunos de los cuales están disponibles en el mercado. El nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en una muestra, por ejemplo, en una muestra circulatoria, en una muestra de otro líquido corporal o en una muestra tisular, puede medirse a nivel génico mediante la medición de los niveles de los ácidos nucleicos (por ejemplo, del ADN o del ARN) que codifican para la CgB o para la SgII, por ejemplo, mediante una RT-PCR o una qRT-PCR, a nivel de las proteínas, por ejemplo, mediante un inmunoensayo tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un inmunoensayo de fluorescencia, una inmunoprecipitación y una inmunotransferencia o un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), siendo normalmente el método de elección el RIA y/o el ELISA.

Los ensayos preferidos son aquellos que pueden llevarse a cabo en el punto de tratamiento del paciente o a pie de cama. Los ensayos preferidos son ensayos basados en un ELISA, aunque también pueden usarse muy eficazmente ensayos basados en un RIA, tales como los descritos por Stridsberg et al., 2005 (Reg Peptides; 125: 193-199) y 2008 (Reg Peptides; 148: 95-98). Los métodos basados en ambos ensayos ELISA y RIA pueden llevarse a cabo mediante métodos que son habituales en la materia y serían bien conocidos por una persona experta. Dichos métodos implican generalmente el uso de un anticuerpo contra la CgB, la SgII o fragmentos de las mismas, que se incuban con la muestra para permitir la detección de la CgB o de la SgII (o de fragmentos de las mismas) en la muestra. Puede usarse cualquier anticuerpo apropiado, y algunos ejemplos de éstos se describen en cualquier parte del presente documento y en la técnica anterior. Por ejemplo, los anticuerpos apropiados contra la CgB o la SgII, o los anticuerpos que reconocen epítomos en particular de la CgB o de la SgII, puede ser preparados mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante la inmunización de animales de experimentación según se describe en Stridsberg et al., 2005, *supra*, y en Stridsberg et al., 2008, *supra*). Generalmente pueden usarse los mismos anticuerpos contra la CgB, la SgII o fragmentos de las mismas, para la detección de la CgB o de la SgII tanto en un ensayo basado en un RIA como en un ensayo basado en un ELISA, realizando las modificaciones apropiadas en los anticuerpos en términos de marcaje, etc., por ejemplo, en un ensayo de ELISA, los anticuerpos generalmente estarían unidos a una enzima para permitir la detección. Puede usarse cualquier forma apropiada del ensayo, por

ejemplo, el ensayo puede ser un ensayo de tipo sándwich o un ensayo competitivo.

En términos simples, en un ELISA se fija una cantidad desconocida de antígeno a una superficie y después se vierte un anticuerpo específico en la superficie de forma que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo está unido a una enzima, en la etapa final se añade una sustancia que la enzima puede convertir en alguna señal detectable. Por lo tanto, en el caso del ELISA de fluorescencia, cuando la muestra se ilumina con una luz con una longitud de onda apropiada, cualquier complejo de antígeno/anticuerpo fluorescerá, de forma que la cantidad de antígeno de la muestra puede ser determinada a través de la magnitud de la fluorescencia. Para el RIA, se hace radioactiva una cantidad conocida de un antígeno, frecuentemente marcando con isótopos de yodo gamma radioactivos unidos a tirosina. Este antígeno radiomarcado se mezcla después con una cantidad conocida del anticuerpo para ese antígeno, y como resultado los dos se unen químicamente entre sí. Después se añade una muestra de un paciente que contiene una cantidad desconocida de ese mismo antígeno. Esto provoca que el antígeno sin marcar (o "frío") de la muestra compita con el antígeno radiomarcado por los sitios de unión del anticuerpo. Dado que la concentración del antígeno "frío" ha aumentado, se une más al anticuerpo, desplazando a la variante radiomarcada, y reduciendo la proporción entre el antígeno radiomarcado unido al anticuerpo y el antígeno radiomarcado libre. Después se separan los antígenos unidos de los no unidos, y se mide la radioactividad del antígeno libre que queda en el sobrenadante. Después puede representarse gráficamente una curva de unión, y se puede determinar la cantidad exacta de antígeno en el suero del paciente. Las mediciones también se llevan a cabo habitualmente con muestras patrones con unas concentraciones conocidas del marcador (antígeno) para comparar.

Un ensayo preferido para la CgB o para la SgII que se está empleando actualmente es un radioinmunoensayo mediante el uso de anticuerpos para medir el epítipo de la SgII 154-165 o de la CgB 439-451 (por ejemplo, según se describe en Stridsberg M et al., 2008, *supra*, y en Stridsberg M et al., 2005, *supra*). Este método de RIA mide todos los fragmentos (cortos o largos) que tengan los epítipos mencionados anteriormente. Dichos ensayos miden por tanto la CgB o la SgII y cualquier fragmento que incluya a los epítipos pertinentes. Por lo tanto, los resultados presentados en el presente documento también identifican los fragmentos de la SgII 154-165 y CgB 439-451 como importantes fragmentos/epítipos en la enfermedad cardíaca. Sin embargo, esto no excluye en modo alguno un papel de otros fragmentos de la CgB o de la SgII en la enfermedad cardíaca. Por el contrario, nuestros datos del modelo experimental de insuficiencia cardíaca demuestran un aumento en la expresión génica miocárdica de la CgB y de la SgII (medido mediante ensayos de expresión génica TaqMan prefabricados disponibles comercialmente en Applied Biosystems, para más detalles véase la sección de Ejemplos), y un aumento en los niveles de las proteínas miocárdicas CgB y SgII, medido con diferentes métodos y epítipos (por ejemplo, los epítipos SgII172-186 o los epítipos del extremo C-terminal de la CgB, (en particular, el epítipo de núcleo NLAAMDLELQKIA)), lo que apoya la hipótesis de que ambas CgB y SgII completas, junto con muchos, y posiblemente todos, los fragmentos de la CgB y de la SgII, pueden ser importantes en la enfermedad cardíaca.

Para los ensayos que implican el uso de anticuerpos contra la CgB o la SgII, los anticuerpos apropiados están disponibles en el mercado para una inmunotransferencia y una inmunohistoquímica (por ejemplo, sc-14889 de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos, o el anticuerpo secretoneurina de Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, Estados Unidos). El uso de la inmunotransferencia es, sin embargo, menos preferido para la medición de los niveles de la CgB y de la SgII, ya que es mucho menos práctico en la gestión del paciente debido a que es semicuantitativo, con una duración demasiado larga (de aproximadamente 36 horas) y requiere un conocimiento técnico experto del método. La inmunohistoquímica es un método únicamente para su uso con tejidos sólidos, y por lo tanto este método no es apropiado para realizaciones en las que se miden los niveles en líquidos corporales.

Si la muestra que se va a analizar es plasma (o cualquier otro componente de la sangre), entonces antes del ensayo puede separarse el plasma (o el otro componente de la sangre) de una muestra sanguínea mediante métodos bien conocidos y documentados en la materia.

Como también se ha descrito anteriormente, si se van a analizar muestras tisulares en lugar de muestras de líquidos corporales, entonces, de nuevo, los niveles de la CgB o de la SgII puede ser analizados fácilmente a nivel génico o a nivel proteico, por ejemplo, mediante la preparación de las muestras apropiadas a partir del tejido cardíaco apropiado, por ejemplo, miocardio, mediante métodos bien conocidos y descritos en la materia. Además, por ejemplo, podría llevarse a cabo una inmunohistoquímica con los anticuerpos apropiados, según se ha establecido anteriormente, sobre secciones tisulares.

Aunque los métodos diagnósticos de la invención generalmente se llevan a cabo *in vitro*, en otras realizaciones de la invención también podrían usarse usos *in vivo*. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una entidad que tiene la capacidad de unirse a la secretogranina II o a fragmentos de la misma, para su uso en el diagnóstico *in vivo* de una enfermedad cardíaca en un sujeto que tiene una enfermedad cardíaca o que potencialmente tiene una enfermedad cardíaca, que comprende la administración de una cantidad apropiada de una entidad que tiene la capacidad de unirse a la secretogranina II o a fragmentos de la misma, al sujeto, y la detección mediante imágenes de la presencia y/o de la cantidad y/o de la ubicación de dicha entidad en el sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II. En el

presente documento también se divulgan métodos para la obtención de imágenes de un sujeto que comprenden la administración de una cantidad apropiada de una entidad de unión (por ejemplo, un anticuerpo u otra proteína de unión) que puede dirigirse a la CgB o la SgII, o a fragmentos de las mismas, del sujeto y detectar la presencia y/o la cantidad y/o la ubicación de la entidad de unión en el sujeto. Dichos métodos pueden usarse por lo tanto en la obtención de imágenes de sujetos que tienen una enfermedad cardíaca o que potencialmente tienen una enfermedad cardíaca. Dichos métodos o usos diagnósticos *in vivo* también pueden usarse para monitorizar el progreso de la enfermedad cardíaca o para monitorizar la terapia de la enfermedad cardíaca.

Para dichos métodos de obtención de imágenes o de usos diagnósticos *in vivo*, puede usarse cualquier entidad de unión apropiada, por ejemplo, cualquier entidad que tenga la capacidad de unirse a la CgB o a la SgII, o a fragmentos de las mismas, *in vivo*. Las entidades de unión preferidas son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos contra la CgB o la SgII están descritos en la materia, y algunos están descritos específicamente en el presente documento. Puede usarse cualquiera de estos. Alternativamente, como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos apropiados pueden ser generados fácilmente por el hombre experto mediante el uso de métodos bien conocidos y documentados en la materia. Los anticuerpos o las entidades de unión preferidas son aquellas que se unen a los epítomos SgII 154-165, SgII 172-186, CgB 439-451 o al extremo C-terminal de la CgB (en particular, el epítipo de núcleo NLAAMDLELQKIA), que han sido todos identificados en el presente documento como importantes en el diagnóstico de una enfermedad cardíaca.

En dichos métodos o usos diagnósticos *in vivo*, la entidad de unión, preferentemente el anticuerpo, puede estar marcada con cualquier marcador que sea detectable *in vivo* (un marcador detectable *in vivo* o un agente/modalidad de imagen), preferentemente mediante el uso de métodos no invasivos.

En la materia se conocen muchos marcadores detectables o agentes/modalidades de imagen *in vivo* apropiados, ya que son métodos para su unión a entidades de unión y anticuerpos. Dichos marcadores detectables permiten analizar la presencia, la cantidad o la ubicación de los complejos de la entidad de unión-objetivo (en este caso, de la entidad de unión-CgB o de la entidad de unión-SgII) en el sujeto.

Algunos ejemplos específicos de agentes/modalidades de imagen que podrían usarse son isótopos radioactivos o radiopacos tales como ³hidrógeno, ¹⁴carbono, ³²fósforo, ³⁵azufre, ¹²³yodo, ¹²⁵yodo, ¹³¹yodo, ⁵¹cromo, ³⁶cloro, ⁵⁷cobalto, ⁵⁸cobalto, ⁶⁷cobre, ¹⁵²Eu, ⁶⁷galio, ¹¹¹indio, ⁵⁹hierro, ¹⁸⁶renio, ¹⁸⁸renio, ⁷⁵selenio, ^{99m}tecnecio e ⁹⁰itrio; iones metálicos (por ejemplo, iones paramagnéticos tales como cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III) u otros iones metálicos tales como lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III)); compuestos fluorescentes (fluoróforos), tales como fluoresceína, rodamina o luciferina.

En el presente documento también se divulga el uso de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, como objetivos moleculares en tejidos para las modalidades de imagen cuando se investiga la enfermedad cardíaca en un individuo. Se espera que el uso de proteínas reguladas por aumento como marcadores específicos en procesos patológicos aumente durante la próxima década, y mejore la utilidad clínica de todas las modalidades de obtención de imágenes en la enfermedad cardíaca, por ejemplo, RMN, escáner de TC, SPECT, ecocardiografía tisular, por nombrar unos pocos. Como hemos averiguado que tanto la CgB y como la SgII están claramente reguladas por aumento a nivel de proteína en el miocardio durante la enfermedad cardíaca, las modalidades de imagen acopladas a marcadores o a entidades de unión para la CgB o la SgII, o fragmentos de las mismas, en el miocardio, pueden mejorar la precisión del diagnóstico y del pronóstico en individuos con una enfermedad cardíaca (por ejemplo, en una enfermedad cardíaca tanto subclínica como evidente) en comparación con la obtención convencional de imágenes. Este método también puede usarse para la identificación de un eje fisiopatológico activado y para la monitorización de la terapia en individuos con una enfermedad cardíaca (por ejemplo, en una enfermedad cardíaca tanto subclínica como evidente) según se describe con más detalle en cualquier parte del presente documento. De nuevo, según se describe con más detalle en cualquier parte del presente documento, más específicamente, hemos identificado los epítomos de la SgII 154-165, de la SgII 172-186, de la CgB 439-451 y el extremo C-terminal de la CgB (en particular, el epítipo de núcleo NLAAMDLELQKIA), como importantes objetivos moleculares del miocardio para las modalidades de imagen en la evaluación de la enfermedad cardíaca en general, y especialmente de la insuficiencia cardíaca.

Los métodos de la invención, según se describe en el presente documento, pueden llevarse a cabo en cualquier tipo de sujeto que sea susceptible de padecer una enfermedad cardíaca. Los métodos se llevan a cabo generalmente en mamíferos, por ejemplo, en seres humanos, en primates (por ejemplo, en monos), en animales de laboratorio (por ejemplo, en ratones, ratas, conejos, cobayas), en mamíferos de ganado (por ejemplo, en caballos, reses, ovejas, cerdos) o en animales domésticos (por ejemplo, en gatos, perros).

En las realizaciones preferidas los mamíferos son seres humanos. Sin embargo, en otras realizaciones, la CgB o la SgII pueden usarse como marcadores de una enfermedad cardíaca en cualquier modelo animal apropiado. Por lo tanto, en dichas realizaciones, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en cualquier modelo animal de experimentación apropiado usado para la investigación de la enfermedad cardíaca o de cualquier aspecto de la fisiología cardíaca. Dichos métodos pueden usarse para el ensayo y la identificación (el cribado) de potenciales

nuevos agentes terapéuticos (farmacológicos y no farmacológicos) para la enfermedad cardíaca, por ejemplo, puede administrarse una sustancia de prueba al modelo animal y analizarse el efecto sobre los niveles de la CgB o de la SgII.

5 En el presente documento también se divulga un método para el ensayo del potencial terapéutico de una sustancia para el tratamiento de una enfermedad cardíaca, que comprende la administración de la sustancia de prueba a un animal de experimentación que padece una enfermedad cardíaca y la determinación del nivel de la CgB o de la SgII, o de fragmentos de las mismas, en dicho animal.

10 En dichos métodos, y en los métodos de ensayo del potencial terapéutico de una sustancia para el tratamiento de una enfermedad cardíaca de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, una disminución o una reducción en los niveles de la CgB o de la SgII serían indicativas de un posible efecto terapéutico o potencial terapéutico.

15 Una vez que se ha identificado una sustancia con un potencial terapéutico apropiado, dicha sustancia es un candidato para su uso en terapia. En el presente documento también se divulgan métodos en los que las sustancias identificadas son elaboradas y opcionalmente formuladas con al menos un portador o un excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente documento también se divulgan métodos en los que las sustancias identificadas, elaboradas o formuladas, se usan en el tratamiento de una enfermedad cardíaca.

20 Los métodos de la invención también pueden usarse junto con modelos animales para ensayar o investigar los mecanismos moleculares subyacentes en la enfermedad cardíaca, y para investigar los aspectos de la señalización cardíaca implicada en la enfermedad cardíaca.

25 Los modelos animales apropiados para su uso en estos aspectos serían bien conocidos por una persona experta en la materia e incluirían cualquier modelo animal que pueda usarse para el estudio de una enfermedad cardíaca, en particular de una insuficiencia cardíaca. Algunos modelos relevantes en todas las especies incluirían: infarto de miocardio, isquemia-reperfusión, cerclaje aórtico (de la aorta ascendente y descendente, y de la aorta abdominal), cerclaje pulmonar, cerclaje renal con hipertensión secundaria, defectos en el septo (auricular y ventricular), animales modificados genéticamente, animales espontáneamente hipertensos y miocarditis (Christensen G et al., Am J Physiol. 1997; 272: H2513-H2524).

Algunos tipos preferidos de enfermedad cardíaca para estos métodos de ensayo y de investigación son según se han descrito en cualquier parte del presente documento.

35 En lugar de un ensayo con modelos animales *in vivo*, dichos ensayos también podrían llevarse a cabo *in vitro* mediante el uso de los apropiados modelos de células o de tejido cardíaco, por ejemplo, modelos que comprenden cardiomiocitos, por ejemplo, cardiomiocitos aislados, por ejemplo, cardiomiocitos neonatales según se describe en los Ejemplos.

40 La invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes, mediante referencia a los siguientes dibujos, en los que:

45 La Figura 1 muestra la expresión génica de la cromogranina B en el miocardio una semana después de un IM. La expresión del gen de la CgB estaba claramente regulada por aumento en los animales con insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con los animales de referencia (regulada por aumento 5,2 veces, $p < 0,001$). La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

50 La Figura 2 muestra las correlaciones entre la expresión génica miocárdica de la cromogranina B y el peso de los pulmones de los animales (Figura 2A) y la masa del ventrículo izquierdo (Figura 2B). La expresión del gen de la CgB estaba estrechamente correlacionada con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales (Figura 2A; $r = 0,77$, $p < 0,001$), y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo (Figura 2B; $r = 0,66$, $p = 0,006$). La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente al grupo de referencia.

55 La Figura 3 muestra los niveles proteicos de la cromogranina B en el miocardio una semana después de un IM (inmunotransferencia). Los niveles de la CgB en la parte no infartada del ventrículo izquierdo estaban aumentados en un 110 % en los animales con una insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con los animales de referencia ($p = 0,005$). Los niveles de la CgB se midieron mediante una quimioluminiscencia y se presentan como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

60 La Figura 4 muestra los niveles proteicos de la cromogranina B en el miocardio una semana después de un IM (radioinmunoensayo de un homogeneizado tisular). Los niveles de la CgB en la parte no infartada del ventrículo izquierdo estaban claramente aumentados, también medidos mediante este método, es decir, un radioinmunoensayo de homogeneizados tisulares, además del método de inmunotransferencia según se muestra en la Figura 3 ($0,86 \pm 0,03$ frente a $1,18 \pm 0,03$ fmol/mg de proteína; un aumento del 37 %; $p < 0,001$; presentado como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM).

65 La Figura 5 muestra las correlaciones entre los niveles proteicos de la cromogranina B en el miocardio y el peso de los pulmones de los animales (Figura 5A) y la masa del ventrículo izquierdo (Figura 5B). Los niveles proteicos de la CgB en la parte no infartada del ventrículo izquierdo estaban estrechamente correlacionados con la

gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales (Figura 5A; $r = 0,76$, $p < 0,001$), y el remodelado del ventrículo izquierdo evaluado por la masa del ventrículo izquierdo (Figura 5B; $r = 0,69$, $p = 0,001$). Los niveles de la CgB se midieron mediante un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular.

La Figura 6 muestra los niveles proteicos de la cromogranina B en el miocardio una semana después de un IM (inmunotransferencia). Los niveles de la CgB en la parte infartada del ventrículo izquierdo en la insuficiencia cardíaca (ICC) estaban aumentados en un 70 % en comparación con el miocardio normal ($p = 0,009$). Los niveles de la CgB se midieron mediante una quimioluminiscencia y se presentan como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

La Figura 7 muestra la producción de cromogranina B en el miocardio medida mediante una inmunohistoquímica. Las microfotografías representativas de las secciones de tejido miocárdico de un ratón con insuficiencia cardíaca (ICC) muestran la detección de inmunorreactividad en los cardiomiocitos no isquémicos que rodean a la zona isquémica (zona limítrofe, inferior izquierda). También se encontró una inmunotinción similar en un miocardio remoto no isquémico (superior izquierda). En la región isquémica (superior derecha), sólo se detectó una débil inmunotinción de la CgB. La imagen inferior derecha muestra una tinción muy débil después del uso de suero de conejo no inmune como control (ctr). Aumento: X200.

La Figura 8 muestra la expresión génica de la cromogranina B en cardiomiocitos aislados después de una estimulación con importantes proteínas de señalización de la enfermedad cardiovascular. La expresión del gen de la CgB (Figura 8A) estaba muy claramente regulada por aumento después de la estimulación con noradrenalina (NA) (3 x regulada por aumento), pero también estaba significativamente regulada por aumento después de la estimulación con angiotensina II (ATII), con factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y con la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). Se muestra la expresión del gen del BNP para comparar. La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente a las células estimuladas con PBS $\pm$ EEM, se añadió forskolina como control positivo. Otras abreviaturas son: factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β). N = 3 para todos los experimentos, excepto N = 6 para el TNF- α y para la IL-1 β .

La Figura 9 muestra los niveles en circulación de cromogranina B en una insuficiencia cardíaca experimental. Los niveles de la CgB estaban aumentados en los animales con una insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con los animales de referencia ($1,44 \pm 0,12$ nmol/l frente a $1,02 \pm 0,07$ nmol/l, $p = 0,003$). La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 10 muestra los niveles en circulación de cromogranina B en una insuficiencia cardíaca humana. La Figura 10A muestra que los niveles de la CgB estaban claramente aumentados en los pacientes con una insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con los sujetos de control ($1,69 \pm 0,03$ frente a $1,52 \pm 0,05$ nmol/l, $p = 0,007$). La Figura 10B muestra que los niveles de la CgB están regulados según la gravedad de la insuficiencia cardíaca; grupo de control: $1,52 \pm 0,05$, clase II de la NYHA: $1,64 \pm 0,03$, clase III de la NYHA: $1,78 \pm 0,08$, clase IV de la NYHA: $1,81 \pm 0,09$ nmol/l; prueba de tendencia: $p = 0,001$. La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 11 muestra los niveles de la cromogranina B en pacientes con una insuficiencia cardíaca estable y descompensada. No había ninguna diferencia significativa en los niveles en circulación de la CgB entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada ($1,68 \pm 0,03$ frente a $1,76 \pm 0,08$ nmol/l; $p = 0,27$). Los pacientes en estado descompensado tenían una ICC más grave en comparación con el grupo compensado (NYHA II / III / IV: 0 (0 %) / 3 (30 %) / 7 (70 %) frente a 54 (77 %) / 15 (21 %) / 1 (1 %), respectivamente; $p < 0,001$). La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 12 muestra el efecto de los inhibidores de la bomba de protones sobre los niveles en circulación de la cromogranina B y de la cromogranina A en pacientes con una insuficiencia cardíaca. La Figura 12A muestra que los niveles de la CgB en los pacientes con una insuficiencia cardíaca no se veían afectados por el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP); usuarios de IBP: $1,68 \pm 0,07$ frente a no usuarios de IBP: $1,69 \pm 0,03$ nmol/l, $p = 0,98$. No había ninguna diferencia en la gravedad de la insuficiencia cardíaca (ICC) entre los usuarios y los no usuarios de IBP (NYHA II / III / IV: 6 (55 %) / 4 (36 %) / 1 (9 %) frente a 48 (70 %) / 14 (20 %) / 7 (10 %), respectivamente; $p = 0,40$). La Figura 12B muestra que, por el contrario, los niveles de la CgA estaban claramente aumentados en los usuarios de IBP en comparación con los pacientes con una insuficiencia cardíaca que no tomaban IBP; usuarios de IBP: $15,89 \pm 4,18$ frente a no usuarios de IBP: $6,09 \pm 0,37$, $p = 0,007$. La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 13 muestra la cromogranina B como un biomarcador diagnóstico en la insuficiencia cardíaca. Los niveles en circulación de la CgB mostraron una excelente capacidad para discriminar entre los individuos con una insuficiencia cardíaca y los sujetos de control sanos (AUC = 0,70, $p = 0,001$).

La Figura 14 muestra la cromogranina B como un biomarcador diagnóstico en la insuficiencia cardíaca. La precisión era claramente mejor para los niveles en circulación de la CgB que para los niveles de la CgA para el diagnóstico de una insuficiencia cardíaca (AUC: CgB = 0,70 frente a CgA = 0,61).

La Figura 15 muestra la expresión génica de la secretogranina II y del péptido natriurético de tipo B en el miocardio una semana después de un IM. La expresión génica de la SgII estaba muy regulada por aumento en los animales con insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con los animales de referencia (regulación por aumento de 11,5 veces, $p < 0,001$), que estaba más regulada por aumento que la correspondiente expresión génica del BNP en el miocardio (regulación por aumento de 5,8 veces, $p < 0,001$). La expresión génica se midió

mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

La Figura 16 muestra la correlación entre la expresión génica de la secretogranina II, el peso de los pulmones de los animales y la masa del ventrículo izquierdo. La expresión génica de la SgII estaba estrechamente correlacionada con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales (Figura 16A; $r = 0,76$, $p < 0,001$), y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo (Figura 16B; $r = 0,66$, $p = 0,006$). La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente al grupo de referencia.

La Figura 17 muestra las correlaciones entre la expresión génica de la secretogranina II y de la cromogranina B y del péptido natriurético de tipo B. La expresión génica de la SgII está estrechamente correlacionada con la expresión génica tanto del BNP (Figura 17A; $r = 0,80$, $p < 0,001$) como con la de la CgB (Figura 17B; $r = 0,79$, $p < 0,001$). La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente al grupo de referencia.

La Figura 18 muestra los niveles proteicos de la secretogranina II en el miocardio una semana después de un IM. Los niveles de la SgII en la parte no infartada del ventrículo izquierdo estaban aumentados en un 35 % en los animales con una insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con los animales de referencia ($0,63 \pm 0,04$ frente a $0,47 \pm 0,03$ fmol/mg de proteína, $p = 0,006$). Los niveles de la SgII se midieron con un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular y se presentan como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

La Figura 19 muestra las correlaciones entre los niveles proteicos de la secretogranina II en el miocardio y el peso de los pulmones de los animales (Figura 19A) y la masa del ventrículo izquierdo (Figura 19B). Los niveles proteicos de la SgII en la parte no infartada del ventrículo izquierdo estaban estrechamente correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales (Figura 19A; $r = 0,55$, $p = 0,018$), y el remodelado del ventrículo izquierdo evaluado por la masa del ventrículo izquierdo (Figura 19B; $r = 0,58$, $p = 0,012$). Los niveles de la SgII se midieron con un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular.

La Figura 20 muestra los niveles proteicos de la secretogranina II en el miocardio una semana después de un IM. Los niveles de la SgII también estaban aumentados en la parte infartada del ventrículo izquierdo en comparación con el miocardio normal ($0,67 \pm 0,03$ frente a $0,36 \pm 0,01$ fmol/mg de tejido, $p < 0,001$). Los niveles de la SgII se midieron con un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular y se presentan como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

La Figura 21 muestra las correlaciones entre la secretogranina II en el miocardio y el peso de los pulmones de los animales (Figura 21A) y la masa del ventrículo izquierdo (Figura 21B). Los niveles de la SgII en la parte infartada del ventrículo izquierdo también estaban estrechamente correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales (Figura 21A; $r = 0,71$, $p = 0,001$), y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo (Figura 21B; $r = 0,74$, $p = 0,001$). Los niveles de la SgII se midieron con un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular.

La Figura 22 muestra la producción de secretogranina II en el miocardio medida mediante una inmunohistoquímica. Las microfotografías representativas de las secciones de tejido miocárdico de un ratón con una ICC muestran la detección de inmunorreactividad en los cardiomiocitos no isquémicos que rodean la zona isquémica (zona limítrofe, inferior izquierda).

También se encontró una inmunotinción similar en un miocardio remoto no isquémico (superior izquierda). En la región isquémica (superior derecha), sólo se detectó una débil inmunotinción de la SgII. La imagen inferior derecha muestra una tinción muy débil después del uso de suero de conejo no inmune como control (ctr). Aumento: X200.

La Figura 23 muestra la expresión génica de la secretogranina II en cardiomiocitos aislados después de la estimulación con importantes proteínas de señalización de la enfermedad cardiovascular. La expresión génica de la SgII estaba regulada por aumento después de la estimulación con factor de crecimiento transformante β , con TGF- $\beta 3$ (aumento del 85 %) y con noradrenalina (NA) (aumento del 55 %). La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente a células estimuladas con PBS $\pm$ EEM, se añadió forskolina como control positivo. Otras abreviaturas son: angiotensina II (AT-II), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). N = 3 para todos los experimentos, excepto N = 6 para el TNF- α y para la IL-1 β .

La Figura 24 muestra los niveles en circulación de secretogranina II en una insuficiencia cardíaca humana. La Figura 24A muestra que los niveles de la SgII estaban claramente aumentados en los pacientes con una insuficiencia cardíaca (ICC) en comparación con el grupo de control ($0,17 \pm 0,01$ frente a $0,12 \pm 0,01$ nmol/l, $p < 0,001$). La Figura 24B muestra que los niveles de la SgII están regulados según la gravedad de la insuficiencia cardíaca; grupo de control: $0,12 \pm 0,01$, clase II de la NYHA: $0,17 \pm 0,01$, clase III de la NYHA: $0,19 \pm 0,01$, clase IV de la NYHA: $0,18 \pm 0,02$ nmol/l; prueba de tendencia: $p < 0,001$. La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 25 muestra los niveles de secretogranina II en pacientes con una insuficiencia cardíaca estable y descompensada. No había diferencias significativas en los niveles en circulación de la SgII entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada ($0,17 \pm 0,01$ frente a $0,17 \pm 0,01$ nmol/l; $p = 0,83$). Los pacientes en estado descompensado tenían una ICC más grave en comparación con los pacientes en estado compensado (NYHA II / III / IV: 0 (0 %) / 3 (30 %) / 7 (70 %) frente a 54 (77 %) / 15 (21 %) / 1 (1 %), respectivamente; $p < 0,001$). La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 26 muestra el efecto de los inhibidores de la bomba de protones sobre los niveles en circulación de

secretogranina II en pacientes con una insuficiencia cardíaca. La Figura 26 muestra que los niveles de la SgII en los pacientes con una insuficiencia cardíaca no se veían afectados por el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP); usuarios de IBP: $0,17 \pm 0,01$ frente a no usuarios de IBP: $0,17 \pm 0,01$ nmol/l, $p = 0,76$. No había ninguna diferencia en la gravedad de la insuficiencia cardíaca (ICC) entre los usuarios y los no usuarios de IBP (NYHA II / III / IV: 6 (55 %) / 4 (36 %) / 1 (9 %) frente a 48 (70 %) / 14 (20 %) / 7 (10 %), respectivamente; $p = 0,40$). Por el contrario, los niveles de la CgA estaban claramente aumentados en los usuarios de IBP en comparación con los pacientes con una insuficiencia cardíaca que no consumían IBP (véase la Figura 12B). La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°.

La Figura 27 muestra la secretogranina II como biomarcador diagnóstico en la insuficiencia cardíaca. Los niveles en circulación de la SgII mostraron una excelente capacidad para discriminar entre los individuos con una insuficiencia cardíaca y los sujetos de control sanos (AUC = 0,4, $p = 0,0001$).

La Figura 28 muestra la secretogranina II como biomarcador diagnóstico en la insuficiencia cardíaca. La precisión era claramente mejor para los niveles en circulación de la SgII que para los niveles de la CgA para el diagnóstico de una insuficiencia cardíaca (AUC: SgII = 0,84 frente a CgA = 0,61).

La Figura 29 muestra que los niveles de la SgII y de la CgB están aumentados en los pacientes con TVPC en comparación con los sujetos de control. Las Figuras 29A y 29B muestran los niveles sanguíneos de la SgII y de la CgB medidos antes y después de una prueba de estrés por ejercicio en bicicleta. La Figura 29A muestra que los niveles de la SgII después del ejercicio eran significativamente mayores en los pacientes con TVPC en comparación con los sujetos de control ($0,168 \pm 0,008$ frente a $0,134 \pm 0,008$ nmol/l, $p = 0,015$) ($n = 6$ para ambos grupos).

De forma análoga, los niveles de la CgB eran mayores en los pacientes con TVPC antes de la prueba de ejercicio ($1,39 \pm 0,09$ frente a $0,97 \pm 0,07$ nmol/l, $p = 0,02$). La Figura 29C y la 29D muestran los niveles en saliva de la SgII y de la CgB antes de la prueba de estrés. La Figura 29C muestra que los niveles en saliva de la SgII están aumentados en los pacientes con TVPC ($0,078 \pm 0,020$ frente a $0,024 \pm 0,010$ nmol/l, $p = 0,04$), y la Figura 29D muestra que los niveles en saliva de la CgB también están aumentados en los pacientes con TVPC ($1,12 \pm 0,26$ frente a $0,23 \pm 0,13$ nmol/l, $p = 0,02$). Los niveles de la SgII y de la CgB se midieron mediante un radioinmunoensayo. Los datos de las Figuras 29A y 29B se presentan como la media $\pm$ EEM.

En las Figuras 29A y 29B, las líneas continuas muestran los datos de los pacientes con TVPC, y las líneas discontinuas muestran los datos de los sujetos de control. Para las Figuras 29C y 29D, la línea horizontal en el interior de la caja representa el nivel mediano, los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75° y el intervalo de distribución (valor máximo restringido a 1,5 x el intervalo intercuartil con respecto a la mediana). (Abreviaturas: Ctr- Control) la Figura 30 muestra que los niveles de la SgII y de la CgB son mayores en los pacientes con un diagnóstico de insuficiencia cardíaca isquémica que en los pacientes que no padecen una insuficiencia cardíaca isquémica.

La Figura 30A muestra el nivel en sangre de la SgII es mayor en los pacientes con un diagnóstico de insuficiencia cardíaca isquémica que en los pacientes que no padecen una insuficiencia cardíaca isquémica ($0,156 \pm 0,013$ frente a $0,127 \pm 0,012$ nmol/l). La Figura 30B muestra que los niveles en circulación de la CgB están aumentados en los pacientes con dolor pectoral y una ICI en comparación con los pacientes con dolor pectoral que no tienen una ICI ($1,17 \pm 0,11$ frente a $0,95 \pm 0,01$ nmol/l). La Figura 30C muestra que el nivel en saliva de la SgII es mayor en los pacientes con un diagnóstico de insuficiencia cardíaca isquémica que los pacientes que no padecen una insuficiencia cardíaca isquémica ($0,058 \pm 0,008$ frente a $0,022 \pm 0,004$), mientras que la Figura 30D muestra que también los niveles de la CgB en saliva están aumentados en los pacientes con una ICI y dolor pectoral ($0,664 \pm 0,109$ frente a $0,087 \pm 0,055$ nmol/l). La línea horizontal del interior de la caja representa el nivel mediano y los límites de la caja los niveles de percentil 25° y 75°. Los niveles de la SgII y de la CgB se midieron mediante un radioinmunoensayo.

Ejemplos

Ejemplo 1. La expresión de la CgB está aumentada significativamente en la insuficiencia cardíaca experimental y clínica

A. Materiales y métodos

Modelo de ratón de insuficiencia cardíaca

Para todos los experimentos se usaron ratones C56B1/6 de 6 semanas de edad (Taconic, Skensved, Dinamarca). Todos los procedimientos quirúrgicos fueron llevados a cabo por un investigador (HR) como se ha descrito anteriormente en Iversen et al. (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, enero de 2002; 282 (1): R166-R172). En resumen, los animales fueron traqueotomizados y conectados a un respirador artificial para animales con una mezcla de oxígeno e isoflurano. A través de una toracotomía lateral izquierda se llevó a cabo una pericardiotomía seguida de la ligadura de la arteria coronaria principal izquierda en el grupo con insuficiencia cardíaca. Los animales de referencia operados experimentaron el mismo procedimiento excepto la ligadura de la arteria coronaria. Después de una semana de seguimiento, se llevó a cabo una evaluación ecocardiográfica completa por parte de un investigador experimentado (IS) en todos los animales con ICC y en una proporción representativa de los animales de referencia, mientras que los animales anestesiados respiraban una mezcla gaseosa de oxígeno y de isoflurano.

suministrada a través de una mascarilla facial. Para la inclusión de los animales en el grupo con ICC usamos los criterios que previamente habían sido validados por nuestro grupo por tener una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico no invasivo de la insuficiencia cardíaca, es decir: 1. Un IM mayor que el 40 % de la circunferencia del ventrículo izquierdo, 2. Tamaño de la aurícula izquierda > 0,2 mm, 3. Aumento > 35 % en el peso del pulmón en comparación con el grupo de referencia (por ejemplo, peso del pulmón > 0,2 g).

Después de sacrificar a los animales, se extrajeron los corazones, se secaron y se les seccionó el ventrículo derecho e izquierdo. En los animales con ICC, el ventrículo izquierdo se dividió en la parte infartada y la no infartada. El tejido pulmonar se diseccionó exento de otras estructuras mediastínicas antes de ser pesado. También se recogieron muestras tisulares de hígado, de bazo, de riñón, de estómago, de parte del colon y del músculo tibial anterior. Los tejidos destinados a una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), a una inmunotransferencia o a un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular, fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C hasta su uso, mientras que los corazones recogidos para su análisis inmunohistológico se fijaron durante una noche en formalina al 4 %, se lavaron con etanol al 30 % y se almacenaron en etanol al 70 % a 4 °C antes de su uso. Para evaluar el efecto sobre la expresión génica y los niveles de proteínas de la anestesia de la cirugía *per se*, los animales de referencia se compararon con animales no operados de edades similares en todos los experimentos.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones proporcionadas por el European Council for Laboratory Animal Science y aprobadas por el Local Ethics Committee y por el Norwegian Council for Animal Research.

Pacientes con insuficiencia cardíaca

En la parte clínica del estudio se incluyeron setenta pacientes externos con una insuficiencia cardíaca crónica bien compensada, y 10 pacientes admitidos con una insuficiencia cardíaca descompensada. Consecuentemente, el grupo con ICC comprendía 80 pacientes en total. Todos los pacientes fueron incluidos en un único centro, el Akershus University Hospital, un hospital docente y referente secundario del Oslo metropolitano, Noruega, con un área de captación de aproximadamente 320.000 personas. Los pacientes fueron evaluados y clasificados por un cardiólogo (TO) que tenía acceso a los registros médicos del paciente, pero que desconocía las mediciones del biomarcador.

Los pacientes del grupo con una ICC compensada fueron captados todos consecutivamente en la clínica de pacientes externos con insuficiencia cardíaca del hospital. Todos los pacientes tenían un diagnóstico previo de ICC crónica y se suponían estables en el momento de la captación. Los pacientes admitidos en la unidad de cuidados coronarios durante mayo de 2008 con un diagnóstico principal de ICC descompensada fueron incluidos consecutivamente. Los pacientes se clasificaron según el sistema de clases funcionales de la New York Heart Association (NYHA) por parte de un investigador (HR). En los últimos 18 meses se había obtenido un ecocardiograma transtorácico en todos excepto en 3 pacientes (4 %) que habían sido clínicamente estables durante este periodo. Setenta y tres pacientes (91 %) habían experimentado una angiografía coronaria con fines diagnósticos.

Los pacientes con un IM agudo, o una intervención de cirugía cardíaca o coronaria percutánea durante los últimos 3 meses, no eran elegibles para su participación en el estudio. Consecuentemente, a ninguno de los pacientes con una ICC descompensada se le diagnosticó un IM agudo. Los pacientes con una neoplasia no curable y una esperanza de vida < 1 año también fueron excluidos. Se reclutaron veinte sujetos de control emparejados por edades y género; estos individuos no tenían antecedentes de enfermedad cardiovascular ni de otras enfermedades simultáneas, ningún síntoma de enfermedad cardiovascular según evaluó un investigador (HR), y no eran usuarios habituales de ninguna medicación.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Regional Ethics Committee antes del comienzo del estudio. Todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes del inicio del estudio.

Muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas de seres humanos se extrajeron de una vena antecubital, mientras que las muestras sanguíneas de los animales se recogieron de la vena cava inferior después de una laparotomía de los animales anestesiados que respiraban una combinación de oxígeno e isoflurano. Las muestras sanguíneas se pusieron inmediatamente en hielo, se centrifugaron en los siguientes 30 minutos y posteriormente se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se extrajo ARN total del miocardio de 9 ratones con una ICC y de 8 de referencia operados mediante el uso del SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, WI, EE.UU.) según el protocolo. Se usó tejido (20-35 mg) de la región no infartada del ventrículo izquierdo para la extracción del ARN. La homogeneización se llevó a cabo con el

sistema Mixer Mill MM 300 (RETSCH, Haan, Alemania) después de la adición de 175 µl de tampón de lisis y de microesferas de acero inoxidable de 5 mm (Qiagen, Hilden, Alemania) a las muestras. La concentración de ARN se midió con el sistema NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) y la calidad del ARN fue evaluada con el Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). El ADNc fue producido a partir de 5 µg de ARN con el kit High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.); se usó el ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) para la transcripción inversa. La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR detectada en un 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con ensayos de expresión génica TaqMan prefabricados de Applied Biosystems: la CgB (Mm00483287_ml), el BNP (Mm00435304_g1), la proteína ribosómica L4 (Rpl4) (Mm00834993_g1). La Rpl4 sirvió como control interno. La curva de referencia de la CgB se representó a partir de tejido cerebral de ratón neonatal, mientras que se usó tejido miocárdico para la representación de las curvas de referencia del BNP y del RPL. La expresión génica se presenta como el cambio desde la media en el grupo de referencia (normalizada frente a la referencia). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Electroforesis en gel monodimensional e inmunotransferencia

Las muestras de tejido miocárdico congeladas se homogeneizaron en tampón de lisis frío que contiene sacarosa 210 mM, NaCl 40 mM, Hepes 30 mM, EDTA 5 mM, Tween-20 al 1 % y diferentes inhibidores de proteasa (cóctel completo de inhibidor de proteasa exento de EDTA, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La homogeneización mecánica se llevó a cabo con el sistema Mixer Mill MM 300 eliminando el material insoluble después de una centrifugación a 12.000 G. Los lisados se añadieron a SDS al 1 % como concentración final. El contenido total en proteína se midió con el kit de ensayo de proteínas micro BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) según el método de Bradford (Bradford, 1976). Antes de cargar el gel, los lisados se hirvieron durante 5 minutos después de mezclar 30 µg de proteína con tampón de carga de gel de SDS (50 % de sacarosa, 7,5 % de SDS, Tris-HCl 0,0625 M, a pH 6,8) y EDTA 2 mM (3,1 % de DTT, 0,01 % azul de bromofenol, a pH 7,5). Después de la carga de la proteína, los geles de poliacrilamida (10-12 %) se analizaron aproximadamente durante 75 minutos a 200 V, sin embargo, con una cierta variación ya que la duración de la electroforesis se eligió según la proteína de interés. Se incluyeron marcadores moleculares en todos los geles. Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas Hybond-P de PVDF (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) mediante el uso de un sistema Mini Trans-Blot Cell (Biorad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.), tras lo cual las membranas se incubaron a la temperatura ambiente (TA) con un 5 % de leche desnatada en polvo diluida en salino tamponado con Tris que contiene un 0,1 % de Tween (TBS-t) para evitar la unión no específica del anticuerpo. Después de 2 horas se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en TBS-t a las membranas antes de su almacenamiento durante una noche a 4 grados, al día siguiente se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en TBS-t a las membranas durante 1 hora a la TA. Las membranas se lavaron tres veces durante 5-15 minutos con TBS-t entre y después de todas las etapas de incubación. Se usó una mezcladora de rodillos (444-1607, VWR International, West Chester, PA, EE.UU.) para las incubaciones.

Para todas las inmunotransferencias se usó un anticuerpo policlonal purificado anti-CgB humana de cabra que según el fabricante se une al extremo C-terminal de la CgB (dilución 1:200, Sc-1489, Santa Cruz, CA, EE.UU.). Se identificó que este anticuerpo mostraba una unión fuerte y específica a la secuencia de aminoácidos EKKELENLAAMDLELQKIAEKFSQRG (datos no mostrados), indicando los aminoácidos subrayados el epítipo de núcleo. Los residuos identificados están ubicados en el C-terminal extremo de la CgB y eran coherentes con la fuente de información del fabricante. Para la visualización de las proteínas inmunoteñidas se usó el ECL Plus Western Detection System (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Alemania) y se usó un detector digital ImageReader LAS 3000-mini (Fujifilm, Tokio, Japón), con la densitometría de las bandas inmunoteñidas medida con un MultiGauge (Fujifilm). Se controló una misma carga de proteína sobre los geles mediante el uso de anti-gliceraldehído-3-deshidrogenasa (GAPDH) como control interno (anticuerpo anti-GAPDH, Cell Signaling Technology, Boston, MA, EE.UU.).

En general, los individuos con ICC y los de referencia se cargaron en cada segundo pocillo de los geles de acrilamida para evitar diferencias debidas a dificultades técnicas, el máximo por gel era de 6 individuos por grupo. En los geles se incluyeron extractos proteicos totales de cerebro de ratón neonatal o de una línea celular de feocromocitoma de rata (línea celular PC12, sc-2250, Santa Cruz) como controles positivos. Para el tejido miocárdico con $n > 6$ en los grupos con ICC y de referencia, se compararon las transferencias mediante la normalización de las bandas frente a tres individuos que tenían muestras analizadas en todos los geles. Los niveles de la CgB se presentan como el cambio desde la media en el grupo de referencia (normalizado frente a la referencia). Dado que la CgB tiene una carga fuertemente ácida, la CgB migra más lentamente en el sistema de SDS-PAGE de lo predicho a partir de su peso molecular calculado. Los pesos moleculares de la molécula completa de CgB en el sistema de SDS-PAGE se habían indicado como de 100-120 kDa.

Los anticuerpos secundarios (diluidos a 1:2.500-1:5.000) contra conejo (4030-05) y cabra (6160-05) se adquirieron en Southern Biotech (Birmingham, AL, EE.UU.). Se usó Precision Plus Protein Dual Color Standard (161-0374) como marcador molecular (Biorad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).

Radioinmunoensayo

Los niveles en circulación de la CgB se midieron mediante un radioinmunoensayo propio específico de región que detecta la CgB439-451 según se ha notificado previamente (Stridsberg et al., 2005, Regulatory Peptides: 125, 193-199). El límite de detección era < 2 fmol/tubo. Los niveles en circulación de la CgA se midieron con un radioinmunoensayo comercial que identifica la CgA116-439 (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia). Todas las muestras se ensayaron por duplicado, y la variación total del ensayo era < 7 %.

Los niveles tisulares de la CgB se midieron con el mismo radioinmunoensayo específico de región de la CgB439-451 al usado para la medición de los niveles en circulación de la CgB. Ninguna muestra tenía los niveles de la CgB por debajo del límite de detección. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

Inmunohistoquímica

Se tiñeron secciones miocárdicas de ratón mediante el uso del mismo anticuerpo policlonal purificado anti-CgB humana de cabra (Santa Cruz) al usado para la inmunotransferencia, seguido de IgG anti-cabra biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las inmunorreactividades se amplificaron adicionalmente mediante el uso de complejos de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Se usó diaminobenzidina como cromógeno en un sistema mejorado metálico comercial (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. El tejido cerebral de ratón neonatal y el tejido de tumor carcinoide sirvieron como tejidos de control positivo. La omisión del anticuerpo primario o el uso de suero de conejo no inmune sirvieron como controles negativos.

Aislamiento de los cardiomiocitos neonatales y experimentos de cultivo celular

Se aislaron cardiomiocitos neonatales de ratas a partir de ratas Wistar neonatales (1-3 días) (Taconic, Skensved, Dinamarca) según se ha notificado previamente. Después de un periodo de inanición de 24 horas, los cardiomiocitos fueron estimulados durante 24 horas con los siguientes agentes: forskolina [1 y 10 μ M], noradrenalina [100 μ M], endotelina [77 ng/ml] y angiotensina II [1 μ M] (todos de Sigma, Europe), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [10 ng/ml] (BioSource International Camarillo, CA, EE.UU.), interleucina 1 β (IL-1 β) [10 ng/ml], proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) [200 ng/ml], factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [10 ng/ml] (todos de R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), y un péptido C-terminal de la CgB - el CgB312-323 [1, 10 y 100 ng/ml] (053-20, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, EE.UU.).

Se aisló ARN total a partir de cardiomiocitos de rata neonatal según el protocolo (RNeasy mini kit, Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Junto con tampón de lisis, se usaron el sistema Mixer Mill 300 (RETSCH, Haan, Alemania) y microesferas de acero inoxidable (Qiagen, Hilden, Alemania) para la disrupción mecánica de las células. Las concentraciones y la calidad del ARN fueron evaluadas según se ha descrito anteriormente con el sistema NanoDrop y un Agilent BioAnalyzer 2100. Las reacciones de transcripción inversa se llevaron a cabo con el kit iScript Select cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.). La expresión génica se determinó mediante una qRT-PCR con ensayos de expresión génica TaqMan prefabricados de Applied Biosystems: la CgB (Rn01514853_m1), el BNP (Rn00580641_m1), la Rpl4 (Rn00821091_g1). La expresión génica en las células estimuladas se presenta como el cambio frente a la expresión génica en células estimuladas con PBS (normalizada frente al control). Todas las muestras se analizaron por triplicado y se usó la expresión génica de la Rp14 como control interno.

Análisis estadístico

Los datos continuos se presentan como la media ($\pm$ EEM) y los valores categóricos como recuentos (porcentaje). Las variables continuas y categóricas en los sujetos de control y en los individuos con insuficiencia cardíaca se compararon mediante el uso de la prueba de la t de Student, la prueba de la U de Mann-Whitney, la prueba de la χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según sea apropiado. Las correlaciones y las tendencias entre los biomarcadores y otras variables continuas se calcularon mediante el uso de la correlación de rangos de Spearman. Las asociaciones entre la expresión génica miocárdica de la CgB y del BNP, y el peso de los pulmones de los animales, fueron evaluados mediante un análisis de regresión lineal; el ajuste del modelo se controló comprobando la normalidad de los valores residuales estandarizados. Las precisiones de la CgA y de la CgB en circulación como biomarcadores para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca fueron evaluadas mediante un análisis de las curvas ROC.

Unos valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos para todos los análisis. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con SPSS para Windows versión 14.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.) con la excepción los análisis de la curva ROC, que se llevaron a cabo con MedCalc para Windows, versión 9.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

B. Resultados

Características de los animales

No había ninguna diferencia en el peso corporal entre los animales del grupo con ICC (N = 35) y los del grupo de referencia (N = 29) en la situación inicial (Tabla 1). Una semana después del IM, los animales con ICC tenían un peso de los pulmones dos veces mayor que el de los animales de referencia, y la masa del ventrículo izquierdo y la masa del ventrículo derecho significativamente aumentadas (Tabla 1), lo que confirma que los animales con ICC tenían de hecho una insuficiencia cardíaca con un remodelado del miocardio en curso. Además, los animales con ICC tenían claramente aumentada la producción miocárdica de BNP (Tabla 1).

Expresión génica miocárdica de la CgB en una insuficiencia cardíaca experimental

La expresión génica de la CgB estaba regulada por aumento 5,2 veces en la parte no infartada del ventrículo izquierdo en los animales con ICC en comparación con los animales de referencia ($p < 0,001$, Figura 1). La expresión génica miocárdica de la CgB estaba muy correlacionada con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales ($r = 0,77$, $p < 0,001$, Figura 2A), y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo ($r = 0,66$, $p = 0,006$, Figura 2B).

Según se ha notificado, la expresión génica del BNP también estaba regulada por aumento en el miocardio de los animales con ICC, y se correlaciona estrechamente con la expresión génica de la CgB ($r = 0,65$, $p = 0,005$). La expresión génica del BNP también estaba asociada con el peso del pulmón del animal; sin embargo, la asociación entre la expresión génica del BNP y el peso de los pulmones de los animales era más débil que la asociación observada entre la expresión génica de la CgB y el peso de los pulmones de los animales (Tabla 2). Además, después de un ajuste para la expresión génica de la CgB en un análisis multivariado, la asociación entre la expresión génica del BNP y el peso de los pulmones de los animales estaba atenuada y únicamente tenía una significación límite. Por el contrario, la expresión génica de la CgB se asociaba independientemente con el peso de los pulmones de los animales también en un análisis multivariable (Tabla 2). La combinación de la CgB y del BNP en un modelo multivariable para la predicción del peso de los pulmones de los animales añadía una información limitada en comparación con un modelo únicamente con la expresión génica de la CgB ($r^2 = 0,70$ frente a $0,62$), Tabla 2.

No encontramos ningún cambio en la expresión génica entre los animales de control no operados y los animales del grupo de referencia. La expresión génica de la Rpl4 no estaba modificada en ninguno de los experimentos.

Niveles miocárdicos de la proteína CgB en una insuficiencia cardíaca experimental

Los niveles proteicos de la CgB estaban significativamente aumentados en la parte no infartada del ventrículo izquierdo de los animales con ICC en comparación con el miocardio normal, medidos tanto mediante una inmunotransferencia (Figura 3) como mediante un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular (Figura 4), con un aumento del 110 % ($p = 0,005$) y del 37 % ($p < 0,001$), respectivamente. Los niveles proteicos de la CgB en el miocardio no infartado también estaban muy correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales ($r = 0,76$, $p < 0,001$, Figura 5A), y el remodelado del ventrículo izquierdo evaluado por la masa del ventrículo izquierdo ($r = 0,69$, $p = 0,001$, Figura 5B). Adicionalmente, los niveles de la CgB también estaban aumentados en la parte infartada del ventrículo izquierdo en los animales con ICC en comparación con el miocardio normal (inmunotransferencia; aumento del 70 %, $p = 0,009$, Figura 6). Por el contrario, los niveles de la CgB no estaban aumentados en los animales con ICC frente a los de referencia en muestras de cualquier otro tejido investigado (que incluía el ventrículo derecho, el pulmón, el bazo, el hígado, el riñón, el estómago, el colon y el músculo esquelético), tanto medidos mediante una inmunotransferencia (datos no mostrados) como mediante un radioinmunoensayo en un homogeneizado tisular (datos no mostrados).

En la inmunotransferencia se encontraron fuertes bandas para los controles positivos añadidos a los geles con unos pesos moleculares correspondientes a lo que anteriormente se había notificado como la molécula completa de la CgB en el sistema de SDS-PAGE (100-120 kDa). Los niveles de la CgB no se habían modificado entre los animales no operados y los animales de referencia.

Localización celular de la producción miocárdica de la CgB en una insuficiencia cardíaca experimental

Según se muestra en la Figura 7 (que muestra los resultados de un análisis inmunohistoquímico), se encontró una inmunotinción bastante fuerte de la CgB en los cardiomiocitos de tejido miocárdico no infartado, mientras que sólo se observó una tinción débil en la región infartada. La inmunotinción fue confirmada en secciones de control positivo del SNC o de un tejido de tumor carcinoide. No se observó tinción, o era muy débil, en las secciones de control negativo teñidas omitiendo el anticuerpo primario o mediante el uso de un antisuero no inmune, respectivamente. La Figura 7 muestra que las únicas células del miocardio que producen la CgB son los cardiomiocitos, lo que indica que la CgB es una proteína regulada del miocardio y de los cardiomiocitos durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca.

Regulación de la expresión génica de la CgB en cardiomiocitos neonatales

La expresión génica de la CgB estaba regulada por aumento *in vitro* por varias proteínas de señalización importantes en la enfermedad cardiovascular, siendo la más destacada la noradrenalina (NA) con un aumento de 3 veces (Figura 8). La angiotensina II (AT II), la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) también regulaban significativamente por aumento la producción de la CgB, pero notablemente menos que la noradrenalina. Por el contrario, no se encontró ningún cambio significativo en la expresión génica de la CgB después de la estimulación de las células con endotelina, con factor de necrosis tumoral α , con interleucina 1 β o con CgB. La forskolina, que sirve como control positivo ya que se sabe que la forskolina regula por aumento la expresión génica de la CgB, también aumentaba la producción de la CgB en un 60 % (Figura 8).

Con fines comparativos también se investigó la expresión génica del BNP. Como se esperaba, la producción del BNP aumentó después de la estimulación con NA, con AT II, con endotelina y con TGF- β (Figura 8). Al igual que para la CgB, se demostró que la NA era el estímulo más potente para el aumento en la expresión génica del BNP. La estimulación de las células estimuladas con CgB312-323 a varias concentraciones no afectó a la expresión génica de la CgB ni a la del BNP.

La expresión génica de la CgB y la del BNP era estable en las células estimuladas únicamente con PBS, y la expresión génica de la Rpl4 no estaba modificada en ninguno de los experimentos.

*Niveles en circulación de la CgB en la insuficiencia cardíaca**Niveles en circulación de la CgB en el modelo experimental*

Los niveles en circulación de la CgB estaban aumentados en los animales con insuficiencia cardíaca en comparación con los animales de referencia ($1,44 \pm 0,12$ nmol/l frente a $1,02 \pm 0,07$ nmol/l, $p = 0,003$, Figura 9). Los niveles en circulación de la CgB también se correlacionaban significativamente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales ($r = 0,42$, $p = 0,030$, datos no mostrados), y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo ($r = 0,48$, $p = 0,025$, datos no mostrados). No hubo ninguna diferencia significativa en los niveles en circulación de la CgB entre los animales no operados y los animales operados de referencia.

Características de la situación inicial de los pacientes humanos con insuficiencia cardíaca y de los sujetos de control

No había ninguna diferencia relativa al género para los pacientes con insuficiencia cardíaca y los del grupo de control (Tabla 3). Los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada eran mayores que los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada ($73,5 \pm 2,4$ frente a $62,7 \pm 1,5$ años, $p = 0,01$), y que los sujetos de control ($73,5 \pm 2,4$ frente a $60,6 \pm 1,1$ años, $p < 0,001$), mientras que no había ninguna diferencia significativa en la edad entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y los sujetos de control ($62,7 \pm 1,5$ frente a $60,6 \pm 1,1$ años, $p = 0,12$, Tablas 3 y 4).

En la evaluación del grupo con ICC como un todo, los pacientes estaban principalmente en un estado estable, con un 67 % en la clase II de la NYHA, una duración mediana de 18 meses de los síntomas de la insuficiencia cardíaca, y una fracción de eyección ventricular izquierda media (FEVI) del 33 % (Tabla 3). Los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada tenían una insuficiencia cardíaca más grave, evaluada mediante la clase de la NYHA y la FEVI en comparación con los otros pacientes con insuficiencia cardíaca, pero con una duración similar de los síntomas de la insuficiencia cardíaca (Tabla 4).

Los pacientes se trataron según directrices actualizadas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, recibiendo prácticamente todos los pacientes un bloqueante β y un bloqueante del eje de renina-angiotensina-aldosterona, y una elevada proporción se trató con estatinas, warfarina y ácido acetilsalicílico (Tabla 3). Adicionalmente, el 18 % de los pacientes estaba siendo tratado con terapia de resincronización cardíaca (TRC). En la comparación entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada y los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada, más pacientes del grupo descompensado estaban siendo tratados con digitalis y una TRC, y había una tendencia a un mayor uso de diuréticos y de nitrato (Tabla 4). El uso de IBP era similar en los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada (Tabla 4), en total 11 (14 %) de los pacientes con una insuficiencia cardíaca usaban IBP (Tabla 3).

Niveles en circulación de la cromogranina B en pacientes humanos con insuficiencia cardíaca

Los niveles en circulación de la CgB estaban claramente aumentados en los pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los sujetos de control ($1,69 \pm 0,03$ frente a $1,52 \pm 0,05$ nmol/l, $p = 0,007$, Figura 10A). Además, los niveles de la CgB aumentaron proporcionalmente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó mediante la clase funcional de la NYHA; grupo de control: $1,52 \pm 0,05$, clase II de la NYHA: $1,64 \pm 0,03$, clase III de la NYHA: $1,78 \pm 0,08$, clase IV de la NYHA: $1,81 \pm 0,09$ nmol/l; prueba de tendencia: $p = 0,001$, Figura 10B). No

había ninguna diferencia significativa en los niveles en circulación de la CgB entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada ($1,68 \pm 0,03$ frente a $1,76 \pm 0,08$ nmol/l, $p = 0,27$, Figura 11), sin embargo, debido al número relativamente bajo de pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada, el estudio tenía una potencia estadística limitada para detectar dichas diferencias. No obstante, se apreció una tendencia general hacia unos niveles más altos de la CgB en los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada, y puede observarse en la Figura 11. El uso de IBP no se asociaba con un aumento en los niveles en circulación de la CgB (usuarios de IBP frente a no usuarios; $1,68 \pm 0,07$ frente a $1,69 \pm 0,03$, $p = 0,98$, Figura 12A), por el contrario, el uso de IBP aumentó claramente los niveles en circulación de la CgA (usuarios de IBP frente a no usuarios: $15,89 \pm 4,18$ frente a $6,09 \pm 0,37$ nmol/l, $p = 0,007$, Figura 12B). No encontramos ninguna diferencia en los niveles en circulación de la CgB entre los pacientes con insuficiencia cardíaca debida a una etiología isquémica ni en los pacientes con un diagnóstico de cardiomiopatía dilatada ($1,69 \pm 0,04$ frente a $1,70 \pm 0,07$ nmol/l, $p = 0,89$). El género no afectaba a los niveles en circulación de la CgB, encontrándose unos niveles similares para los pacientes masculinos y femeninos con ICC ($1,70 \pm 0,03$ frente a $1,67 \pm 0,06$, $p = 0,89$), y en los sujetos de control masculinos y femeninos ($1,53 \pm 0,06$ frente a $1,48 \pm 0,08$, $p = 0,64$).

Los niveles en circulación de la CgA y de la CgB sólo estaban modestamente correlacionados ($r = 0,27$, $p = 0,006$), lo que indica que estas proteínas pueden estar reguladas de forma diferente durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca. En la evaluación de la precisión de los niveles en circulación de la CgB para el diagnóstico de una insuficiencia cardíaca, la CgB discriminó bien entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca y los sujetos de control (AUC = 0,70, $p = 0,001$, Figura 13), y era claramente superior a la de la CgA (AUC = 0,70 frente a 0,61, Figura 14).

C. Análisis

En el presente estudio notificamos la regulación por aumento de la expresión génica de la CgB y de los niveles de proteínas en el ventrículo izquierdo durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, mientras que la producción de la CgB no estaba aumentada en otros tejidos investigados. Además, se averiguó que los cardiomiocitos eran las únicas células productoras de la CgB, lo que indica que la CgB es una proteína del miocardio y de los cardiomiocitos regulada por aumento durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca. Para apoyar esta noción, la producción de la CgB en el miocardio se asoció estrechamente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales, y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo. Adicionalmente, unas importantes proteínas de señalización y bien conocidas en la enfermedad cardiovascular, incluyendo la AT II, el TGF- β , la MCP-1 y lo más prominentemente la NA, regulaban por aumento la expresión génica de la CgB en los cardiomiocitos, relacionando la producción de la CgB en el miocardio con el eje RAAS, la producción de citocinas y el sistema β adrenérgico. Para complementar estos hallazgos, también averiguamos que los niveles en circulación de la CgB estaban aumentados tanto en la insuficiencia cardíaca experimental como en la clínica, aquí los niveles de la CgB también están estrechamente asociados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca y el grado de remodelado del miocardio. En la insuficiencia cardíaca clínica, los niveles en circulación de la CgB están regulados según la clase funcional de la NYHA, pero no se veían afectados por el género ni por el uso de IBP, lo último en acusado contraste con los niveles en circulación de la CgA que estaban claramente aumentados en los usuarios de IBP. Los niveles en circulación de la CgA y de la CgB sólo se correlacionaban de forma modesta, lo que indica que estas proteínas pueden ser reguladas de forma diferente durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca. En la comparación de la precisión de la CgA y de la CgB en circulación para el diagnóstico de una insuficiencia cardíaca, la CgB era claramente superior a la CgA. Por lo tanto, parece que la CgB es la proteína del miocardio y de los cardiomiocitos regulada durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, representando los niveles en circulación de la CgB un nuevo biomarcador específico cardíaco muy interesante para los pacientes con una insuficiencia cardíaca.

Tabla 1. Estadística descriptiva de los animales.

No había ninguna diferencia en el peso corporal en la situación inicial entre los animales de referencia y los que tenían una ICC. Una semana después del IM, los pulmones de los animales con una ICC habían aumentado de peso, la masa del ventrículo izquierdo y la masa del ventrículo derecho eran mayores, y la expresión génica miocárdica del BNP estaba regulada por aumento en comparación con los animales de referencia. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM.

	De referencia (N = 29)	Con ICC (N = 35)	p
Peso del animal, día 0 (g)	$24,3 \pm 0,4$	$24,2 \pm 0,3$	0,83
Peso del pulmón, 1 semana (g)	$0,1447 \pm 0,0022$	$0,2950 \pm 0,0119$	< 0,001

No había ninguna diferencia en el peso corporal en la situación inicial entre los animales de referencia y los que tenían una ICC. Una semana después del IM, los pulmones de los animales con una ICC habían aumentado de peso, la masa del ventrículo izquierdo y la masa del ventrículo derecho eran mayores, y la expresión génica

miocárdica del BNP estaba regulada por aumento en comparación con los animales de referencia. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM.

	De referencia (N = 29)	Con ICC (N = 35)	p
Masa del VI, 1 semana (g)	0,0826 $\pm$ 0,0015	0,1061 $\pm$ 0,0023	< 0,001
Masa del VD, 1 semana (g)	0,0202 $\pm$ 0,0007	0,0233 $\pm$ 0,0008	0,006
Peso del pulmón / longitud de la tibia (g/mm)	0,0788 $\pm$ 0,0013	0,1614 $\pm$ 0,0071	< 0,001
Masa del VI / longitud de la tibia (g/mm)	0,0447 $\pm$ 0,0008	0,0571 $\pm$ 0,0012	< 0,001
Masa del VD / longitud de la tibia (g/mm)	0,0109 $\pm$ 0,0004	0,0125 $\pm$ 0,0004	0,008
Expresión génica del BNP en el VI (normalizada frente a la referencia)	1,0 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,7	< 0,001

Abreviaturas / métodos:

VI: ventrículo izquierdo, VD: ventrículo derecho, BNP: péptido natriurético de tipo B.

La expresión génica del VI se midió mediante una PCR cuantitativa en tiempo real.

5 Tabla 2. Asociación entre la expresión génica de la cromogranina B y del péptido natriurético de tipo B en el miocardio, y el peso de los pulmones de los animales.

En la parte no infartada del ventrículo izquierdo, la expresión génica de la CgB estaba asociada más estrechamente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales, con respecto a lo que se encontró para la expresión génica del BNP; la expresión génica de la CgB explica el 62 % de la variación en el peso de los pulmones de los animales (r^2) frente a la expresión génica del BNP, que explica únicamente el 41 %. La combinación de la expresión génica de la CgB y del BNP en un modelo multivariable añadió una información limitada a un modelo sólo con CgB, aumentando r^2 desde 0,62 hasta 0,70, proporcionando la mayor contribución la CgB (β , CgB = 0,62 frente a β , BNP = 0,33). La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR y se presenta como el cambio frente al grupo de referencia $\pm$ EEM.

Regresión lineal univariante, peso del pulmón del animal como variable dependiente

	B (EE)	p	β	r^2
CgB	0,028 (0,006)	< 0,001	0,79	0,62
BNP	0,021 (0,006)	0,006	0,64	0,41

Regresión lineal multivariante, peso del pulmón del animal como variable dependiente

	B (EE)	p	β	r^2
CgB	0,022 (0,006)	0,003	0,62	0,70
BNP	0,010 (0,005)	0,08	0,33	

10 Tabla 3. Características de la situación inicial en los pacientes con una insuficiencia cardíaca y en los sujetos de control.

15 No había diferencias significativas entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca y el grupo de control con respecto a la edad y el género. Los pacientes con una insuficiencia cardíaca se trataron según las directrices actualizadas, recibiendo prácticamente todos tanto un bloqueante β como un bloqueante del eje de renina-angiotensina-aldosterona, una elevada proporción tratados con estatinas, warfarina, ácido acetilsalicílico y un antagonista de la aldosterona, y un 18 % tratados con una terapia de resincronización cardíaca.

	Pacientes con insuficiencia cardíaca (N = 80)	Grupo de control (N = 20)	p
Género masculino (no, %)	64 (80 %)	16 (80 %)	NS
Edad (media $\pm$ EEM)	64,1 $\pm$ 1,4	60,6 $\pm$ 1,1	NS
Clase de la NYHA (no, %)	II 54 (67 %)		
	III 18 (23 %)		

20 No había diferencias significativas entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca y los del grupo de control con respecto a la edad y el género. Los pacientes con una insuficiencia cardíaca se trataron según las directrices actualizadas, recibiendo prácticamente todos tanto un bloqueante β como un bloqueante del eje de renina-angiotensina-aldosterona, una elevada proporción tratados con estatinas, warfarina, ácido acetilsalicílico y un antagonista de la aldosterona, y un 18 % tratados con una terapia de resincronización cardíaca.

Pacientes con insuficiencia cardíaca (N = 80)	Grupo de control (N = 20)	p (N = 80)
IV	8 (10 %)	
Etiología de la ICC (no, %)		
Isquémica	48 (60 %)	
Cardiomiopatía dilatada	27 (34 %)	
Otra	5 (6 %)	
Duración de la ICC, meses (mediana, percentil 25°-75°)	18 (7-36)	
FEVI, % (media ± EEM)	33 ± 1	
Medicación (no, %)		
Bloqueante β	79 (99 %)	
IECA	58 (73 %)	
BRA	21 (26 %)	
IECA o BRA	79 (99 %)	
Diuréticos	64 (80 %)	
Estatina	48 (60 %)	
Warfarina	47 (59 %)	
ASA	43 (54 %)	
Clopidogrel	9 (11 %)	
Antagonista de la aldosterona	16 (20 %)	
Digitalis	30 (38 %)	
Amiodarona	10 (13 %)	
Nitrato	10 (13 %)	
IBP	11 (14 %)	
TRC	14 (18 %)	
CDI	14 (18 %)	
Abreviaturas:		
FEVI = fracción de eyección del ventrículo izquierdo,		
IECA = inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina II,		
BRA = inhibidor del receptor de la angiotensina de tipo II,		
ASA = ácido acetilsalicílico,		
IBP = inhibidor de la bomba de protones,		
TRC = terapia de resincronización cardíaca,		
CDI = cardiodesfibrilador implantable		

Tabla 4. Características de la situación inicial en los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada.

5 Los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada eran mayores, tenían una ICC más grave según se evaluó mediante la clase de la NYHA y la FEVI, y una mayor proporción estaba siendo tratada con una terapia de resincronización cardíaca, digitalis e IECA (pero sin ninguna diferencia en la medicación combinada de IECA / BRA), también el uso de diuréticos y de nitrato tenía una diferencia límite.

10

	ICC compensada (N = 70)	ICC descompensada (N = 10)	p
Género masculino (no, %)	57 (81 %)	7 (70 %)	0,40
Edad (media ± EEM)	62,7 ± 1,5	73,5 ± 2,4	0,01
Clase de la NYHA (no, %)			< 0,001
II	54 (77 %)	0 (0 %)	
III	15 (22 %)	3 (30 %)	
IV	1 (1 %)	7 (70 %)	

Los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada eran mayores, tenían una ICC más grave según se evaluó mediante la clase de la NYHA y la FEVI, y una mayor proporción estaba siendo tratada con una terapia de

resincronización cardíaca, digitalis e IECA (pero sin ninguna diferencia en la medicación combinada de IECA / BRA), también el uso de diuréticos y de nitrato tenía una diferencia limítrofe.

	ICC compensada (N = 70)	ICC descompensada (N =10)	p
Etiología de la ICC (no, %)			
Isquémica	39 (56 %)	8 (80 %)	0,67
Cardiomiopatía dilatada	25 (36 %)	2 (20 %)	
Otra	6 (8 %)	0 (0 %)	
Duración de la ICC, meses (mediana, percentil 25°-75°)	18 (11-36)	18 (6-62)	0,76
FEVI, % (media $\pm$ EEM)	34 $\pm$ 1	26 $\pm$ 3	0,01
Medicación (no, %)			
Bloqueante β	69 (99 %)	10 (100 %)	0,70
IECA	48 (69 %)	10 (100 %)	0,04
BRA	21 (30 %)	0 (0 %)	0,04
IECA o BRA	69 (99 %)	10 (100 %)	0,70
Diuréticos	54 (77 %)	10 (100 %)	0,09
Estatina	44 (63 %)	4 (40 %)	0,17
Warfarina	40 (57 %)	7 (70 %)	0,44
ASA	38 (54 %)	5 (50 %)	0,80
Clopidogrel	8 (11 %)	1 (10 %)	0,89
Antagonista de la aldosterona	14 (20 %)	2 (20 %)	1,00
Digitalis	22 (31 %)	8 (80 %)	0,003
Amiodarona	8 (11 %)	2 (20 %)	0,44
Nitrato	7 (10 %)	3 (30 %)	0,07
IBP	9 (13 %)	2 (20 %)	0,54
TRC	10 (14 %)	4 (40 %)	0,05
CDI	12 (17 %)	2 (20 %)	0,82

5 Ejemplo 2. La expresión de la SgII está significativamente aumentada en la insuficiencia cardíaca experimental y clínica

A. Materiales y métodos

10 Estos son según se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto donde se indique a continuación.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

15 Se extrajo ARN total del miocardio de 9 ratones con una ICC y de 8 de referencia operados mediante el uso del SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, WI, EE.UU.) según el protocolo. Se usó tejido (20-35 mg) de la región no infartada del ventrículo izquierdo para la extracción del ARN. La homogeneización se llevó a cabo con el sistema Mixer Mill MM 300 (RETSCH, Haan, Alemania) después de la adición de 1,75 μ l de tampón de lisis y de microesferas de acero inoxidable de 5 mm (Qiagen, Hilden, Alemania) a las muestras. La concentración de ARN se midió con el sistema NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) y la calidad del ARN fue evaluada con el Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). El ADNc fue producido a partir de 5 μ g de ARN con el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.); se usó el ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) para la transcripción inversa.

20 La expresión génica se midió mediante una qRT-PCR detectada en un 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con ensayos de expresión génica TaqMan prefabricados de Applied Biosystems: la SgII (Mm00843883_s1), el BNP (Mm00435304_g1), la proteína ribosómica L4 (Rpl4) (Mm00834993_g1). La Rpl4 sirvió como control interno. La curva de referencia de la SgII se representó a partir de tejido cerebral de ratón neonatal, mientras que se usó tejido miocárdico para la representación de las curvas de referencia del BNP y de la RPL. La expresión génica se presenta como el cambio desde la media en el grupo de referencia (normalizado frente a la referencia). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

30

Radioinmunoensayo

Los niveles en circulación y tisulares de la SgII se midieron mediante un radioinmunoensayo propio específico de región que detecta la Sg 11154-165 según se ha descrito previamente (Stridsberg et al., 1998, Regulatory Peptides: 148, 95-98). Ninguna muestra tenía los niveles de la SgII por debajo del límite de detección del sistema (< 2 fmol/tubo). Todas las muestras se ensayaron por duplicado, y la variación total del ensayo era $< 7 \%$.

Los niveles en circulación de la CgB se midieron mediante un radioinmunoensayo propio específico de región que detecta la CgB439-451 según se ha notificado previamente (Stridsberg et al., 1995, *supra*), y los niveles de la CgA se midieron mediante un radioinmunoensayo comercial que identifica la CgA116-439 (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Suecia).

Inmunohistoquímica

Se tiñeron secciones miocárdicas de ratón mediante el uso de anticuerpo policlonal purificado anti-CgA humana de conejo (Sc-13090, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.), policlonal purificado por afinidad anti-CgB humana de cabra (Sc-1489, Santa Cruz) y policlonal anti-SgI1172-186 humana de conejo. Los anticuerpos primarios fueron seguidos por IgG anti-conejo o anti-cabra biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las inmunorreactividades se amplificaron adicionalmente mediante el uso de complejos de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Se usó diaminobenzidina como cromógeno en un sistema mejorado metálico comercial (Pierce Chemical, Rockford, IL). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. El tejido del SNC y del tumor carcinóide sirvieron como tejidos de control positivo. La omisión del anticuerpo primario o el uso de suero de conejo no inmune sirvieron como controles negativos.

Aislamiento de los cardiomiocitos neonatales y experimentos de cultivo celular

Se aislaron cardiomiocitos neonatales de ratas a partir de ratas Wistar neonatales (1-3 días) (Taconic, Skensved, Dinamarca) según se ha notificado previamente. Después de un periodo de inanición de 24 horas, los cardiomiocitos fueron estimulados durante 24 horas con los siguientes agentes: forskolina [1 y $10 \mu\text{M}$], noradrenalina [$100 \mu\text{M}$], endotelina [77 ng/ml] y angiotensina II [$1 \mu\text{M}$] (todos de Sigma, Europe), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [10 ng/ml] (BioSource International Camarillo, CA, EE.UU.), interleucina 1β (IL- 1β) [10 ng/ml], proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) [200 ng/ml], factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [10 ng/ml] (todos de R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) y un péptido C-terminal de la CgB - CgB312-323 y secretoneurina [1 , 10 y 100 ng/ml] (053-20, 047-95, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, EE.UU.).

Se aisló ARN total a partir de cardiomiocitos de rata neonatal según el protocolo (RNeasy mini kit, Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Junto con tampón de lisis, se usaron el sistema Mixer Mill 300 (RETSCH, Haan, Alemania) y microesferas de acero inoxidable (Qiagen, Hilden, Alemania) para la disrupción mecánica de las células. Las concentraciones y la calidad del ARN fueron evaluadas según se ha descrito anteriormente con el sistema NanoDrop y un Agilent BioAnalyzer 2100. Las reacciones de transcripción inversa se llevaron a cabo con el kit iScript Select cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.). La expresión génica se determinó mediante una qRT-PCR con ensayos de expresión génica TaqMan prefabricados de: la SgII (Rn01400686_g1), la CgB (Rn01514853_m1), el BNP (Rn0058.0641_m1), la Rpl4 (Rn00821091_g1). La expresión génica en las células estimuladas se presenta como el cambio frente a la expresión génica en células estimuladas con PBS (normalizado frente al control). Todas las muestras se analizaron por triplicado y se usó la expresión génica de la Rp14 como control interno.

B. Resultados

Características de los animales

No había ninguna diferencia en el peso corporal entre los animales del grupo con ICC ($N = 35$) y el grupo de referencia ($N = 29$) en la situación inicial (Tabla 1). Una semana después del IM, los animales con ICC tenían un peso de los pulmones dos veces mayor que el de los animales de referencia, y la masa del ventrículo izquierdo y la masa del ventrículo derecho significativamente aumentadas (Tabla 1), lo que confirma que los animales con ICC tenían de hecho una insuficiencia cardíaca con un remodelado del miocardio en curso. Además, los animales con ICC tenían claramente aumentada la producción miocárdica de BNP (Tabla 1).

Expresión génica miocárdica de la SgII en una insuficiencia cardíaca experimental

La expresión génica de la SgII estaba muy regulada por aumento en el miocardio no infartado de los animales con insuficiencia cardíaca en comparación con los animales de referencia (regulada por aumento 11,5 veces, $p < 0,001$), que estaba más regulada por aumento de lo que era el caso para la expresión génica del BNP (regulado por aumento 5,8 veces frente al de referencia, $p < 0,001$, Figura 15). La expresión génica de la SgII se correlacionaba estrechamente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales ($r = 0,76$, $p < 0,001$, Figura 16A) y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo

izquierdo ($r = 0,66$, $p = 0,006$, Figura 16B). Además, la expresión génica de la SgII estaba estrechamente correlacionada con la expresión génica de la CgB (Figura 17B) y del BNP (Figura 17A).

5 No encontramos ningún cambio en la expresión génica entre los animales de control no operados y los animales del grupo de referencia, y la expresión génica de la Rp14 no estaba modificada en ninguno de los experimentos.

Niveles miocárdicos de la proteína SgII en una insuficiencia cardíaca experimental

10 Los niveles proteicos de la SgII estaban claramente aumentados en la parte no infartada del ventrículo izquierdo en los animales con ICC en comparación con el tejido miocárdico de los animales de referencia ($0,63 \pm 0,12$ frente a $0,47 \pm 0,09$ fmol/mg de proteína, $p = 0,006$, Figura 18), y se correlacionaban estrechamente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales ($r = 0,55$, $p = 0,018$, Figura 19A), y el remodelado del ventrículo izquierdo evaluado por la masa del ventrículo izquierdo ($r = 0,58$, $p = 0,012$, Figura 19B). Adicionalmente, los niveles de la SgII también estaban aumentados en la parte infartada del ventrículo izquierdo en los animales con insuficiencia cardíaca en comparación con el tejido miocárdico normal ($0,67 \pm 0,03$ frente a $0,36 \pm 0,01$ fmol/mg de proteína, $p < 0,001$, Figura 20), con los niveles de la SgII de esta parte también correlacionados estrechamente con el peso de los pulmones de los animales ($r = 0,71$, $p = 0,001$, Figura 21A) y la masa del ventrículo izquierdo ($r = 0,74$, $p = 0,001$, Figura 21B).

20 De forma similar a lo que se ha notificado en el Ejemplo 1 para la CgB, no se observó ningún aumento en los niveles de la SgII durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca en ningún otro tejido investigado (que incluía el ventrículo derecho, el pulmón, el bazo, el hígado, el riñón, el estómago, el colon y el músculo esquelético, datos no mostrados). Los niveles de la SgII tampoco se habían modificado entre los animales no operados y los animales de referencia.

25

Localización celular de la producción miocárdica de la SgII en una insuficiencia cardíaca experimental

30 Según se muestra en la Figura 22 (que muestra los resultados de un análisis inmunohistoquímico), se encontró una inmunotinción bastante fuerte de la SgII de cardiomiocitos en los cardiomiocitos del tejido miocárdico no infartado, mientras que sólo se observó una tinción débil en la región infartada. Se encontró una inmunotinción similar para la CgA y la CgB (datos no mostrados).

35 La inmunotinción fue confirmada en secciones de control positivo del SNC o de tejido de tumor carcinoide. No se observó tinción, o era muy débil, en las secciones de control negativo teñidas omitiendo el anticuerpo primario o mediante el uso de un antisuero no inmune, respectivamente. La Figura 22 muestra que las únicas células del miocardio que producen la SgII son los cardiomiocitos, lo que indica que la SgII es una proteína regulada del miocardio y de los cardiomiocitos durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca.

Regulación de la expresión génica de la SgII en cardiomiocitos neonatales

40 La expresión génica de la SgII estaba significativamente regulada por aumento *in vitro* por la transformación del factor de crecimiento transformante P (TGF- β) con un aumento del 85 %, y por la noradrenalina (NA) con un aumento del 55 % (Figura 23). Por el contrario, no se encontró ningún cambio significativo en la expresión génica de la SgII después de la estimulación de las células con angiotensina II (AT II), con proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), con endotelina, con factor de necrosis tumoral α , con interleucina 1 β , con CgB o con SgII. La forskolina, que sirve como control positivo ya que se sabe que la forskolina regula por aumento la expresión génica de la SgII, también aumentaba la producción de la SgII en un 40 % (Figura 23).

50 Con fines comparativos también se investigó la expresión génica de la CgB y del BNP, encontrándose que la NA y el TGF- β son potentes agentes para la regulación por aumento de los tres genes (los resultados de la SgII se muestran en la Figura 23. Los resultados de la CgB y del BNP se muestran en la Figura 8A y en la Figura 8B, respectivamente). La estimulación de las células con SgII (secretoneurina) a varias concentraciones no afectó a la expresión génica de la SgII, de la CgB ni del BNP. Asimismo, no se aprecia ningún efecto sobre la expresión génica de la SgII después de la estimulación de los cardiomiocitos con CgB312-323. La expresión génica de la SgII, de la CgB y del BNP era estable en las células estimuladas únicamente con PBS, y la expresión génica de la Rpl4 no estaba modificada en ninguno de los experimentos.

55 Niveles en circulación de la secretogranina II en la insuficiencia cardíaca

Características de la situación inicial de los pacientes humanos con insuficiencia cardíaca y de los sujetos de control

60 No había ninguna diferencia relativa al género para los pacientes con insuficiencia cardíaca y los del grupo de control (Tabla 3). Los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada eran mayores que los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada ($73,5 \pm 2,4$ frente a $62,7 \pm 1,5$ años, $p = 0,01$), y los sujetos de control ($73,5 \pm 2,4$ frente a $60,6 \pm 1,1$ años, $p < 0,001$), mientras que no había ninguna diferencia significativa en la edad entre los

65

pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y los sujetos de control ($62,7 \pm 1,5$ frente a $60,6 \pm 1,1$ años, $p = 0,12$, Tablas 3 y 4).

En la evaluación del grupo con ICC como un todo, los pacientes estaban principalmente en un estado estable, con un 67 % en la clase II de la NYHA, una duración mediana de 18 meses de los síntomas de la insuficiencia cardíaca, y una fracción de eyección ventricular izquierda media (FEVI) del 33 % (Tabla 3). Los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada tenían una insuficiencia cardíaca más grave evaluada mediante la clase de la NYHA y la FEVI en comparación con los otros pacientes con insuficiencia cardíaca, pero con una duración similar de los síntomas de la insuficiencia cardíaca (Tabla 4).

Los pacientes se trataron según directrices actualizadas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, recibiendo prácticamente todos los pacientes un bloqueante β y un bloqueante del eje de renina-angiotensina-aldosterona, y una elevada proporción se trató con estatinas, warfarina y ácido acetilsalicílico (Tabla 3). Adicionalmente, el 18 % de los pacientes estaba siendo tratado con una terapia de resincronización cardíaca (TRC). En la comparación entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada y los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada, más pacientes del grupo descompensado estaban siendo tratados con digitalis y una TRC, y había una tendencia a un mayor uso de diuréticos y de nitrato (Tabla 4). El uso de IBP era similar en los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada (Tabla 4), en total 11 (14 %) de los pacientes con una insuficiencia cardíaca usaban IBP (Tabla 3).

Niveles en circulación de la secretogranina II en pacientes con insuficiencia cardíaca

Los niveles en circulación de la SgII estaban claramente aumentados en los pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los sujetos de control ($0,17 \pm 0,01$ frente a $0,12 \pm 0,01$ nmol/l, $p < 0,001$, Figura 24A). Además, los niveles de la SgII aumentaron proporcionalmente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca según se evaluó mediante la clase funcional de la NYHA; grupo de control: $0,12 \pm 0,01$, clase II de la NYHA: $0,17 \pm 0,01$, clase III de la NYHA: $0,19 \pm 0,01$, clase IV de la NYHA: $0,19 \pm 0,02$ nmol/l; prueba de tendencia: $p < 0,001$, Figura 24B). No había ninguna diferencia en los niveles en circulación de la SgII entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca compensada y descompensada (Figura 25), sin embargo, debido al número relativamente bajo de pacientes con una insuficiencia cardíaca descompensada, el estudio tenía una potencia estadística limitada para detectar dichas diferencias. El uso de IBP no se asociaba con un aumento en los niveles en circulación de la SgII (usuarios de IBP frente a no usuarios: $0,17 \pm 0,01$ frente a $0,17 \pm 0,01$, $p = 0,76$, Figura 26). Por el contrario, el uso de IBP aumentó claramente los niveles en circulación de la CgA (usuarios de IBP frente a no usuarios: $15,89 \pm 4,18$ frente a $6,09 \pm 0,37$ nmol/l, $p = 0,007$, Figura 12). No encontramos ninguna diferencia en los niveles en circulación de la SgII entre los pacientes con insuficiencia cardíaca debida a una etiología isquémica ni en los pacientes con un diagnóstico de cardiomiopatía dilatada ($0,18 \pm 0,01$ frente a $0,16 \pm 0,01$ nmol/l, $p = 0,29$). El género no afectaba a los niveles en circulación de la SgII, encontrándose unos niveles similares para los pacientes masculinos y femeninos con insuficiencia cardíaca ($0,17 \pm 0,01$ frente a $0,18 \pm 0,01$, $p = 0,46$), y para los sujetos de control masculinos y femeninos ($0,12 \pm 0,01$ frente a $0,13 \pm 0,01$, $p = 0,39$).

Los niveles en circulación de la SgII y de la CgA estaban modestamente correlacionados ($r = 0,27$, $p = 0,006$), lo que indica que estas proteínas pueden estar reguladas de forma diferente durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca. En la evaluación de la precisión de los niveles en circulación de la SgII para el diagnóstico de una insuficiencia cardíaca, la SgII discriminó bien entre los pacientes con una insuficiencia cardíaca y los sujetos de control (AUC = 0,84, $p = 0,0001$, Figura 27), y era claramente superior a la de la CgA (AUC = 0,61, Figura 28).

C. Análisis

En el presente estudio, notificamos la regulación por aumento de la expresión génica de la SgII y de los niveles de proteínas en el ventrículo izquierdo durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, mientras que no se encontró ningún cambio en la producción de la SgII en los otros tejidos investigados. Además, la producción de la SgII sólo se encontró en los cardiomiocitos, lo que sugiere que la SgII es una proteína del miocardio y de los cardiomiocitos regulada durante el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Para apoyar la noción de la regulación miocárdica, la producción de la SgII estaba estrechamente asociada con la gravedad de la insuficiencia cardíaca, según se evaluó por el peso de los pulmones de los animales, y el remodelado del miocardio evaluado por la masa del ventrículo izquierdo, tanto en la parte no infartada como en la parte infartada del ventrículo izquierdo. Adicionalmente, tanto el TGF- β como la NA aumentaron la expresión génica de la SgII en los cardiomiocitos, relacionando la producción de la SgII en el miocardio con rutas inflamatorias y de remodelado, y con el sistema β adrenérgico. Para complementar estos hallazgos, los niveles en circulación de la SgII también estaban claramente aumentados en los pacientes con insuficiencia cardíaca, y aumentaban proporcionalmente con la gravedad de la insuficiencia cardíaca evaluada mediante la clase funcional de la NYHA. Al igual que la CgB, los niveles en circulación de la SgII no se veían afectados por el género y por el uso de IBP, lo último en acusado contraste con los niveles en circulación de la CgA, que estaban claramente aumentados en los usuarios de IBP. Los niveles en circulación de la SgII sólo se correlacionaban de forma modesta con la CgA, lo que indica que estas proteínas pueden estar reguladas de forma diferente durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca. En la comparación de la precisión de la SgII circulante con los niveles de la CgA para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca, la SgII era claramente superior. Por lo

tanto, parece que la SgII es una proteína del miocardio y de los cardiomiocitos regulada durante el desarrollo de una insuficiencia cardíaca, representando los niveles en circulación de la SgII un nuevo biomarcador específico cardíaco muy interesante para los pacientes con una insuficiencia cardíaca.

5 Ejemplo 3. Los niveles de la SgII y de la CgB en la sangre y en la saliva están aumentados en los pacientes con taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica

La taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica (TVPC) es un ejemplo prototípico de una enfermedad cardíaca asociada al calcio que es una forma heredable de trastorno arritmogénico causado por una taquicardia ventricular polimorfa inducida por el ejercicio o emocional en ausencia de una enfermedad cardíaca estructural detectable. La TVPC es un trastorno especialmente peligroso, también en individuos jóvenes. El diagnóstico se basa actualmente en la identificación de los pacientes mediante unos antecedentes típicos del paciente con un síncope inducido por estrés, o por unos antecedentes de muerte súbita la familia, y la confirmación del diagnóstico mediante un cribado genético molecular de los genes que codifican para el receptor cardíaco de la rianodina de tipo 2 (RyR 2) y de la calsecuestrina. Sin embargo, dado que los síntomas pueden variar y que la muerte cardíaca súbita puede ser la primera manifestación, son necesarios nuevos marcadores para la identificación y el diagnóstico de la TVPC. Este estudio aspira a evaluar si la medición de la SgII y de la CgB en la sangre o en la saliva se asocian con, y son indicativas de, una TVPC.

20 Métodos

Características de los pacientes con TVPC y de los del grupo de control

Para la medición del biomarcador, se compararon seis pacientes con un diagnóstico de TVPC que había sido previamente confirmado mediante una prueba genética, con seis sujetos de control emparejados por edad y género. Los pacientes tenían una mutación en el exón 46 del RyR de tipo 2, y la mutación se clasifica como G2337V. Previamente se había averiguado que todos los pacientes con TVPC tenían una función y un estado miocárdico normal evaluado mediante una ecocardiografía, una angiografía y los biomarcadores cardíacos estándar de péptidos natriuréticos y troponinas específicas cardíacas. Dos de los pacientes con TVPC fueron clasificados como con hallazgos patológicos inespecíficos en la RMN cardíaca, mientras que los demás pacientes tenían una RMN cardíaca normal.

El grupo de control para la prueba de ejercicio estaba emparejado por edad y género con los seis pacientes con TVPC. Los sujetos de control no estaban usando ninguna medicación con una base regular, y no tenían antecedentes de enfermedad cardíaca ni ningún síntoma ni hallazgo clínico que pudiera estar relacionado con una enfermedad cardíaca.

Protocolo de estrés por ejercicio

Todos los individuos realizan una prueba de estrés por ejercicio en bicicleta después de la toma de muestras de sangre y de saliva de la situación inicial. Para la prueba de estrés se aplicó un protocolo en rampa comenzando en 100 W y aumentando en incrementos de 50 W cada cuatro minutos. Los pacientes continuaron la prueba hasta el agotamiento, medido por > 18 puntos en la escala de Borg. Todos los pacientes fueron monitorizados de forma continua mediante un ECG durante la prueba, y se registró la presión sanguínea a intervalos de tres minutos.

Análisis de laboratorio

La toma de muestras se llevó a cabo antes e inmediatamente después de la prueba de estrés, mientras que la toma de muestras de saliva se llevó a cabo antes de la prueba de estrés. Los niveles de la SgII se midieron mediante un radioinmunoensayo propio con el epítipo del fragmento de la secretoneurina (SN) (SgII154-165) según se ha descrito previamente (Stridsberg et al., 1998, Regulatory Peptides: 148, 95-98), mientras que los de la CgB mediante un radioinmunoensayo propio que detecta la CgB439-451 según se ha descrito previamente (Stridsberg et al., 2005, Regulatory Peptides: 125, 193-199). Para la comparación y la medición del esfuerzo durante el ejercicio, se determinaron la noradrenalina y la adrenalina en circulación mediante una HPLC.

Análisis estadístico

Los valores de los biomarcadores fueron analizados mediante el uso de prueba de la U de Mann-Whitney y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para los datos en serie. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM. Unos valores de $p < 0,05$ se consideran significativos.

Resultados

El cumplimiento del protocolo de trabajo de la prueba de estrés por ejercicio fue bueno en todos los pacientes que lo realizaron hasta > 18 en la escala de Borg antes de parar. Los registros del ECG del grupo de control eran normales, según evaluó un cardiólogo desconocedor de los niveles de biomarcadores, mientras que en los pacientes con

TVPC se registraron algunos latidos ectópicos ventriculares, incluyendo algunos latidos ventriculares acoplados. No se registró ninguna arritmia grave durante el estudio.

Los niveles de la SgII en la situación inicial indicaban unos niveles en circulación mayores en los pacientes con TVPC en los sujetos sanos de control ($0,159 \pm 0,008$ frente a $0,132 \pm 0,013$ nmol/l, $p = 0,065$) (Figura 29A). Adicionalmente, el aumento en los niveles en circulación de la SgII durante la prueba de estrés era más acusado en los pacientes con TVPC que en el grupo de control, por lo que dio como resultado un aumento posterior al ejercicio en los niveles de la SgII en los pacientes con TVPC en comparación con los sujetos de control ($0,168 \pm 0,008$ frente a $0,134 \pm 0,008$ nmol/l, $p = 0,015$) (Figura 29A). De forma análoga, en la situación inicial, los niveles en circulación de la CgB eran elevados en los pacientes con TVPC en comparación con el grupo de control ($1,39 \pm 0,09$ frente a $0,97 \pm 0,07$ nmol/l, $p = 0,02$), y tenían una significación limítrofe después del ejercicio ($1,56 \pm 0,06$ frente a $1,35 \pm 0,08$ nmol/l, $p = 0,08$) (Figura 29B). Por el contrario, no encontramos ninguna diferencia significativa en los niveles de adrenalina (E) ni de noradrenalina (NE) en la situación inicial de los pacientes con TVPC frente al grupo de control: E: 480 ± 33 frente a 559 ± 48 pmol/l, $p = 0,24$; NE: 2.825 ± 681 frente a 2.274 ± 217 pmol/l, $p = 0,82$), ni después de la prueba de estrés (E: 700 ± 37 frente a 819 ± 73 pmol/l, $p = 0,24$; NE: 6.922 ± 913 frente a 6.888 ± 217 , $p = 0,94$), lo que refleja que los biomarcadores en circulación no están aumentados en general en los pacientes con TVPC. Los niveles de catecolaminas aumentaron significativamente por la prueba de estrés ($p < 0,001$ para ambos frente a los niveles en la situación inicial), lo que refleja el protocolo de trabajo extenuante de nuestro estudio.

Los niveles en saliva de la SgII y de la CgB también estaban aumentados en los pacientes con TVPC en comparación con el grupo de control: SgII: $0,078 \pm 0,020$ frente a $0,024 \pm 0,010$ nmol/l, $p = 0,04$; y CgB: $1,12 \pm 0,26$ frente a $0,23 \pm 0,13$ nmol/l, $p = 0,02$ (Figura 29C y Figura 29D).

Conclusión

Los niveles en circulación y en saliva de la SgII y de la CgB son elevados en los pacientes con TVPC. Dado que los pacientes tienen una función miocárdica normal, excepto por una mutación en el RyR, parece que la SgII y la CgB circulante y en saliva representan unos nuevos e interesantes biomarcadores cardiacos asociados con, e indicativos de, trastornos relacionados con el calcio, y más específicamente con la TVPC, a pesar de tener una mayor importancia fisiopatológica en la TVPC, que refleja la novedad de nuestros datos y la relevancia clínica.

Ejemplo 4. Los niveles de la SgII y de la CgB en la sangre y en la saliva están aumentados en los pacientes hospitalizados con dolor pectoral y con insuficiencia cardíaca isquémica en comparación con los pacientes con dolor pectoral pero sin ninguna enfermedad cardíaca

Introducción

Es interesante evaluar nuevos marcadores del riesgo cardíaco en diferentes subgrupos de pacientes con una enfermedad cardíaca. Según se ha indicado en los otros ejemplos del presente documento, hemos averiguado que la cromogranina B (CgB) y la secretogranina II (SgII) en circulación están aumentadas en los pacientes con una insuficiencia cardíaca (IC) y con una TVPC, un trastorno prototípico mediado por el calcio, lo que indica que estas proteínas pueden ser nuevos biomarcadores cardiacos con un potencial amplio uso clínico. Consecuentemente, quisimos medir los niveles de la SgII y de la CgB en un pequeño grupo de pacientes hospitalizados con dolor pectoral y sospecha de insuficiencia cardíaca isquémica (ICI) para buscar una tendencia en los niveles del biomarcador.

Métodos

Inclusión del paciente

Los pacientes seleccionados para este estudio eran los primeros 14 pacientes incluidos en un estudio mayor que actualmente estaba captando pacientes admitidos con dolor pectoral y con sospecha de una ICI en el Akershus University Hospital, un hospital docente escandinavo con un área de captación de aproximadamente 350.000 individuos. Los pacientes fueron captados prospectivamente entre pacientes no diferenciados que fueron referidos al departamento de urgencias con dolor pectoral como síntoma primario.

Toma de muestras de sangre y de saliva

La toma de muestras de sangre y de saliva se llevó a cabo < 24 horas de la admisión en el hospital. Los niveles de la SgII se midieron mediante un radioinmunoensayo propio específico de región que detecta la SgII1154-165 según se ha descrito previamente (Stridsberg et al., 1998, Regulatory Peptides: 148, 95-98), mientras que la CgB se midió con un radioinmunoensayo propio que detecta la CgB439-451 según se ha descrito previamente (Stridsberg et al., 2005, Regulatory Peptides: 125, 193-199). Había disponibles muestras de saliva de ocho pacientes (cinco pacientes clasificados con ICI, tres pacientes sin ICI).

Clasificación de los pacientes

Los pacientes fueron clasificados según las notas diarias y al diagnóstico final del médico responsable, según las Clasificaciones Internacionales de Enfermedades, 10ª revisión, Organización Mundial de la Salud. Los pacientes que padecían una ICI tenían antecedentes de ICI o de iniciación de ICI durante la hospitalización inicial. Por el contrario, los pacientes clasificados como que no tenían una ICI no tenían antecedentes de ICI ni de dolor pectoral no cardíaco durante la hospitalización inicial.

Análisis estadístico

Este es un estudio preliminar con una potencia estadística limitada, por lo que no permite la evaluación de la significación estadística de los valores de p. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM.

Resultados

Diagnóstico del paciente

Se clasificaron once pacientes como que padecían una ICI: 4 pacientes diagnosticados con un infarto de miocardio sin elevación del ST, que es el subtipo más habitual de infarto de miocardio, 4 pacientes con dolor pectoral anginoso creciente, y 3 pacientes con antecedentes de ICI. De los tres pacientes clasificados como que no padecen una ICI, a dos pacientes se les diagnosticaron problemas en el tracto gastrointestinal superior y un paciente con neumonía como la causa de la hospitalización inicial.

Los niveles en circulación de la SgII y de la CgB son mayores en los pacientes con dolor pectoral con ICI en comparación con los pacientes con dolor pectoral no cardíaco

Los niveles de la SgII en la sangre eran mayores en los pacientes con dolor pectoral y una ICI en comparación con los pacientes con dolor pectoral no cardíaco: $0,156 \pm 0,013$ frente a $0,127 \pm 0,012$ nmol/l (Figura 30A). De forma análoga, los niveles en circulación de la CgB eran mayores en los pacientes con una ICI frente los pacientes con dolor pectoral no cardíaco (sin resultados de ICI) ($1,17 \pm 0,11$ frente a $0,95 \pm 0,01$ nmol/l) (Figura 30B).

Los niveles en saliva de la SgII y de la CgB son mayores en los pacientes con dolor pectoral con ICI en comparación con los pacientes con dolor pectoral no cardíaco

Los niveles de la SgII y de la CgB también estaban aumentados en la saliva de los pacientes con dolor pectoral y una ICI en comparación con los pacientes hospitalizados con dolor pectoral pero sin diagnóstico de ICI: SgII: $0,058 \pm 0,008$ frente a $0,022 \pm 0,004$ nmol/l (Figura 30C); y CgB: $0,664 \pm 0,109$ frente a $0,087 \pm 0,055$ nmol/l (Figura 30D).

Conclusión

En este pequeño estudio preliminar, los niveles de la SgII y de la CgB en la sangre y en la saliva eran mayores en los pacientes con dolor pectoral y con una ICI en comparación con los pacientes con dolor pectoral pero sin enfermedad cardíaca. La SgII y la CgB medidas en la sangre o en la saliva pueden tener por tanto un papel como biomarcador para la evaluación de los pacientes con dolor pectoral, y también de la evaluación del riesgo y la monitorización de los pacientes con ICI. Adicionalmente, estos resultados demuestran que los niveles modificados de las graninas en los pacientes con una enfermedad cardíaca pueden medirse en muestras de saliva, así como en muestras sanguíneas. Por lo tanto, las muestras de saliva son una potencial alternativa a las muestras sanguíneas en los métodos de la invención descritos en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.
2. El método de la reivindicación 1, en el que un aumento en el nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en dicho líquido corporal de dicho sujeto es indicativo de una enfermedad cardíaca, preferentemente el nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en dicho sujeto, se compara con un nivel de control y/o preferentemente se realizan determinaciones sucesivas del nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma.
3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente la determinación del nivel de uno o más de otros biomarcadores asociados con una enfermedad cardíaca, preferentemente los otros biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en cromogranina B, troponinas específicas cardíacas tales como TnI y TnT, péptidos natriuréticos tales como ANP, BNP y NT-proBNP, otros biomarcadores secretados secundarios a una tensión/estrés en los cardiomiocitos tales como ST2 y pro-adrenomedulina, marcadores de inflamación tales como la proteína C reactiva (CRP) y varias citocinas/quimiocinas, marcadores de remodelado extracelular tales como las MMP y las TIMP, otros marcadores de necrosis/apoptosis aparte de las troponinas tales como la proteína de ácido graso de tipo cardíaco, marcadores de actividad neuroendocrina tales como catecolaminas, aldosterona, angiotensina II y la granina CgA, y marcadores de estrés oxidante tales como mieloperoxidasa.
4. El método de la reivindicación 3, en el que se determinan los niveles de al menos la cromogranina B y de la secretogranina II, o se determinan los niveles de al menos la secretogranina II y de los péptidos natriuréticos, o se determinan los niveles de al menos la cromogranina B, de la secretogranina II y de los péptidos natriuréticos, preferentemente también se miden una o más troponinas específicas cardíacas y/o uno o más marcadores de la respuesta inflamatoria.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho líquido corporal es un líquido circulatorio, orina o saliva.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enfermedad cardíaca se selecciona entre el grupo que consiste en insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca preclínica, síndromes coronarios agudos, enfermedades que implican una hipertrofia de las células del corazón (hipertrofia cardíaca) tales como hipertrofia del ventrículo izquierdo, insuficiencia cardíaca isquémica y cardiomiopatías, enfermedades cardíacas mediadas por el calcio tales como enfermedades cardíacas asociadas con una señalización o una función desregulada o de otro modo disfuncional del Ca^{2+} , isquemia miocárdica aguda, hipertrofia del miocardio, desarrollo de una insuficiencia cardíaca, arritmias y taquicardias tales como TVPC u otras taquicardias ventriculares, y muerte cardíaca súbita, preferentemente dicha enfermedad cardíaca es una insuficiencia cardíaca, una insuficiencia cardíaca isquémica, una cardiomiopatía o una TVPC.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que un aumento en el nivel de $\geq 10\%$ en comparación con un nivel de control es indicativo de una enfermedad cardíaca, o en el que dicho líquido corporal es un líquido circulatorio y en el que un nivel de la secretogranina II, o de un fragmento de la misma, de al menos 0,145 nmol/l es indicativo de una enfermedad cardíaca, o en el que dicho líquido corporal es la saliva y en el que un nivel de la secretogranina II, o de un fragmento de la misma, de al menos 0,040 nmol/l es indicativo de una enfermedad cardíaca.
8. Un método *in vitro* para la determinación de la gravedad clínica de la enfermedad cardíaca o un método para el pronóstico de la enfermedad cardíaca en un sujeto, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.
9. El método de la reivindicación 8, en el que las características de dicho método son según se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
10. El método de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, en el que dicho líquido corporal es un líquido circulatorio y en el que un nivel de la secretogranina II, o de un fragmento de la misma, de al menos 0,180 nmol/l es indicativo de una enfermedad grave o de un mal pronóstico.
11. Una entidad que tiene la capacidad de unirse a la secretogranina II o a fragmentos de la misma, para su uso en el diagnóstico *in vivo* de una enfermedad cardíaca en un sujeto que tiene una enfermedad cardíaca o que potencialmente tiene una enfermedad cardíaca, que comprende la administración de una cantidad apropiada de una

entidad que tiene la capacidad de unirse a la secretogranina II o a fragmentos de la misma, al sujeto y la detección mediante imagen de la presencia y/o de la cantidad y/o de la ubicación de dicha entidad en el sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

12. Un método para ensayar el potencial terapéutico de una sustancia para el tratamiento de una enfermedad cardíaca, que comprende la administración de la sustancia de prueba a un animal de experimentación no humano que padece una enfermedad cardíaca y la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en dicho animal, preferentemente una disminución o una reducción en los niveles de la secretogranina II es indicativa de que la sustancia de prueba tiene un potencial terapéutico, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

13. Un método *in vitro* para la identificación de un eje fisiopatológico activado en un sujeto con una enfermedad cardíaca, para la identificación de un sujeto con una enfermedad cardíaca que requiere una monitorización más intensa, o para la identificación de un sujeto con una enfermedad cardíaca que podría beneficiarse de una intervención terapéutica temprana, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

14. El método de la reivindicación 13, en el que las características de dicho método son según se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o en la reivindicación 10.

15. Un método *in vitro* para la monitorización del progreso o de la gravedad de una enfermedad cardíaca, para la evaluación de la eficacia de la terapia de una enfermedad cardíaca, para la monitorización del progreso de la terapia de una enfermedad cardíaca o para la monitorización de un individuo sano, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en un líquido corporal de dicho sujeto, preferentemente en el que un aumento en el nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma, es indicativo de progresión o de aumento en la gravedad de la enfermedad cardíaca o signos tempranos del desarrollo de una enfermedad cardíaca, o en el que una disminución en el nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma, es indicativa de una mejora o de una reducción en la progresión, en el que dichos fragmentos de la secretogranina II son secretoneurina (SN), o fragmentos que contienen el epítipo de la secretogranina II correspondiente a los restos de aminoácidos 154-165 o 172-186 de la secretogranina II.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma, en dicho sujeto se compara con un nivel de control y/o se realizan determinaciones sucesivas del nivel de la secretogranina II, o de fragmentos de la misma, y/o las características de dicho método son según se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 o en la reivindicación 10.

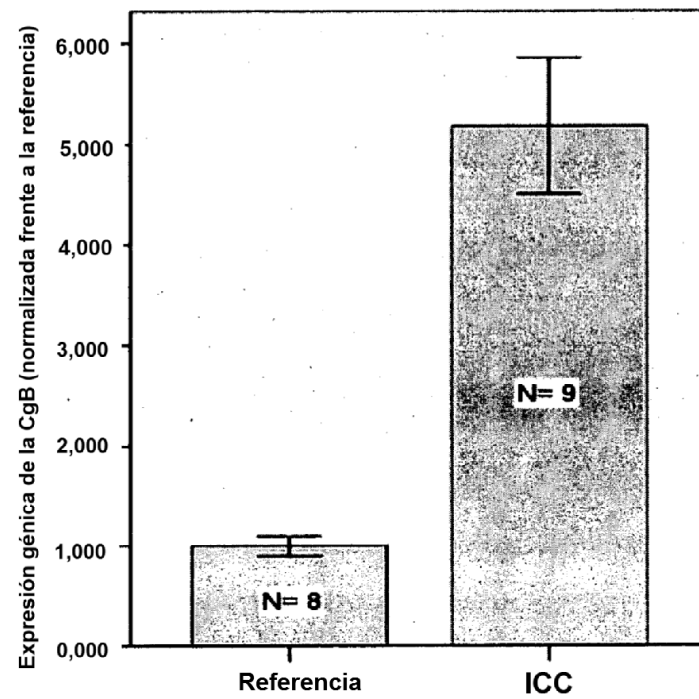


Figura 1

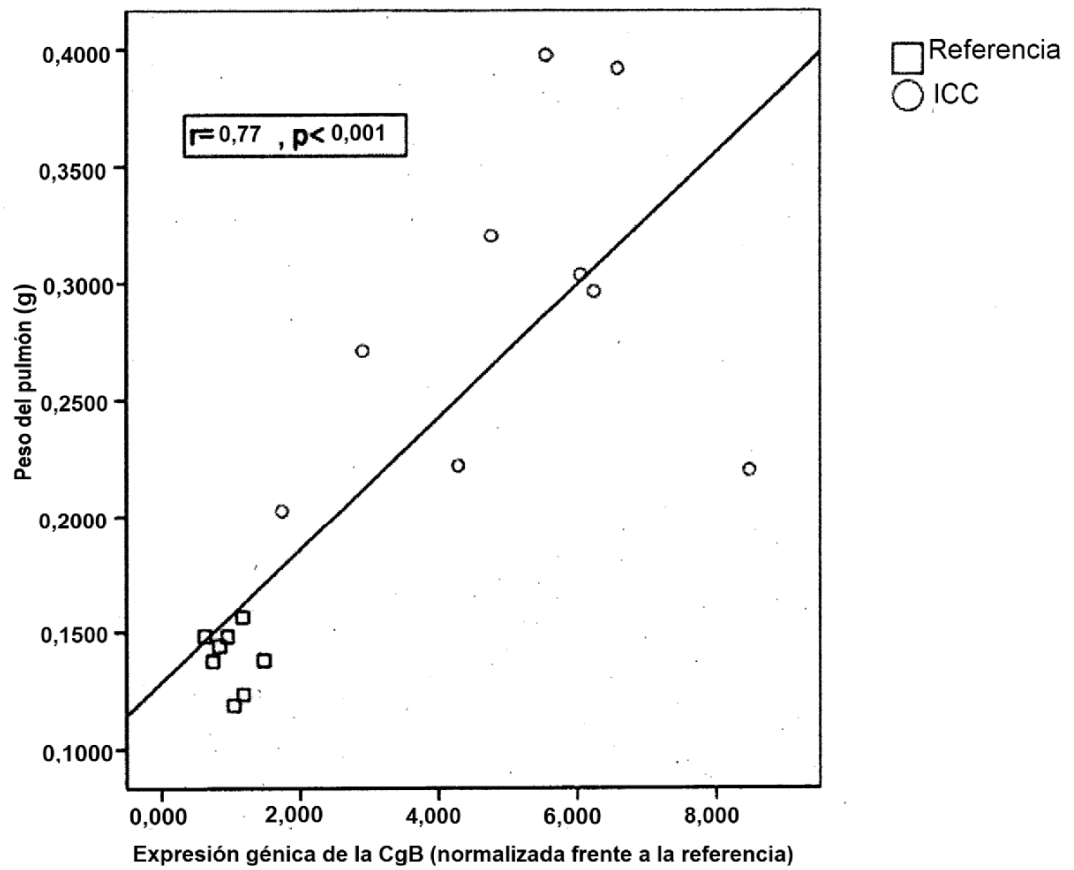


Figura 2A

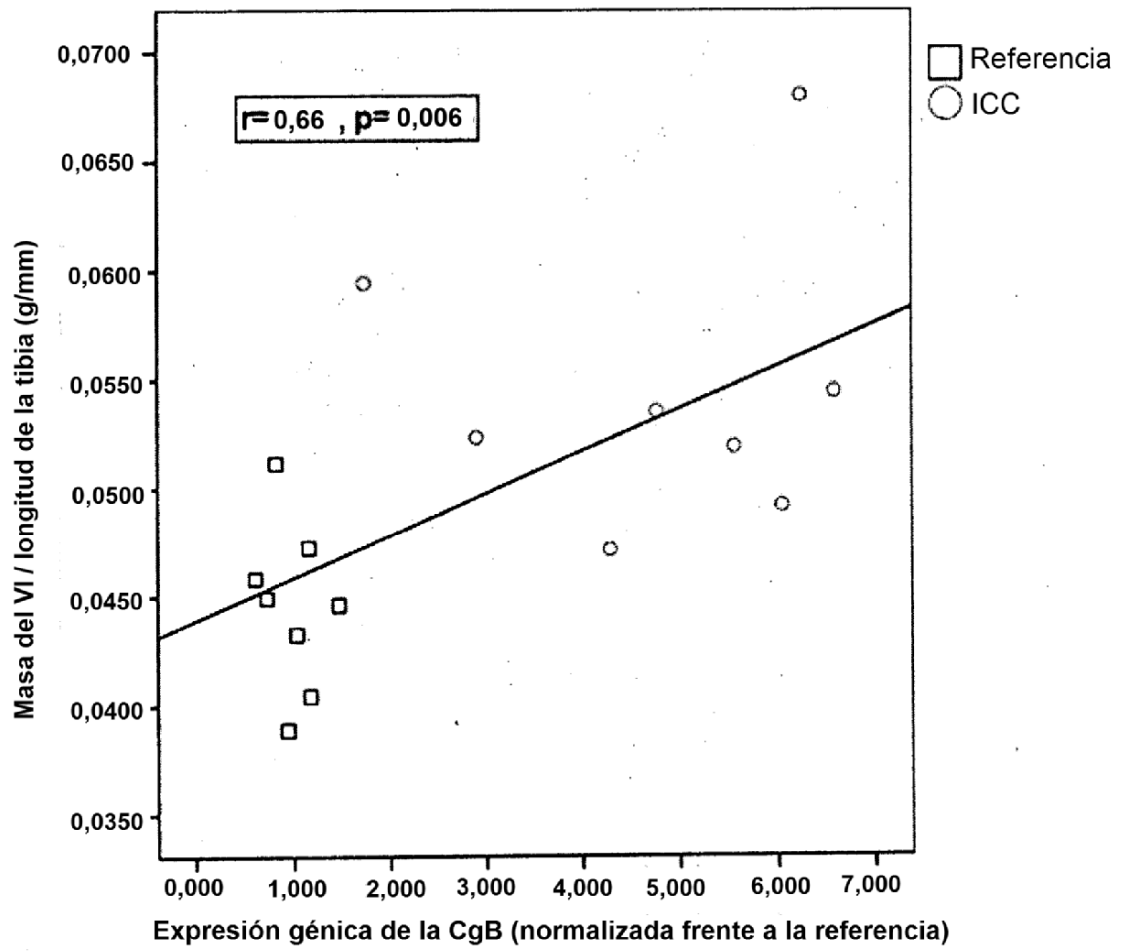


Figura 2B

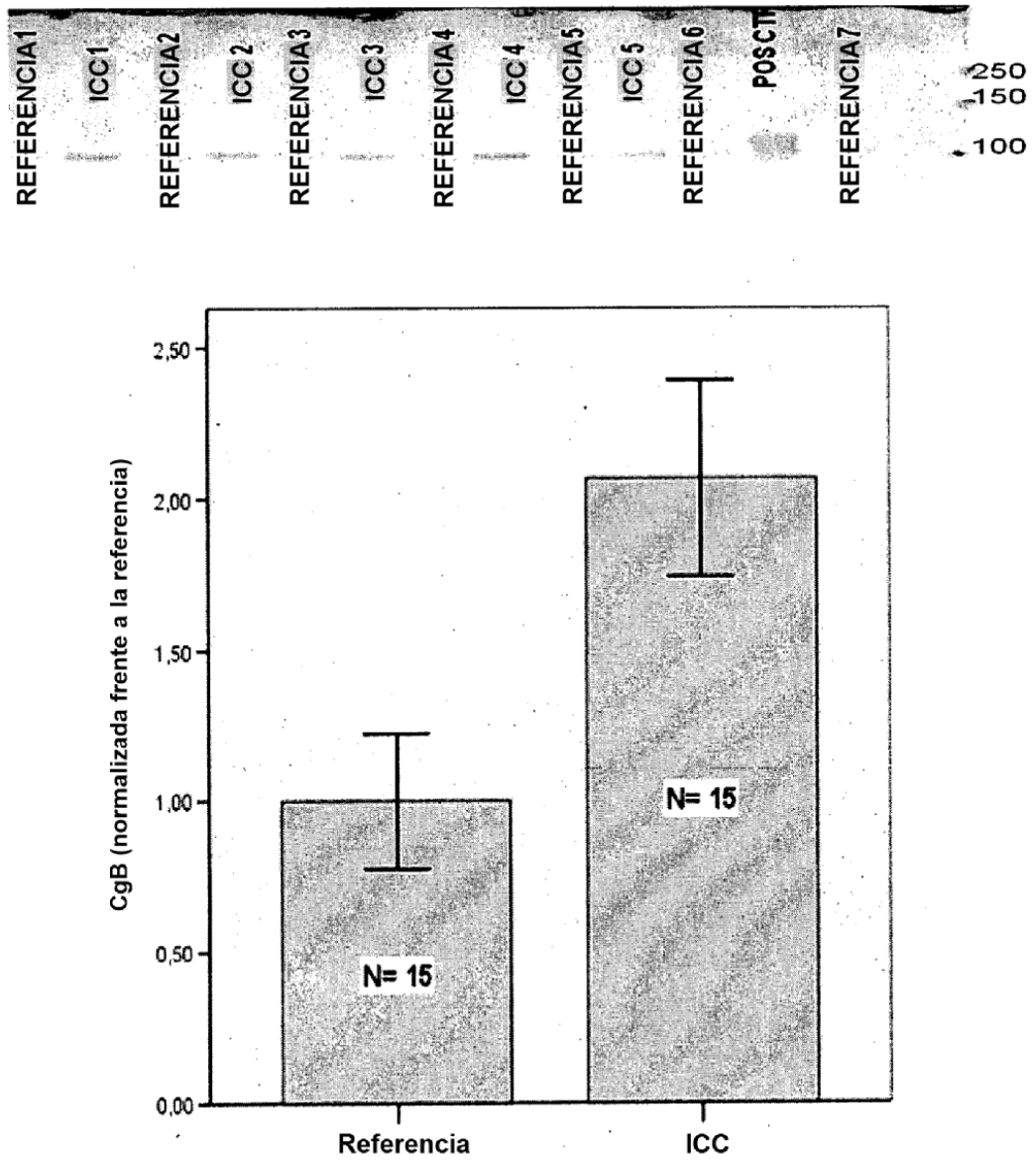


Figura 3

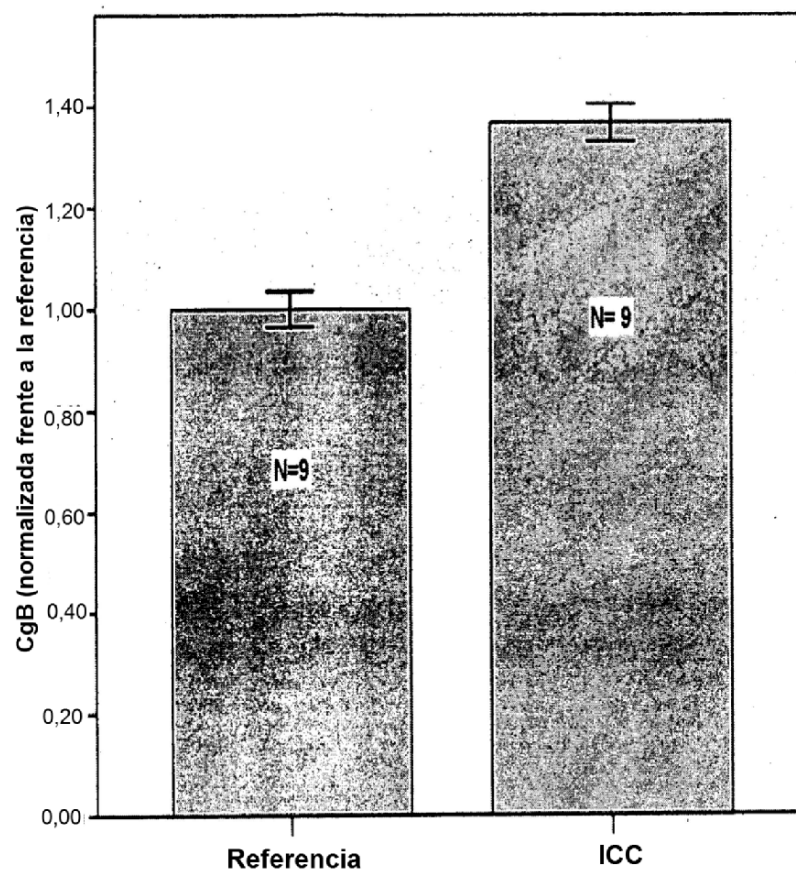


Figura 4

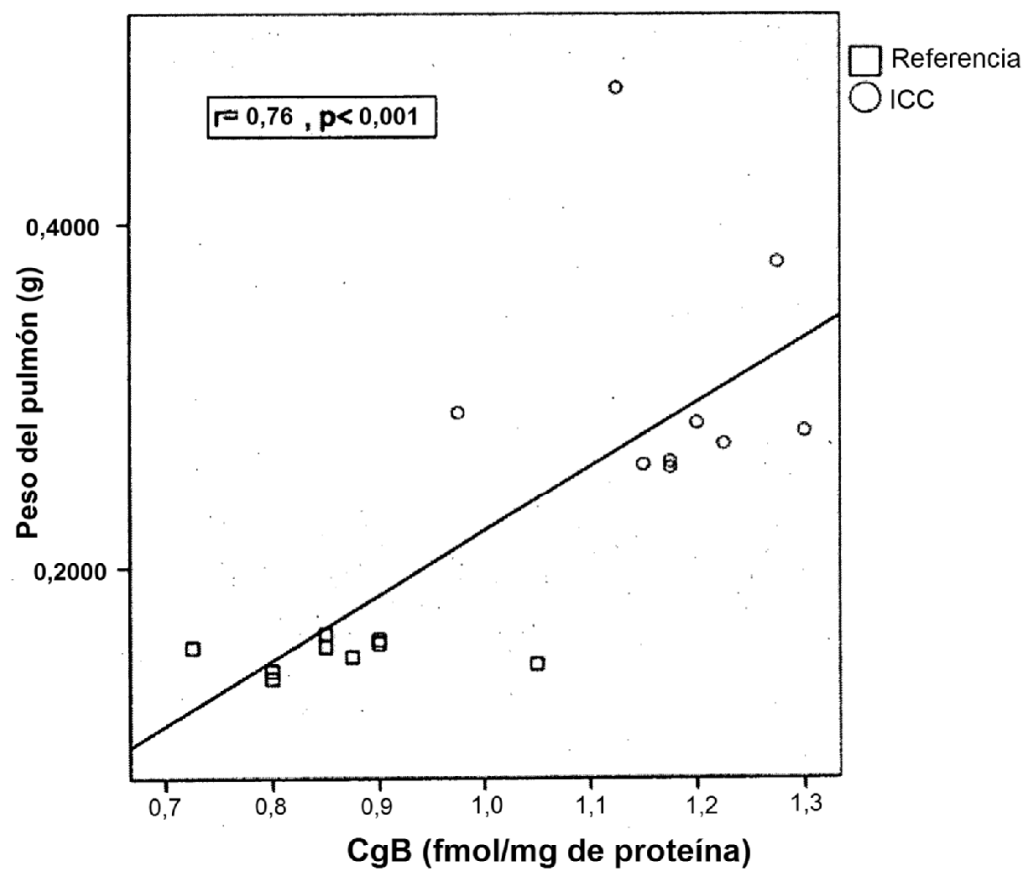


Figura 5A

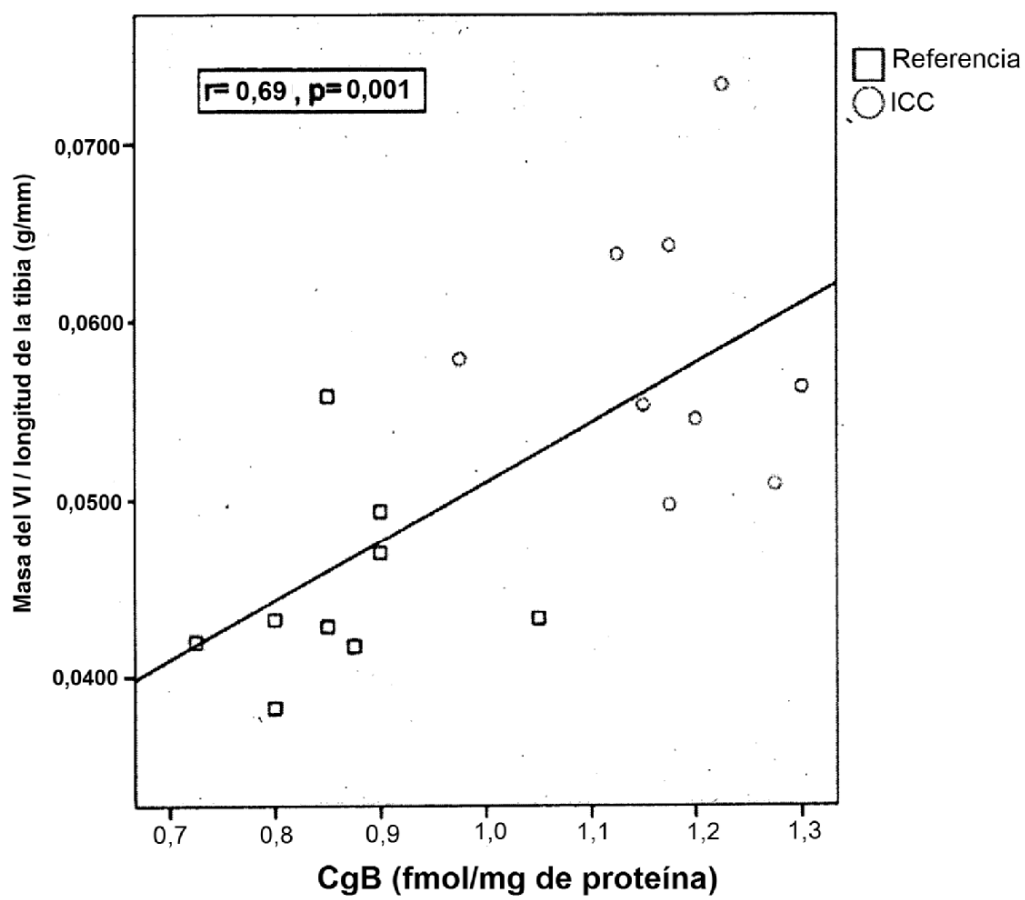


Figura 5B

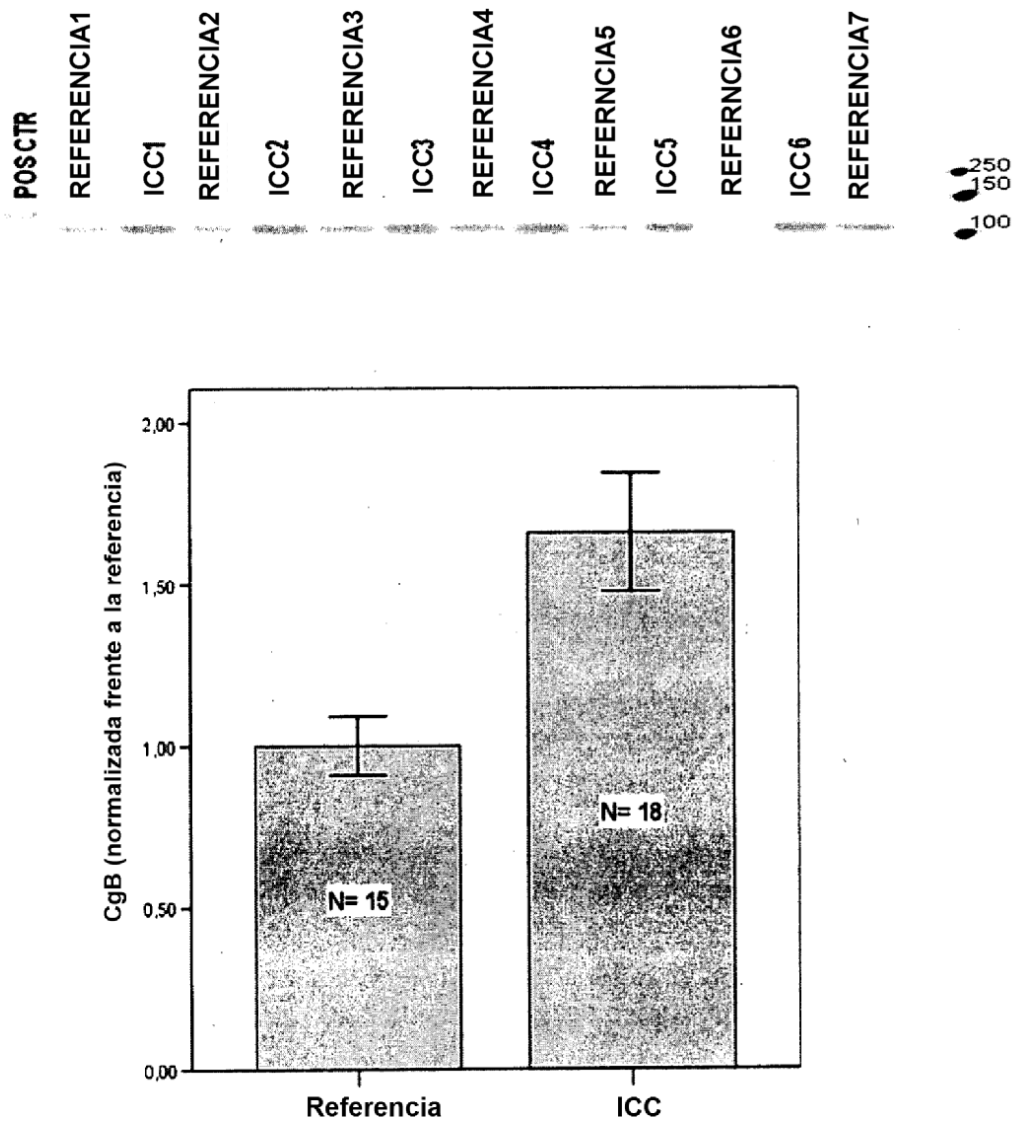


Figura 6

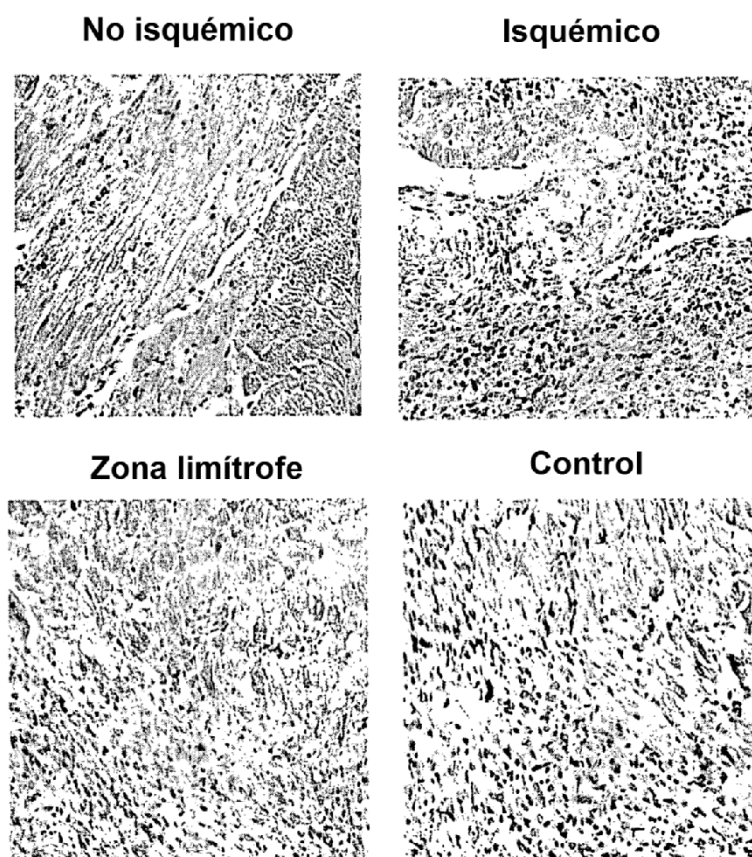


Figura 7

Figura 8A

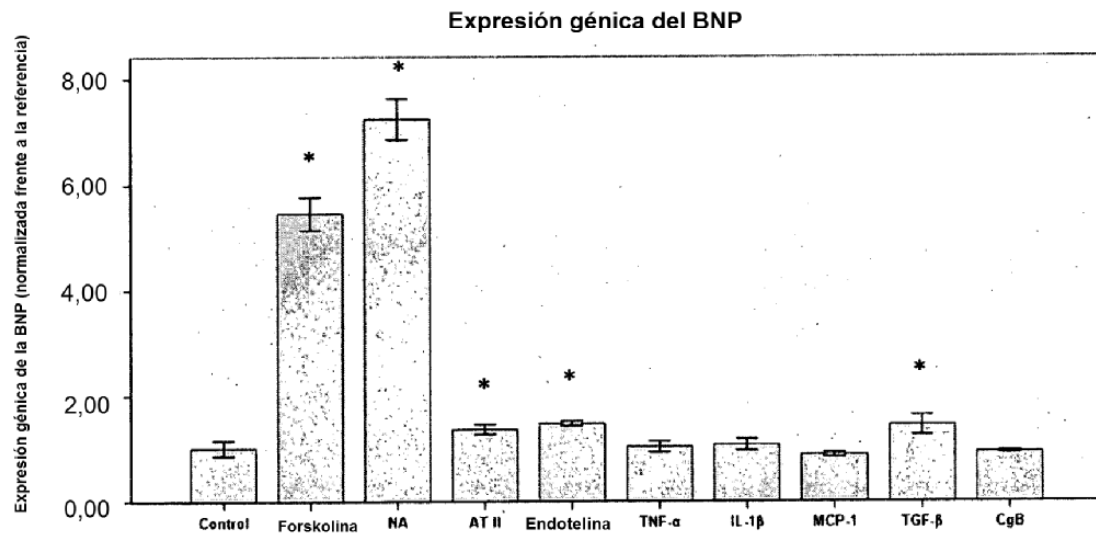
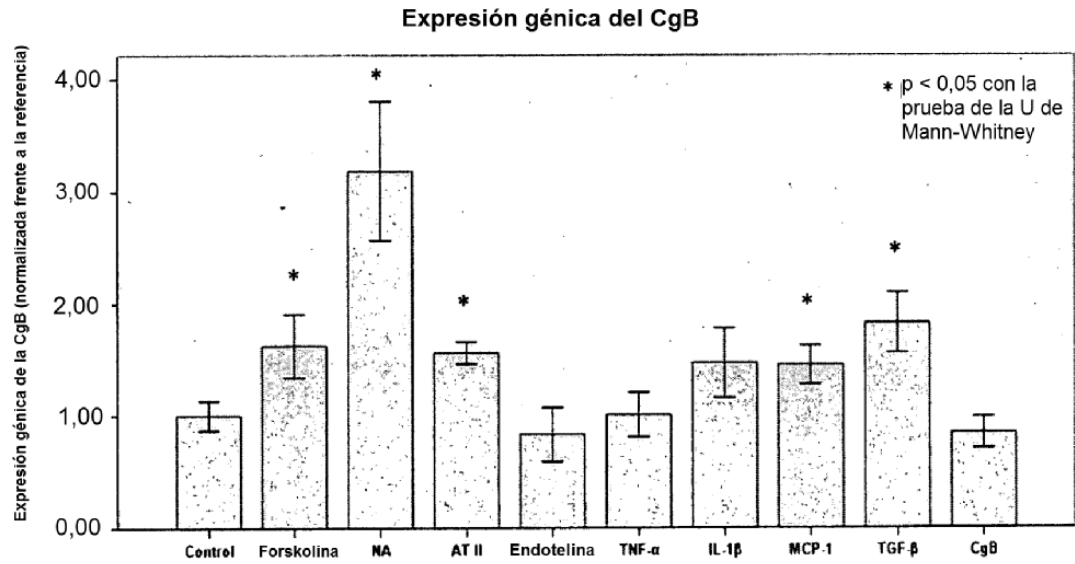


Figura 8B

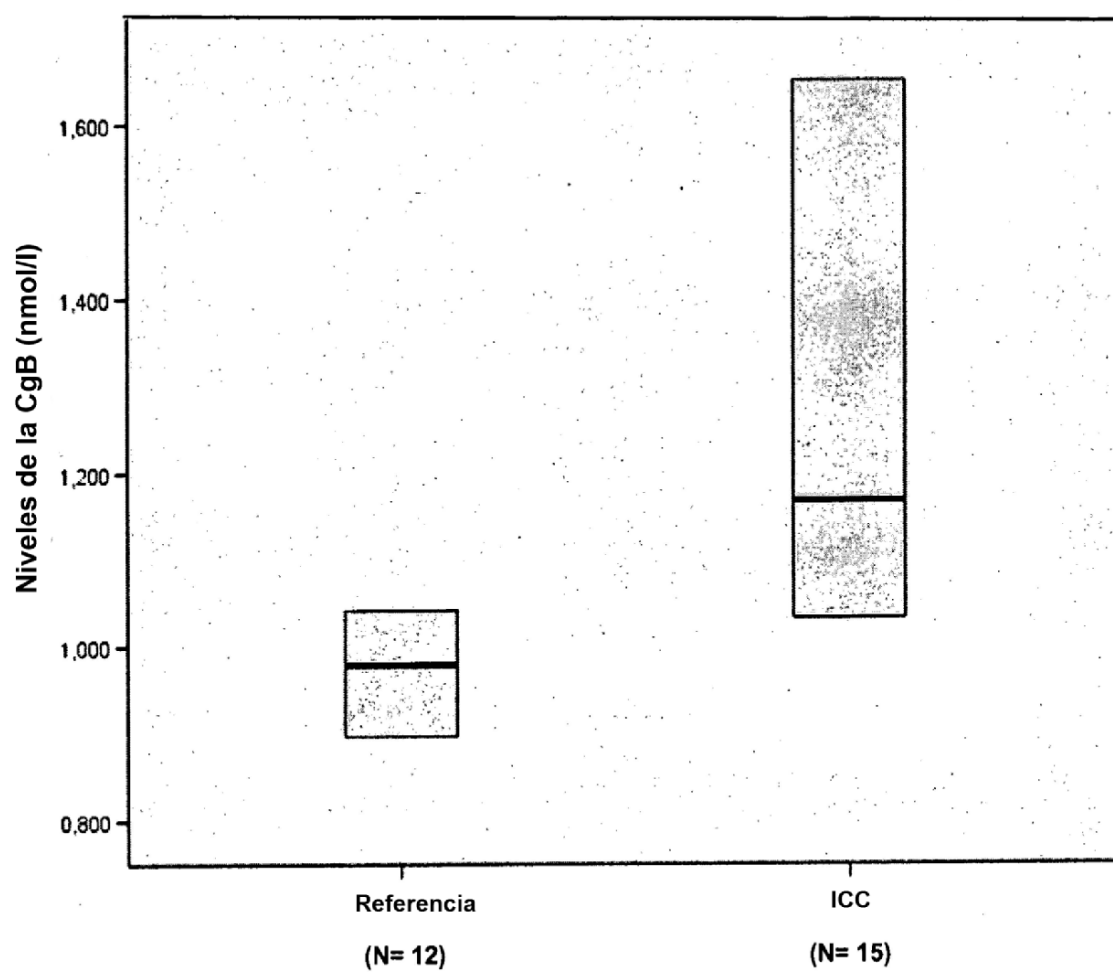


Figura 9

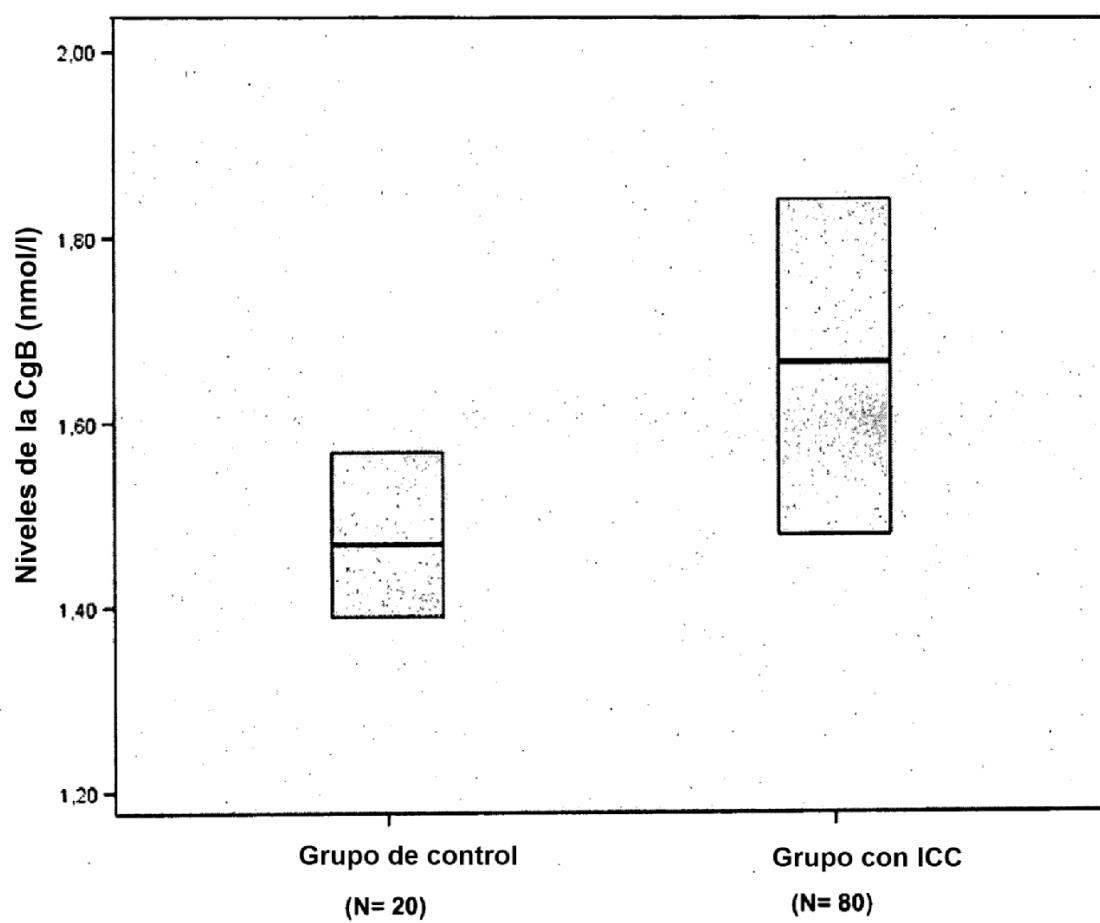


Figura 10A

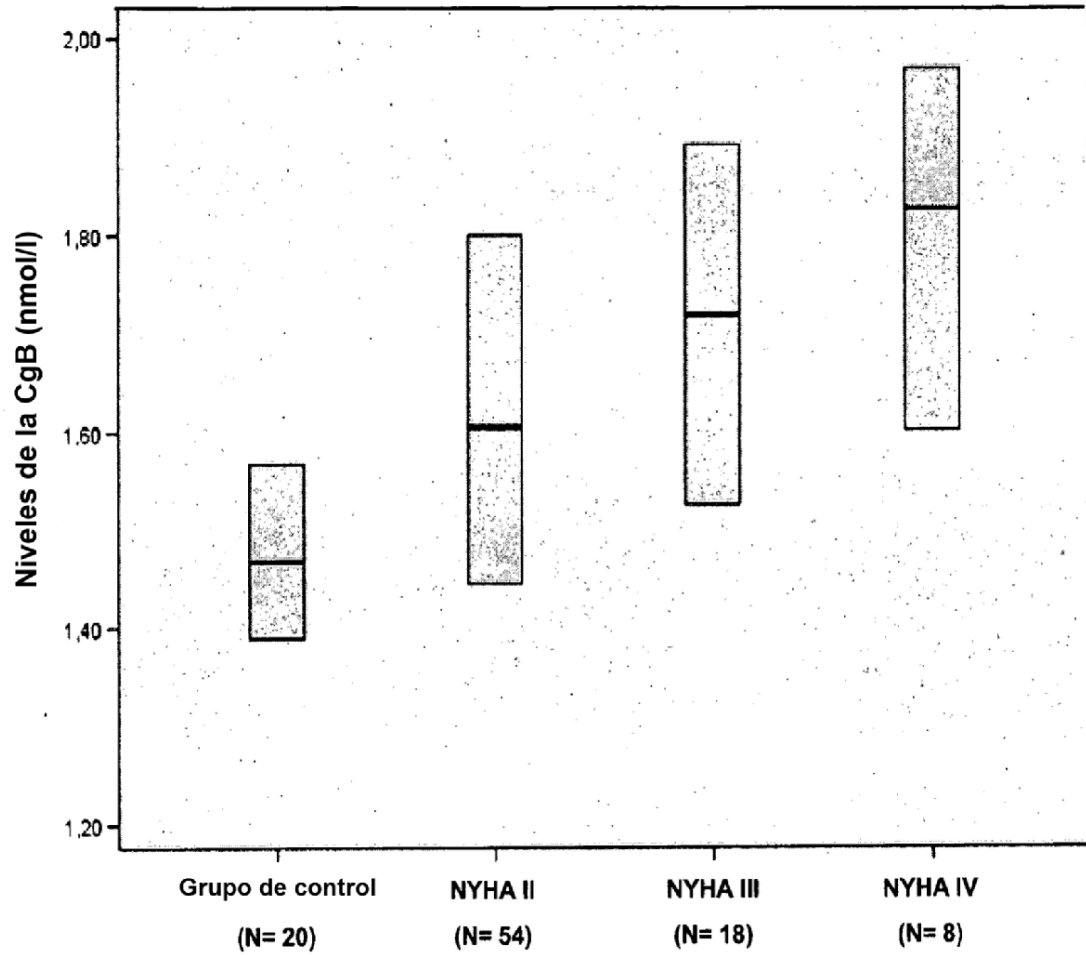


Figura 10B

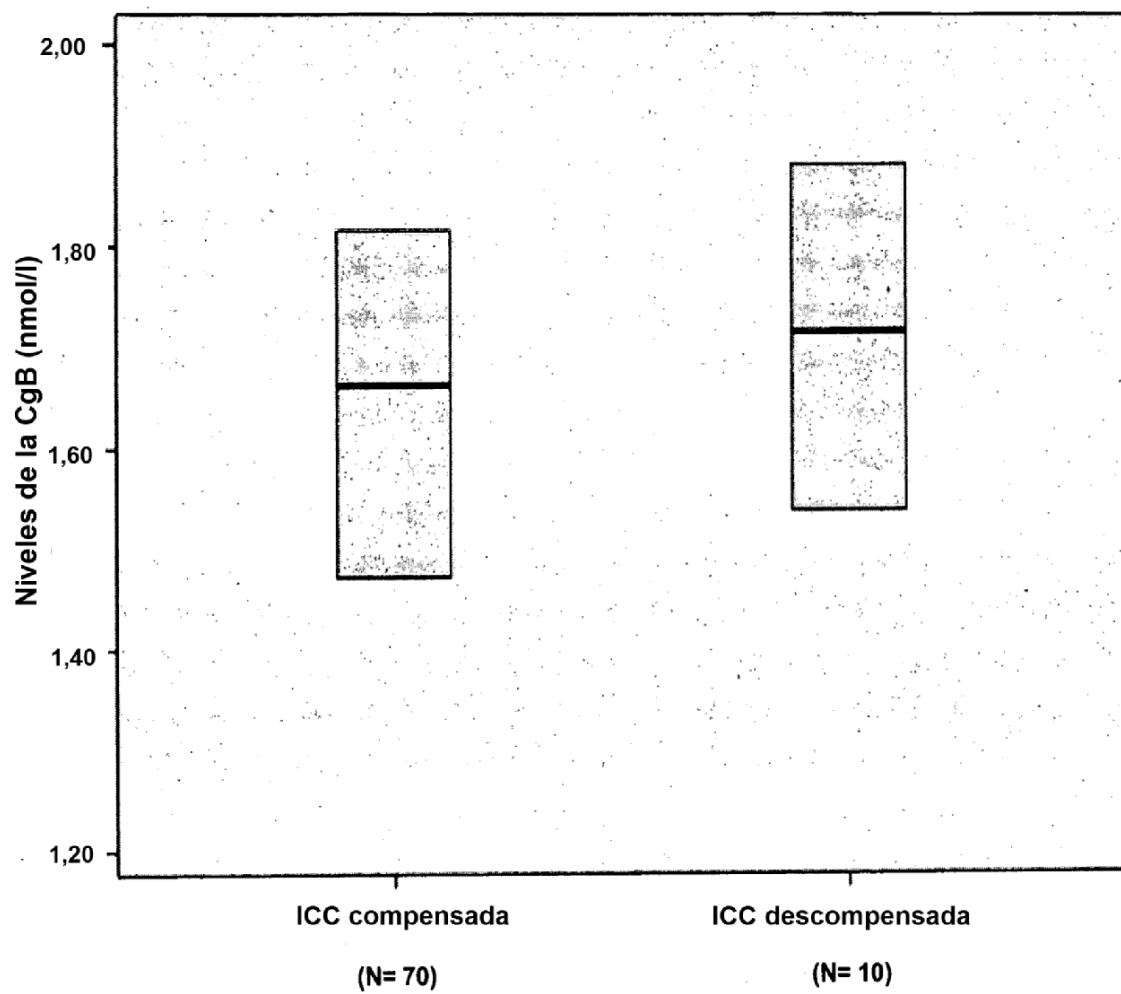


Figura 11

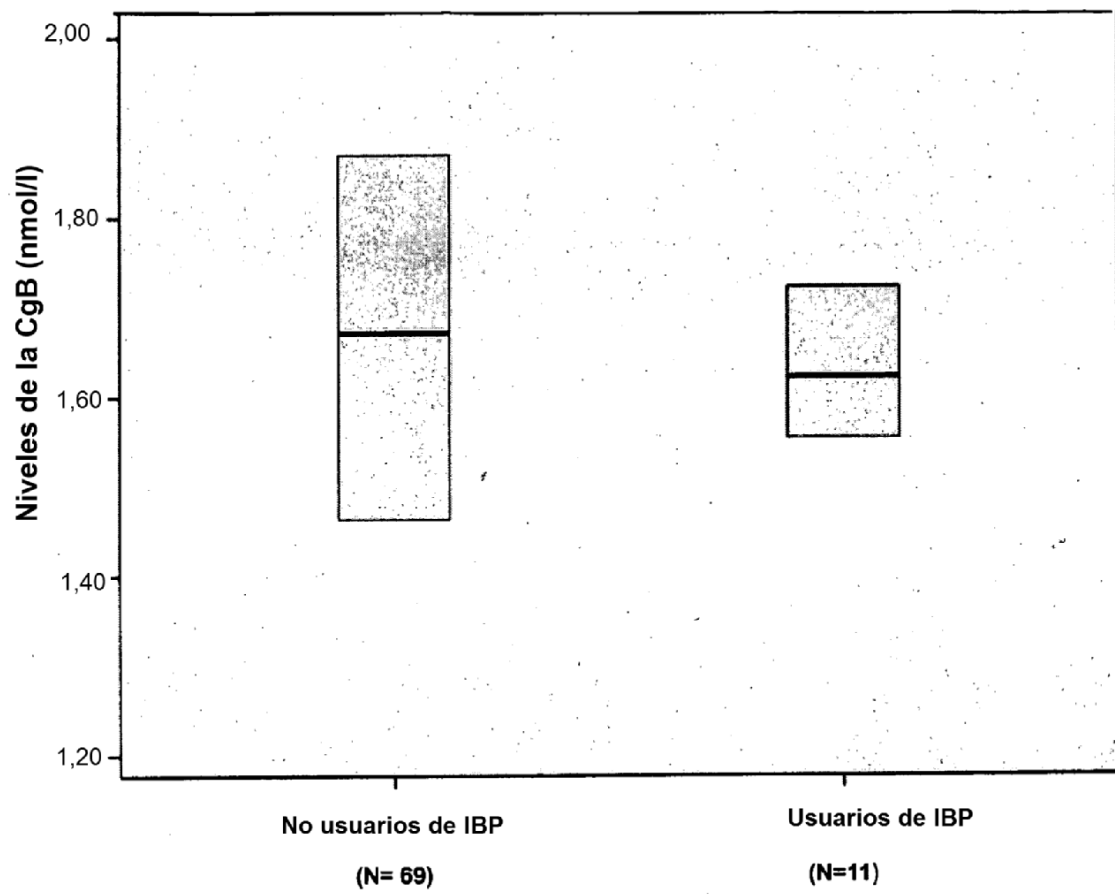


Figura 12A

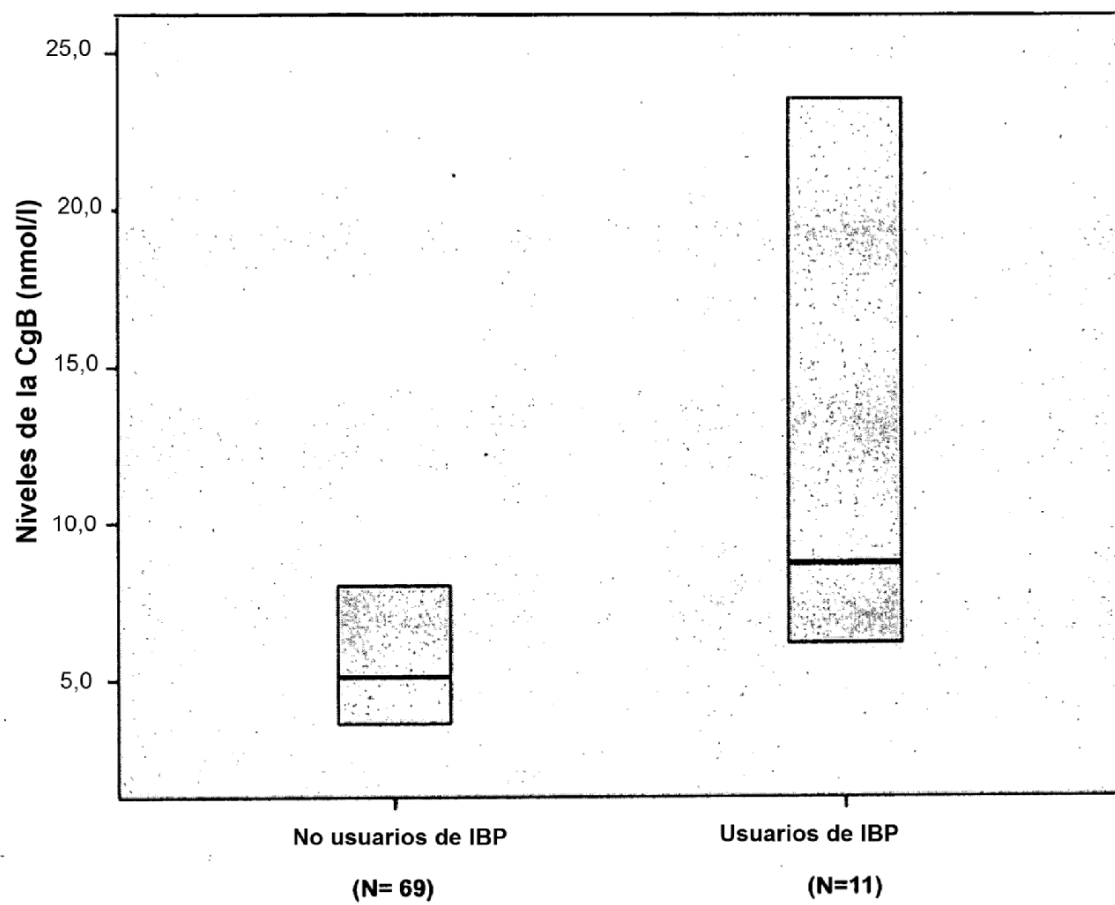


Figura 12B

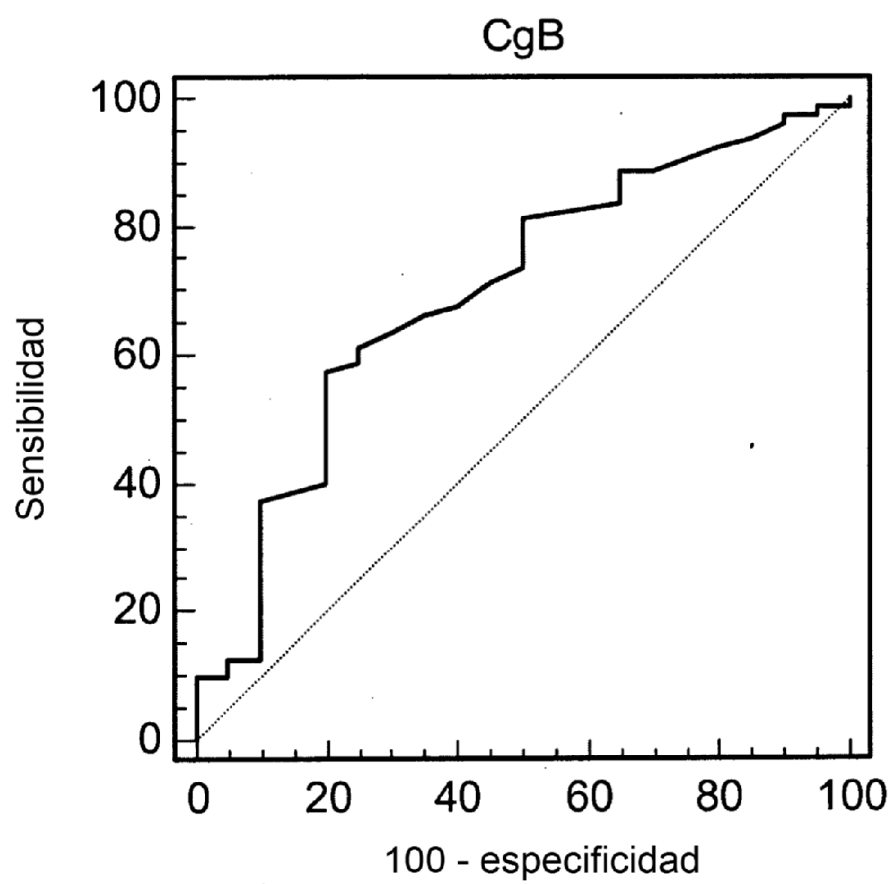


Figura 13

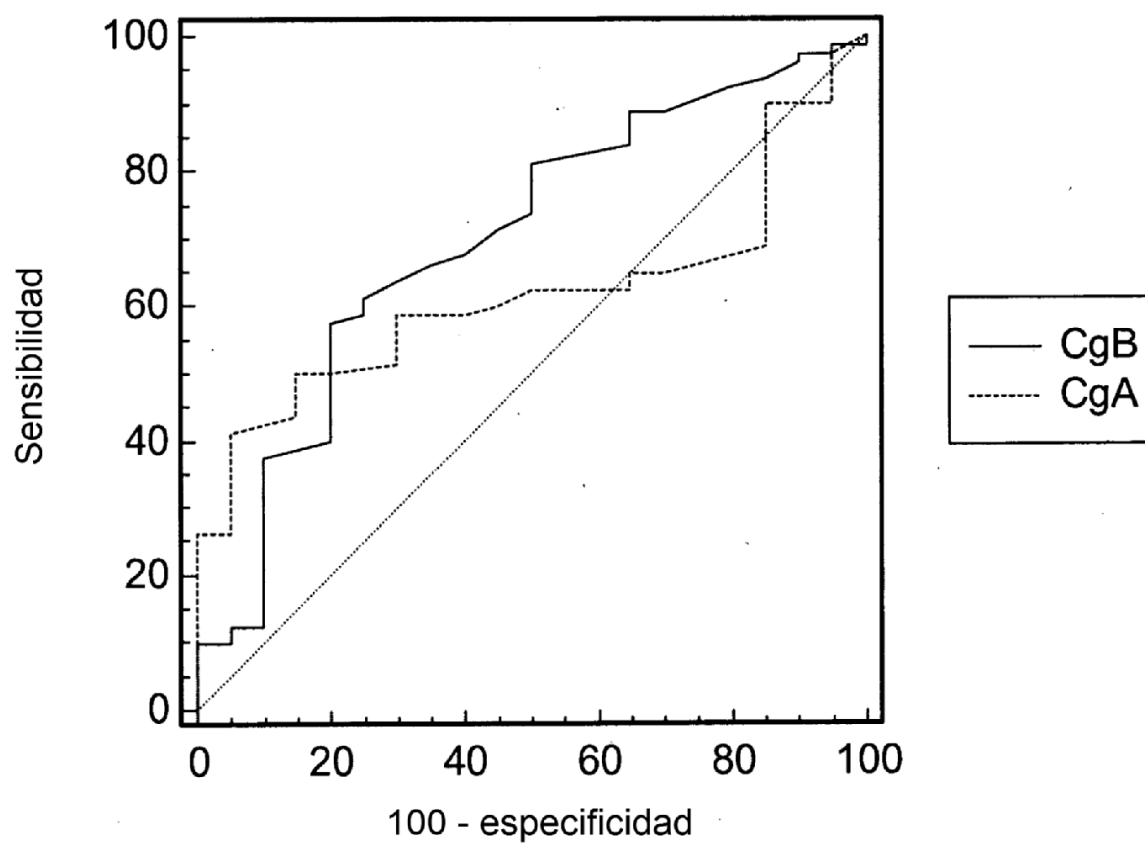


Figura 14

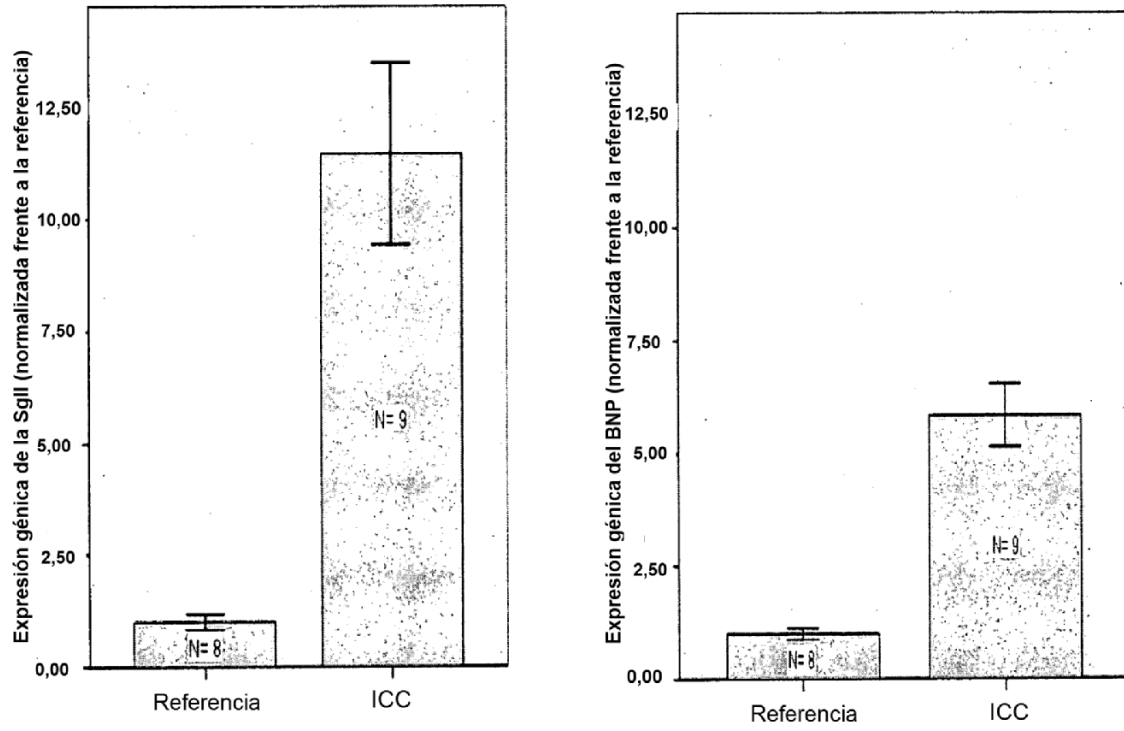


Figura 15

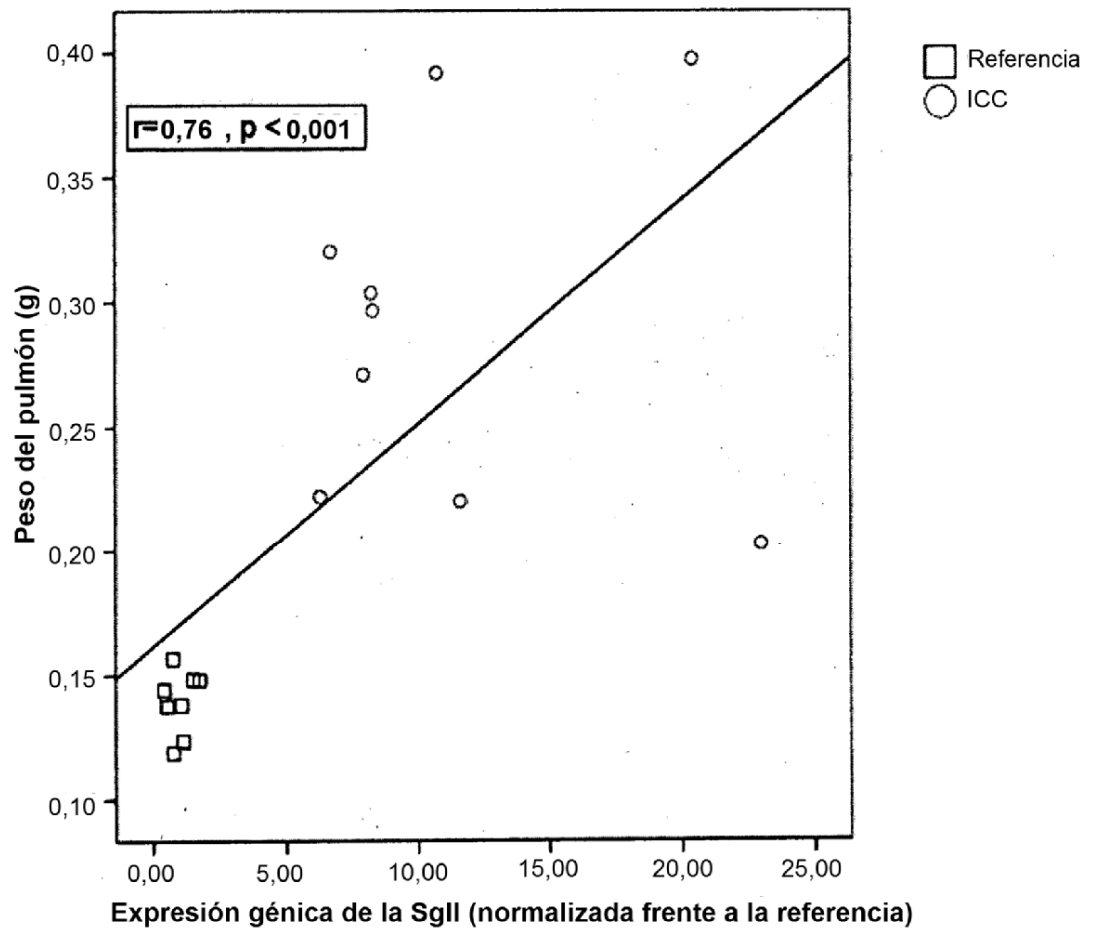


Figura 16A

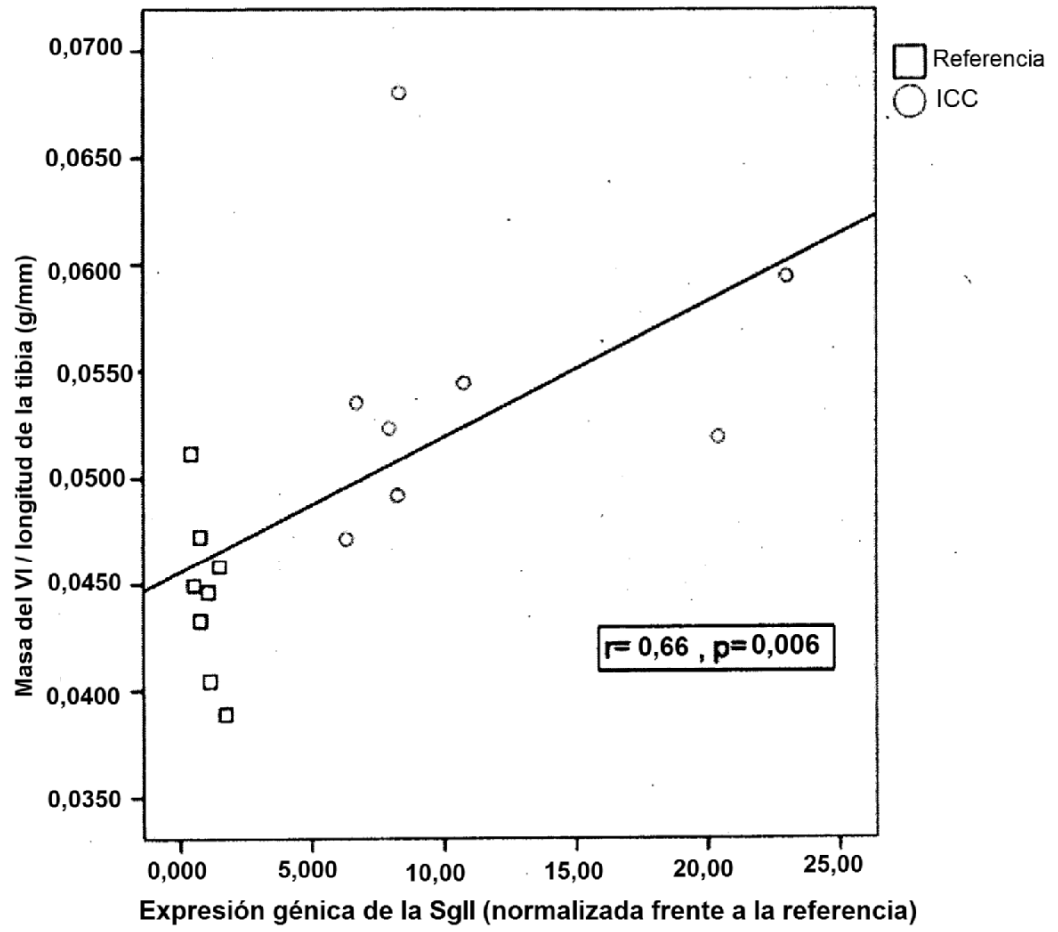


Figura 16B

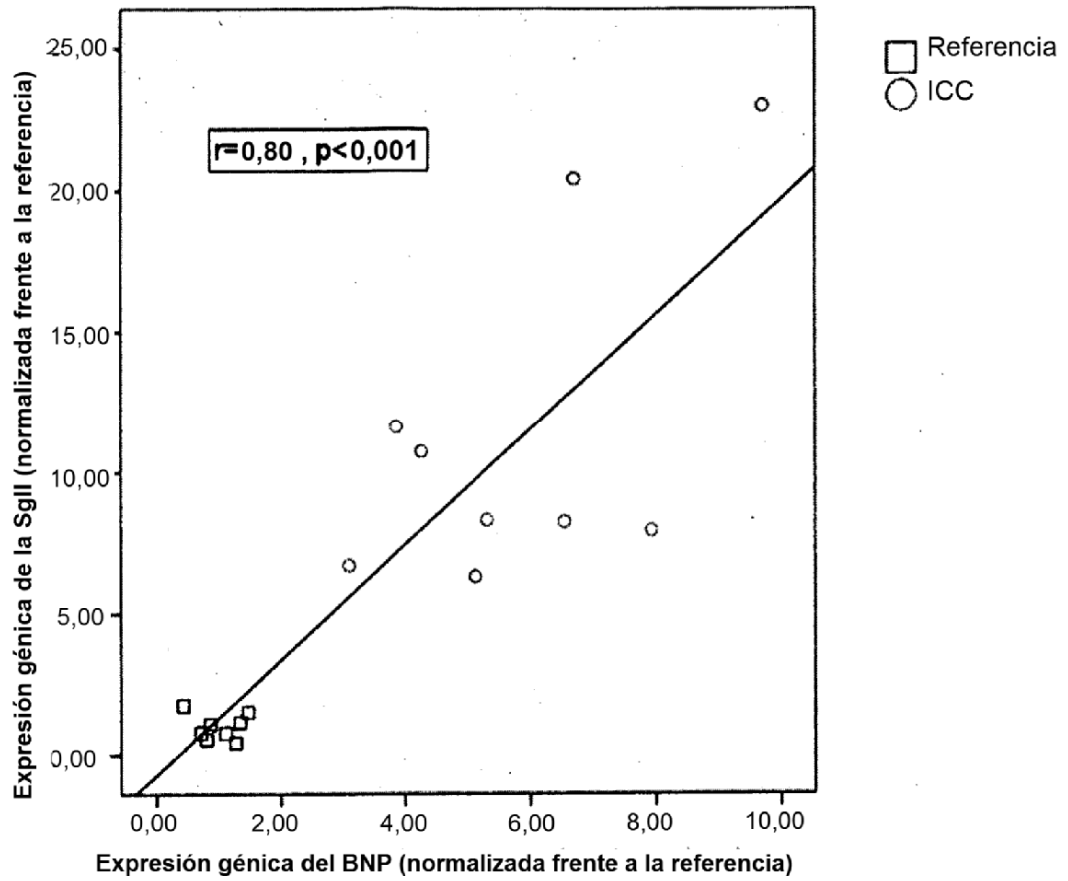


Figura 17A

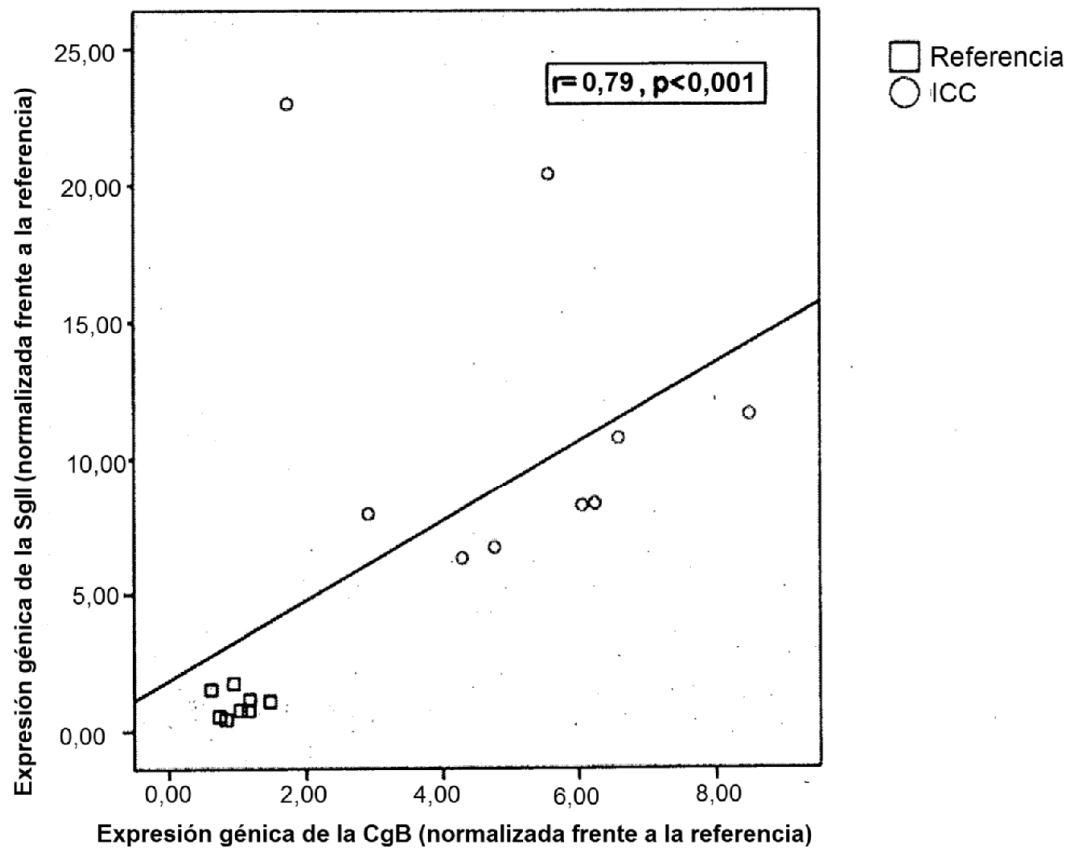


Figura 17B

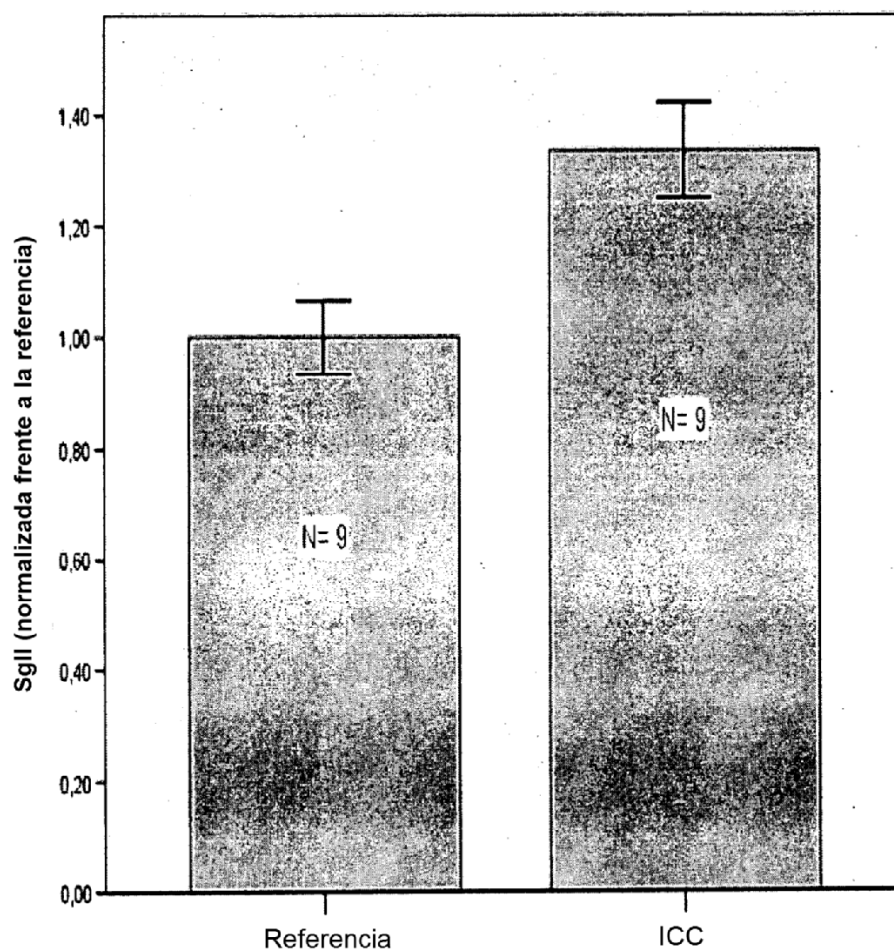


Figura 18

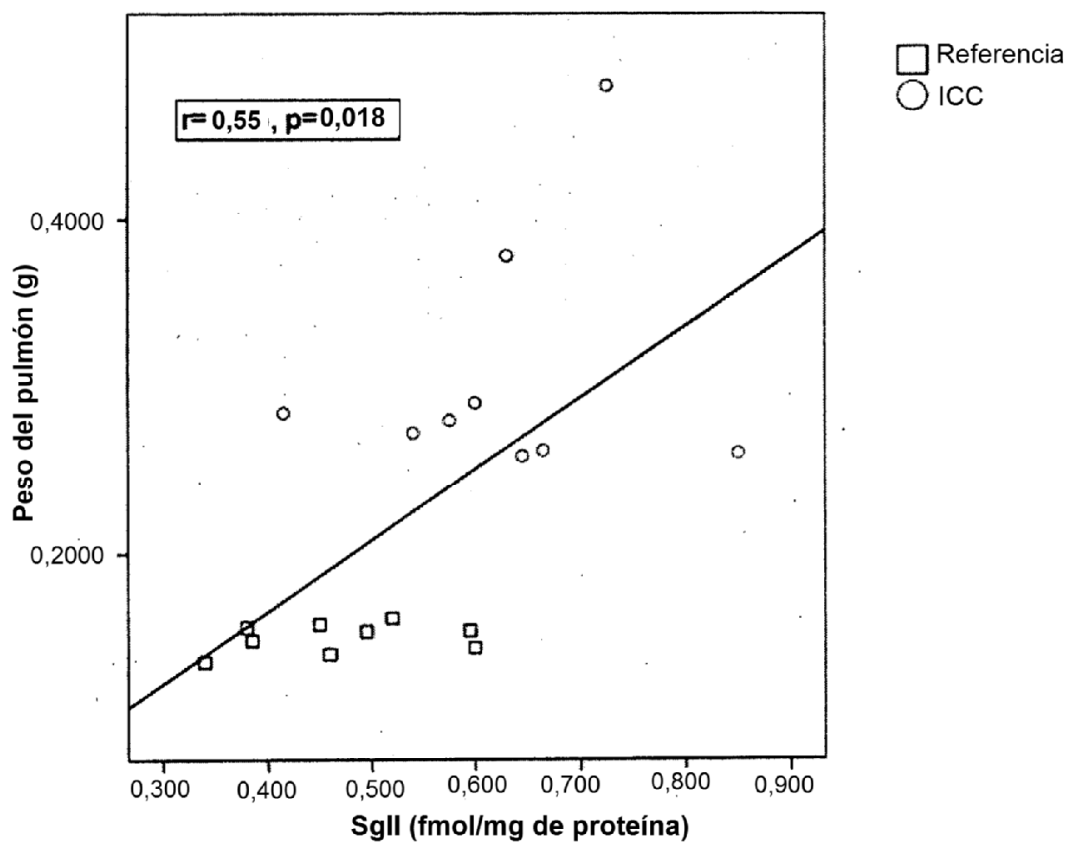


Figura 19A

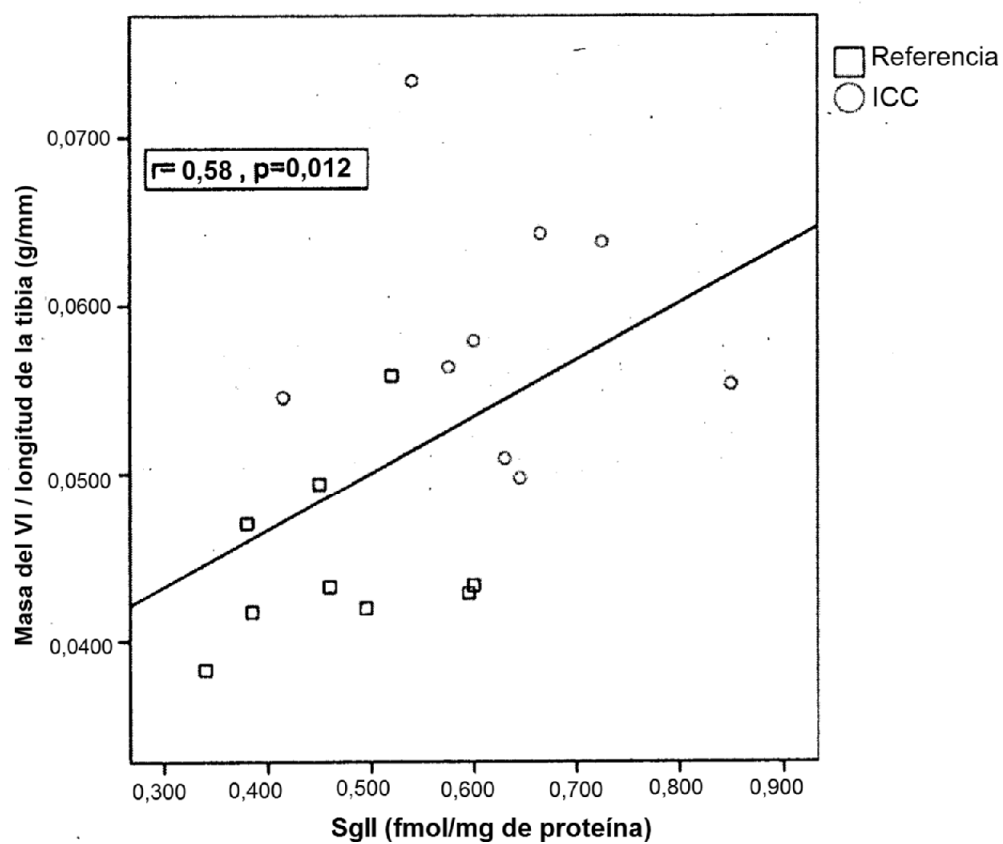


Figura 19B

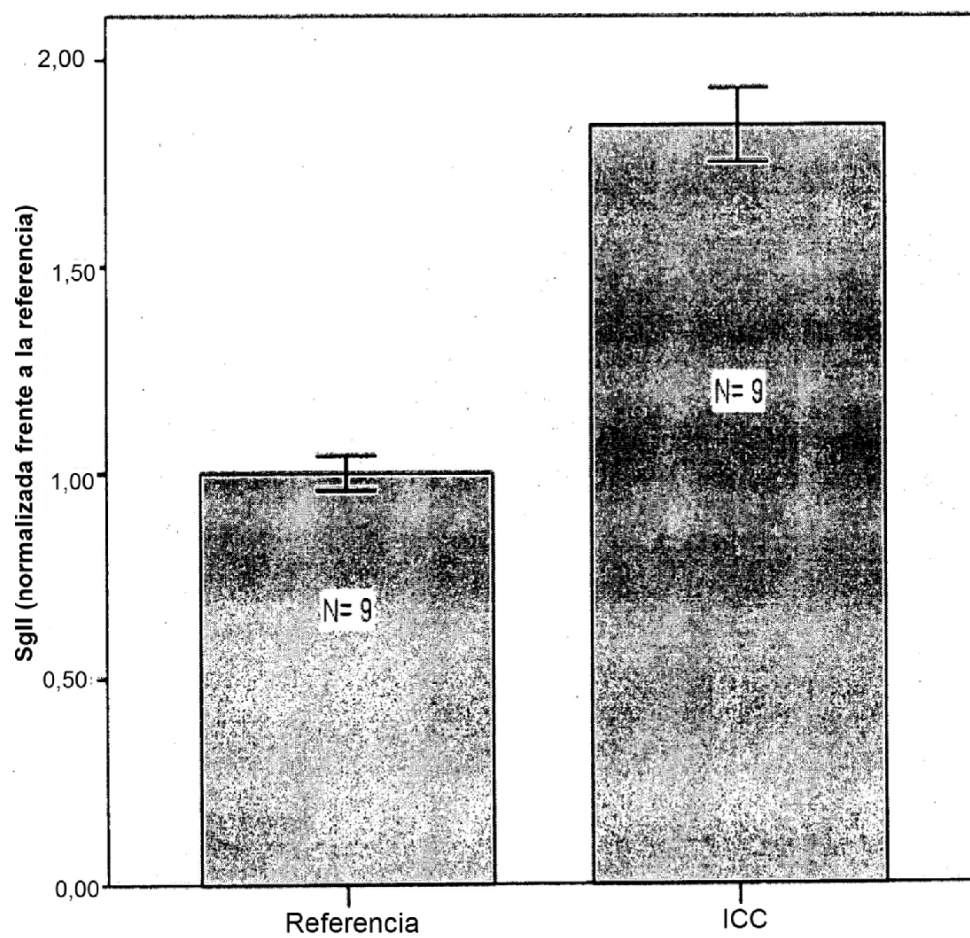


Figura 20

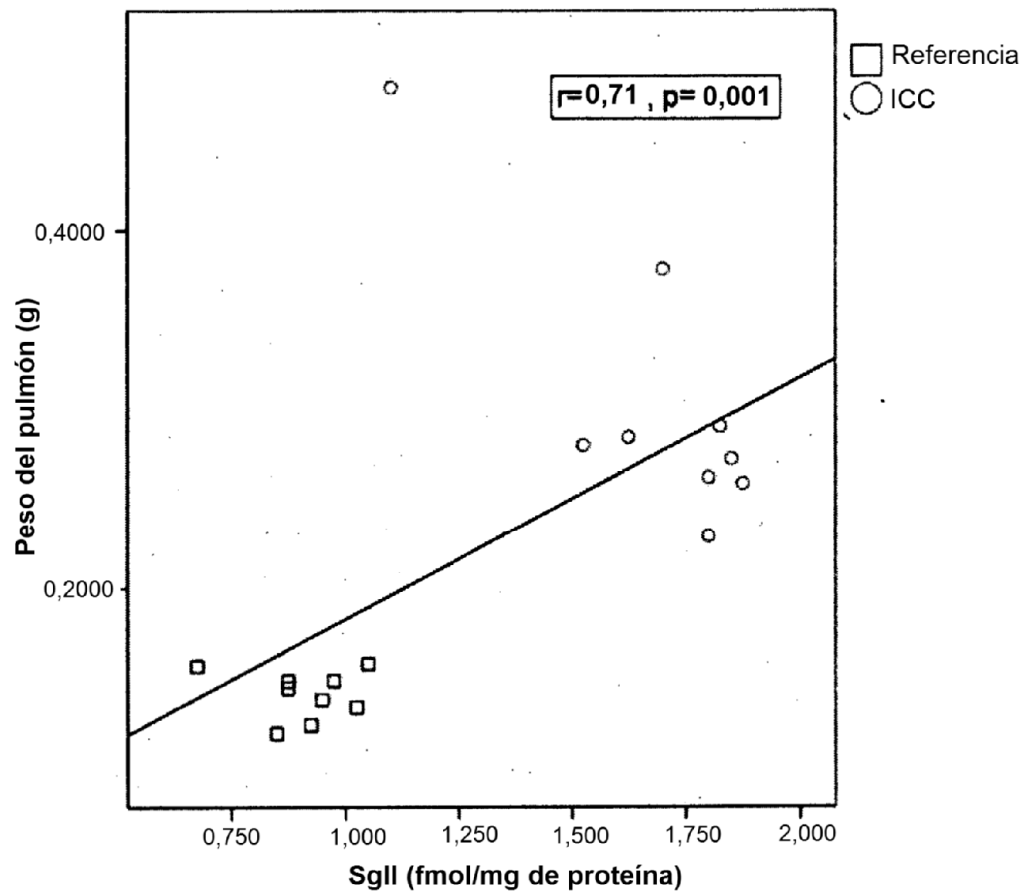


Figura 21A

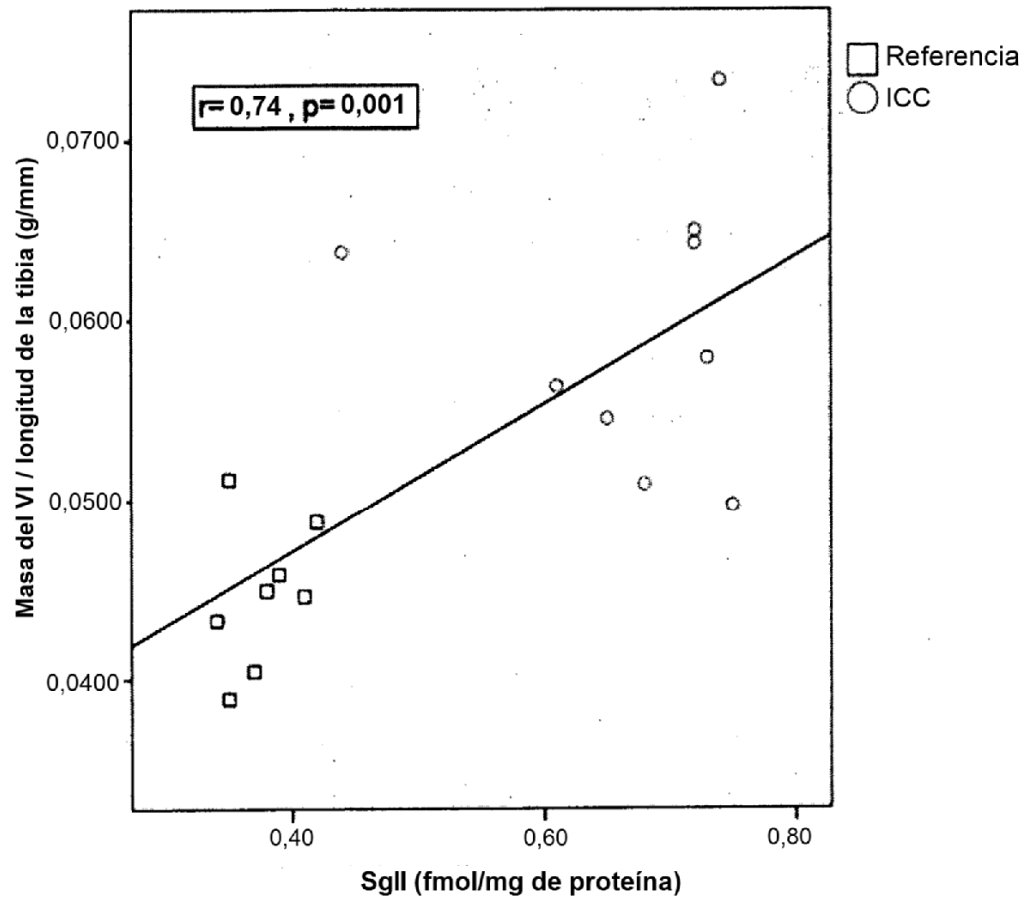


Figura 21B

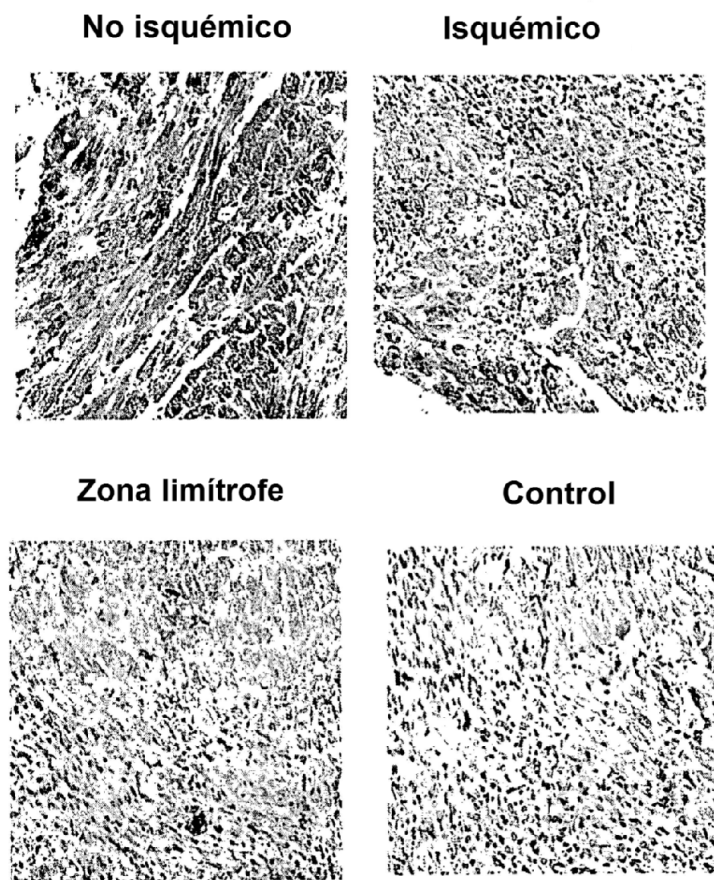
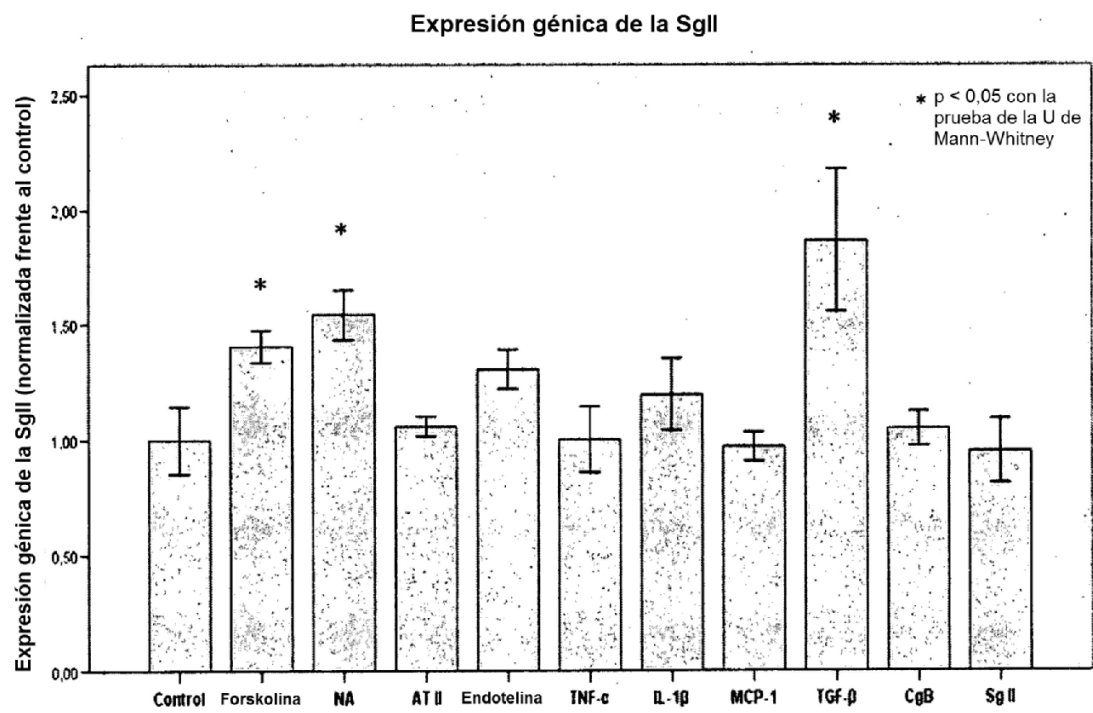


Figura 22

Figura 23



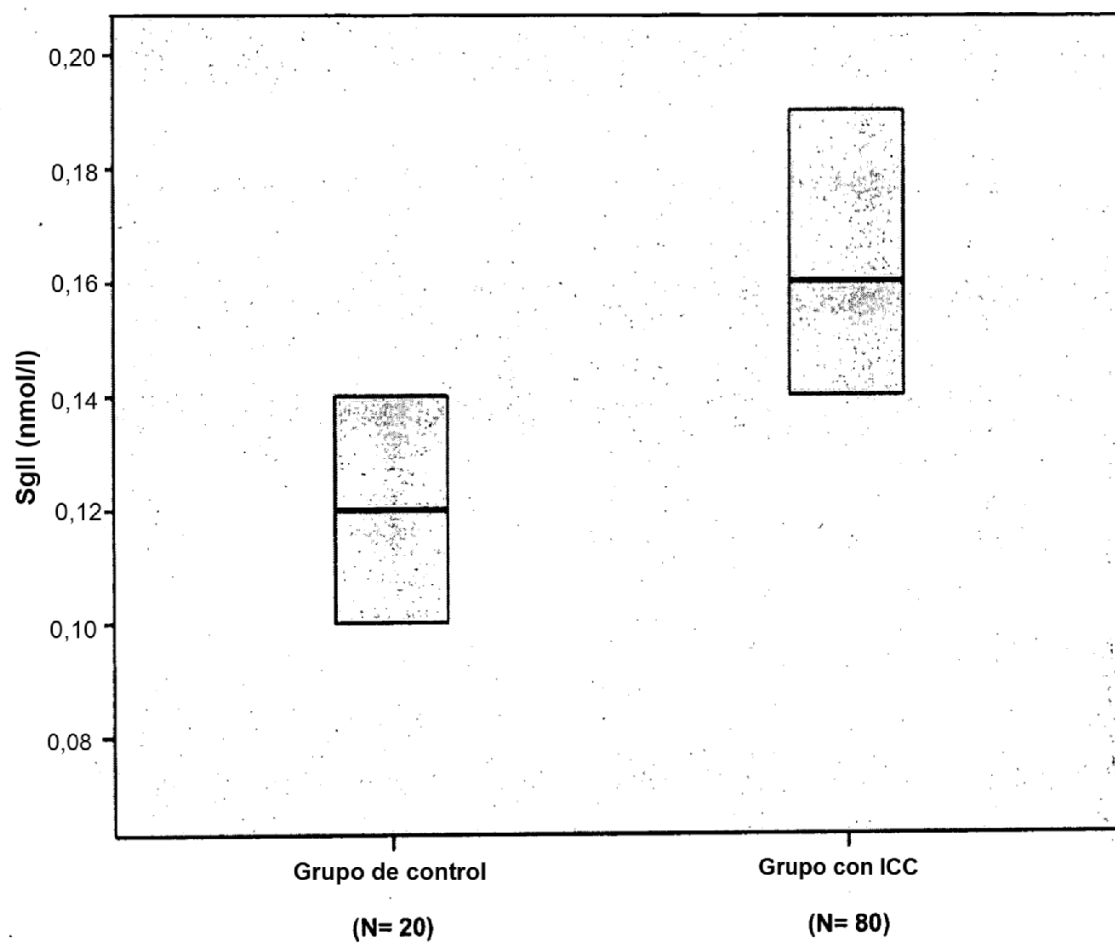


Figura 24A

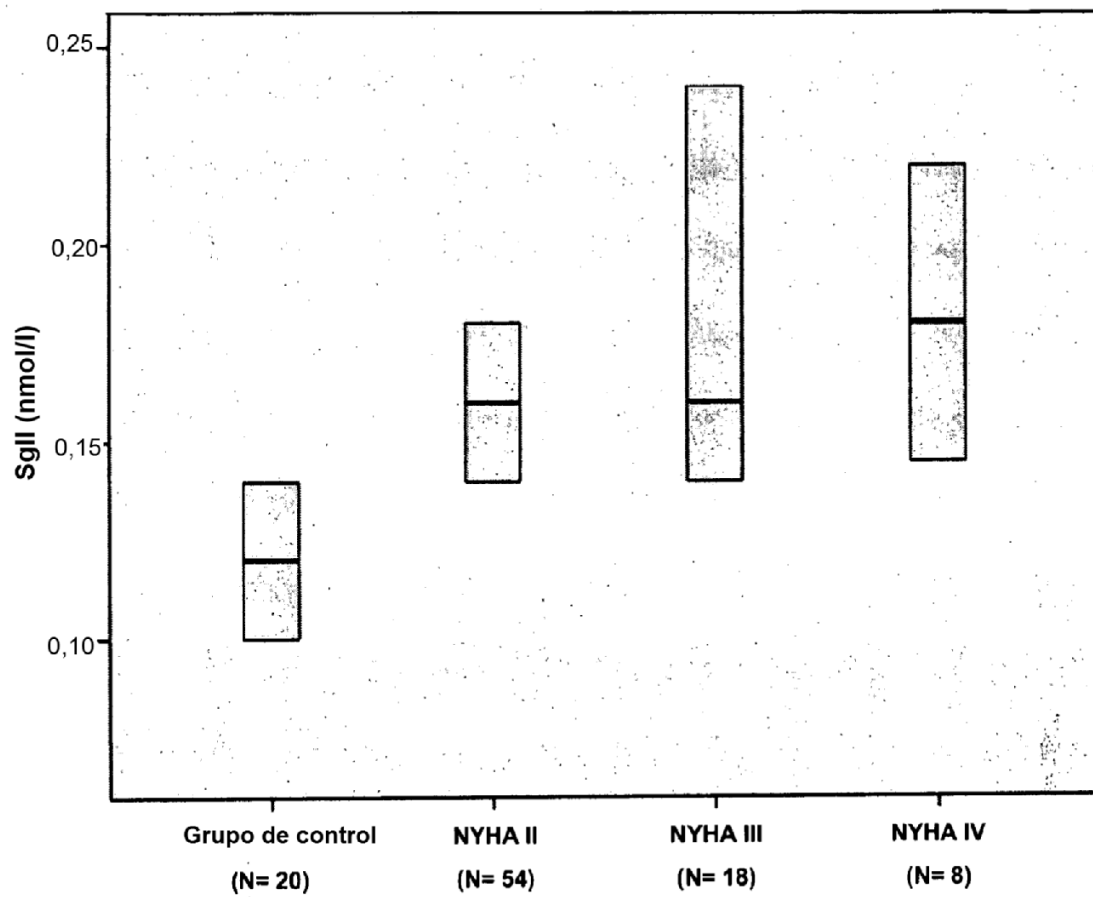


Figura 24B

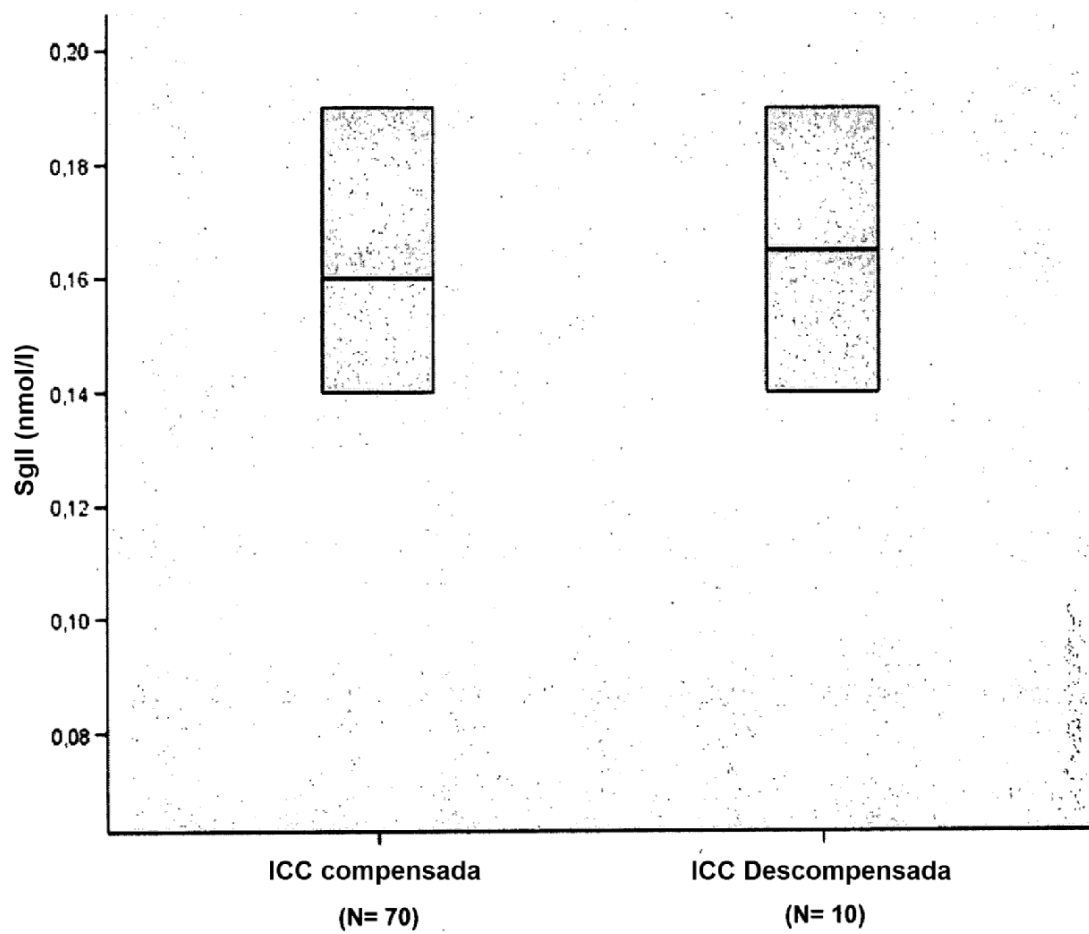


Figura 25

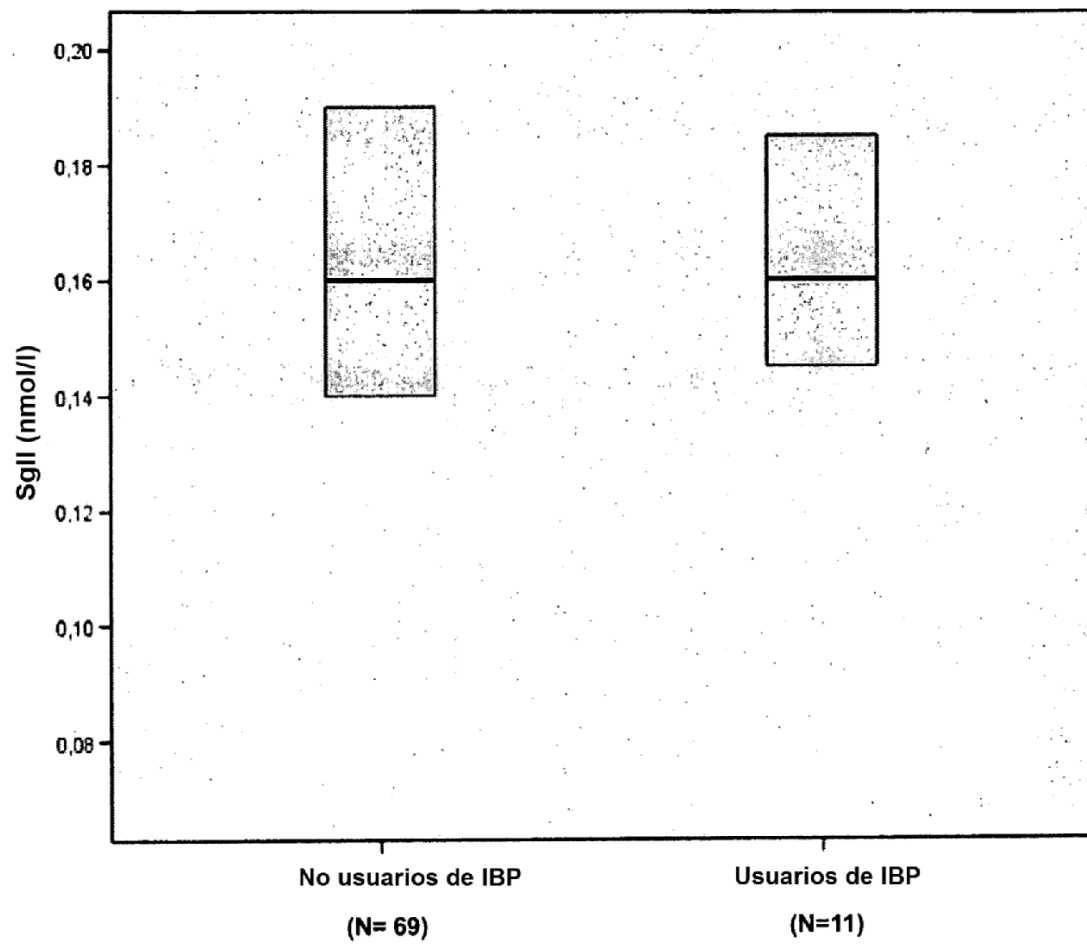


Figura 26

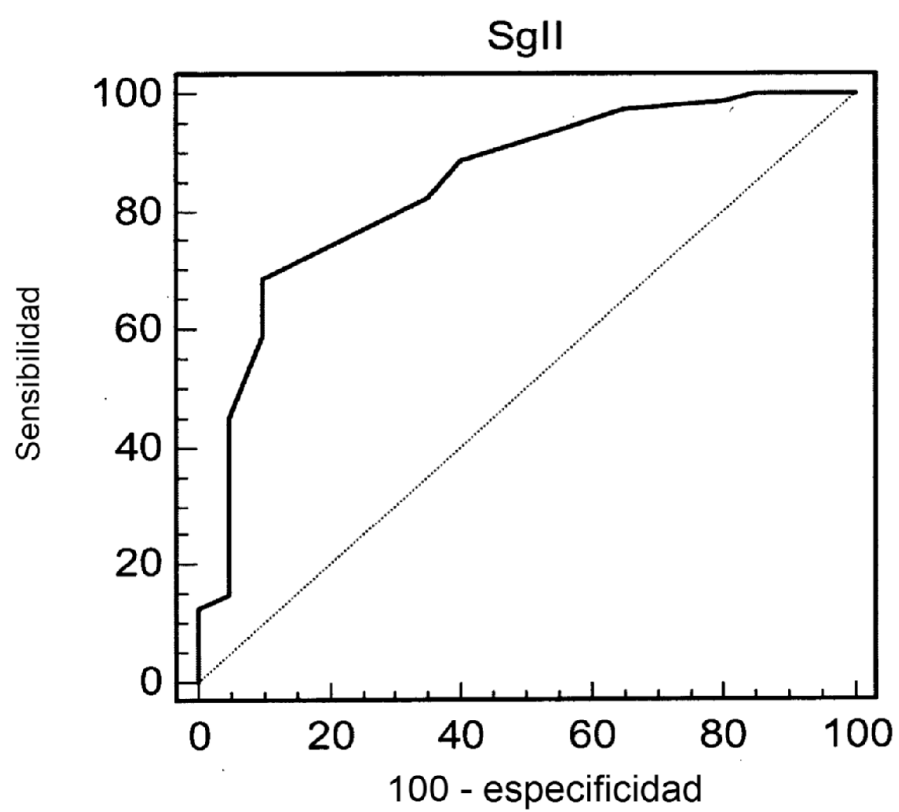


Figura 27

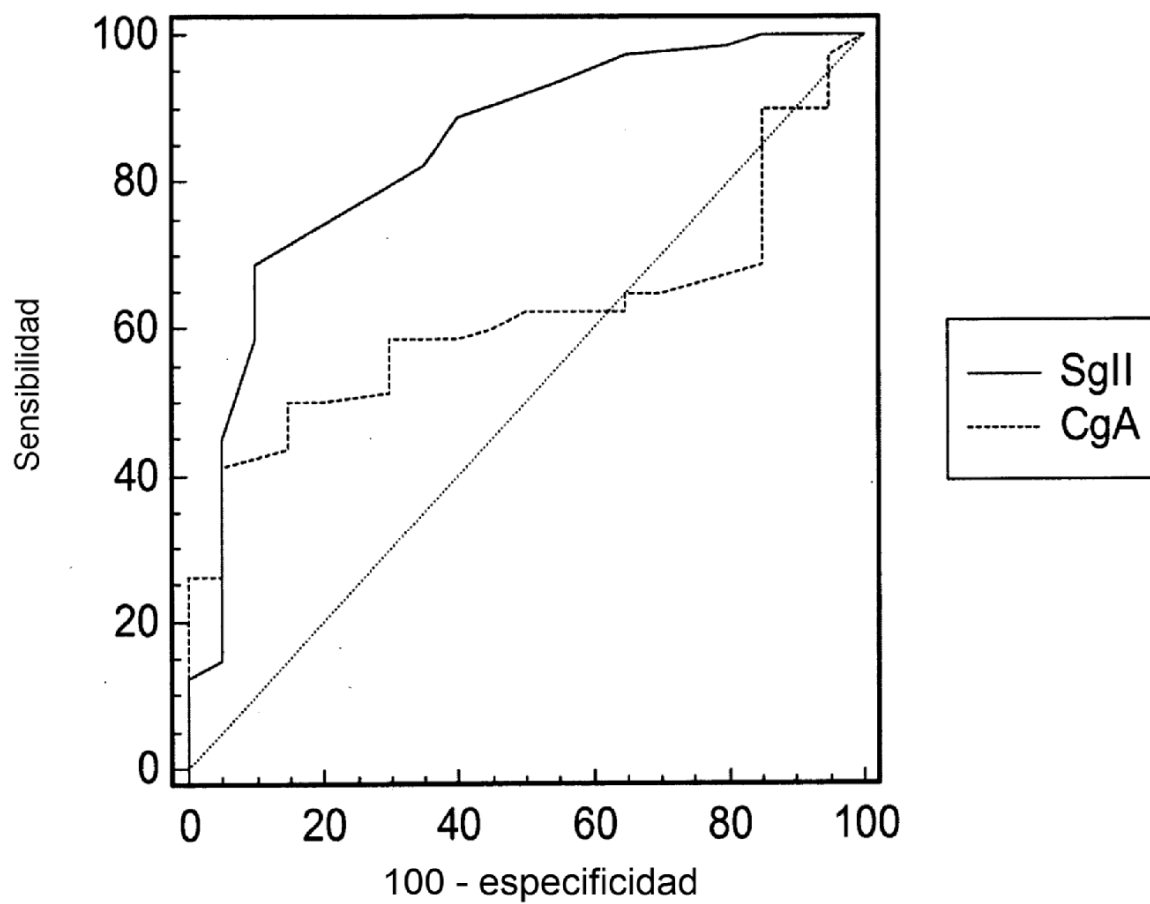


Figura 28

Figura 29A

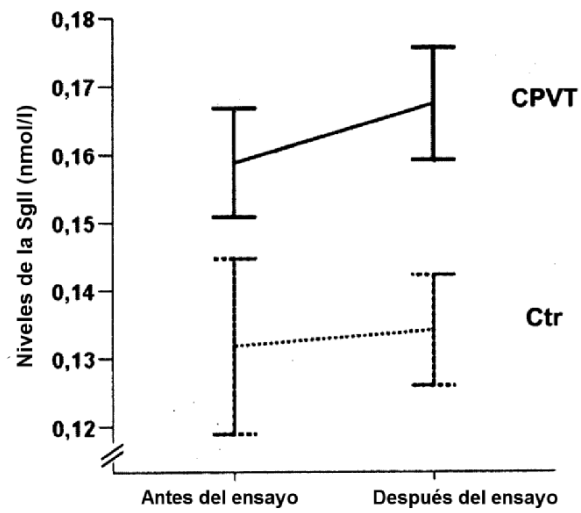


Figura 29B

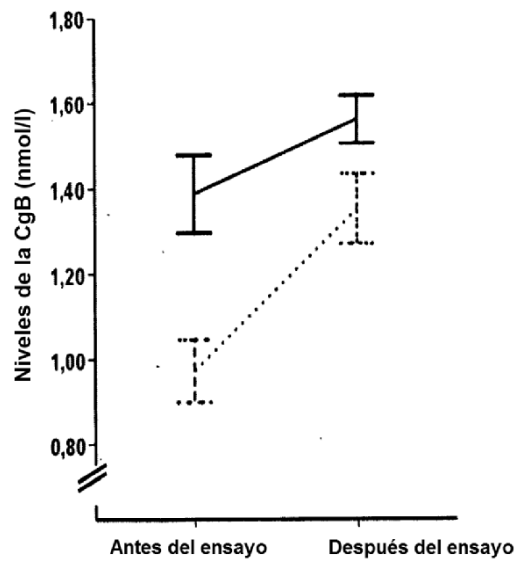


Figura 29C

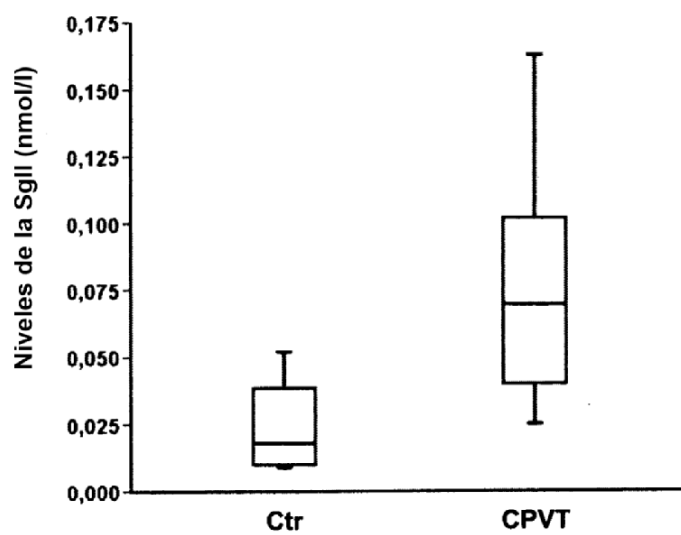


Figura 29D

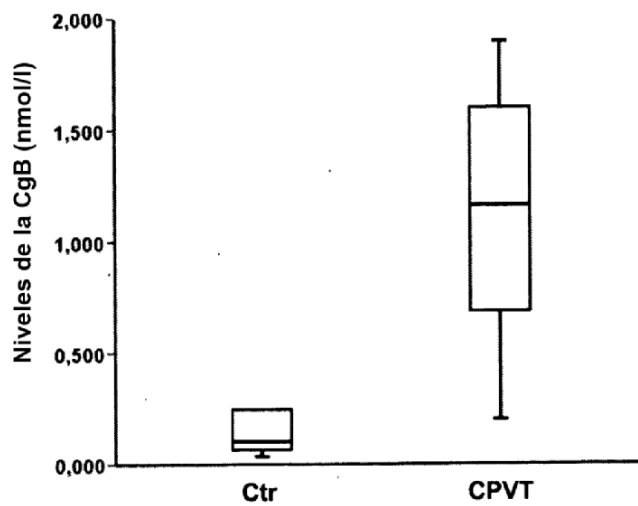


Figura 30A

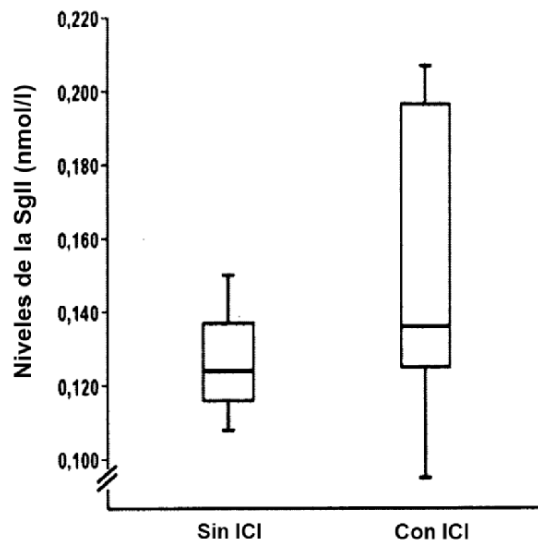


Figura 30B

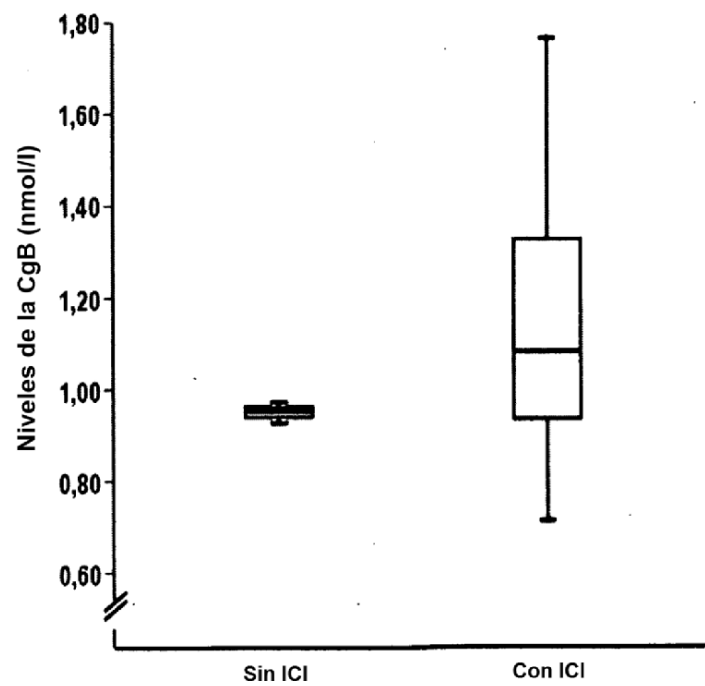


Figura 30C

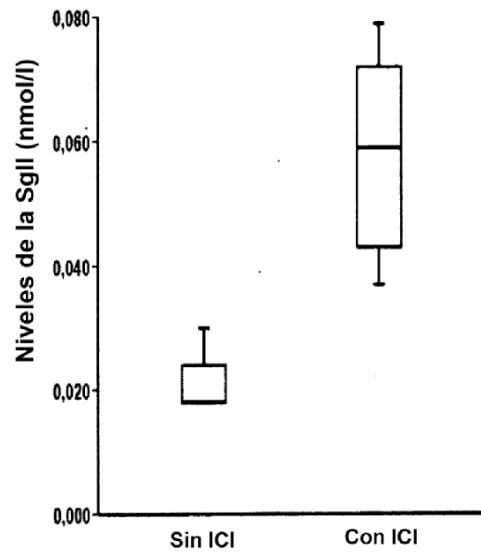


Figura 30D

