(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 670 711**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 12164660 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2500730**

(54) Título: **Receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) como marcador de diagnóstico de inflamación de grado bajo**

(30) Prioridad:

22.12.2006 DK 200601709
22.12.2006 US 876838 P
29.06.2007 DK 200700956
29.06.2007 US 947074 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2018

(73) Titular/es:

HVIDOVRE HOSPITAL (100.0%)
Kettegard Allé 30
2650 Hvidovre, DK

(72) Inventor/es:

EUGEN-OLSEN, JESPER;
HAUGAARD, STEEN B y
ANDERSEN, OVE

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) como marcador de diagnóstico de inflamación de grado bajo

Campo de la invención

La invención está dirigida a un método de diagnóstico de inflamación de grado bajo en un sujeto mamífero aparentemente sano. La invención se dirige adicionalmente a un método de predicción del riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con una inflamación de grado bajo en un sujeto mamífero.

Antecedentes de la invención

El síndrome metabólico se caracteriza por una combinación de hipertensión, resistencia a la insulina con incremento de producción de glucosa y disminución de uso de glucosa, obesidad central (abdominal), dislipidemia (es decir, niveles elevados de triglicéridos y reducción del colesterol de lipoproteínas de alta densidad) e incremento de los niveles de IL-6 y de la producción de TN-α.

El síndrome metabólico ha emergido como un importante grupo de factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades ateroscleróticas, por ejemplo enfermedad cardiovascular aterotrombótica (ECV) prevalente e incidente, cardiopatía coronaria (CPC), ictus, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, así como diabetes de tipo 2. Estímulos tales como la sobre nutrición, la inactividad física y el envejecimiento pueden tener como resultado hipersecreción de citocinas y, en última instancia, conducen a resistencia a la insulina y diabetes en algunos, aunque no en todos, sujetos humanos. De acuerdo con los criterios clínicos desarrollados por las Guías del Panel de Tratamiento de Adultos III (ATP III), se ha estimado que 1 de 4 adultos que viven en Estados Unidos merece el diagnóstico de síndrome metabólico; no obstante, no todos los individuos obesos desarrollan este síndrome. La enfermedad cardiovascular y la diabetes de tipo 2 son causas principales de muerte y enfermedad en los países desarrollados y estas enfermedades crónicas se están convirtiendo en un problema de salud dominante en todo el mundo. El diagnóstico precoz del síndrome metabólico y la predicción del diagnóstico precoz de acontecimientos cardiovasculares futuros y diabetes mejoraría considerablemente las posibilidades de éxito del tratamiento profiláctico y terapéutico.

La inflamación de grado bajo es un factor desencadenante del síndrome metabólico. En la actualidad, se usan los niveles en sangre de las citocinas proinflamatorias, de la proteína reactiva con C hipersensible (hs-CRP), de interleucina 6 (IL-6), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), del amiloide A sérico (AAS), de fibrinógeno y albúmina, la viscosidad en plasma, la velocidad de sedimentación globular (VSG) y el recuento de leucocitos para indicar la presencia de inflamación de grado bajo y, por tanto, para predecir el riesgo de desarrollar síndrome metabólico, asociado con factores de riesgo vascular y con enfermedad cardiovascular aterotrombótica (EDV) prevalente e incidente, cardiopatía coronaria (CPC), ictus, enfermedad de las arterias periféricas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diabetes de tipo 2.

Aunque los individuos aparentemente sanos desarrollan síndrome metabólico, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que los individuos infectados por VOH en tratamiento también pueden desarrollar síndrome metabólico. La extensa implementación del tratamiento antirretroviral altamente activo (HARRT) en los países occidentales, desde 1996 en adelante, ha aumentado la prevalencia de los pacientes infectados por VIH que viven mucho tiempo con supresión de ARN del VOH y recuentos de CD4 bastante altos. No obstante, los efectos adversos del HAART, en particular la administración de inhibidores de la proteasa, conducen a una forma de síndrome metabólico, similar a la observada en individuos obesos no infectados por VIH, incluida la resistencia a la insulina, redistribución de la grasa, dislipidemia y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar herramientas predictivas y para el diagnóstico precoz para prevenir in incremento de la morbidad y la mortalidad de pacientes infectados por VIH en tratamiento con HAART que muestren este grupo de fenotipos dismetabólicos. El estado inmunológico de un individuo afecta a su estado metabólico, que se refleja en el nivel de marcadores inmunológicos, por ejemplo TNF-α y IL-6. Se ha demostrado que estos marcadores inmunológicos se correlacionan inversamente con los síntomas de síndrome metabólico en pacientes infectados por VIH así como en sujetos negativos para el VIH; no obstante, los datos no son consistentes y se necesitan marcadores predictivos más estables y más fuertes.

El receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR, CD87) es el receptor celular de la uroquinasa (uPA) y se expresa en la mayoría de los leucocitos, incluidos monocitos, macrófagos, neutrófilos y plaquetas. El uPAR es un antígeno de activación en monocitos y linfocitos T. El uPAR se puede desprender de la superficie celular y generar una forma soluble del receptor (suPAR) que carece del anclaje GPI. El mecanismo de desprendimiento no se conoce bien pero se puede producir mediante escisión del anclaje GPI catalizado por una fosfolipasa D específica de GPI. Las formas solubles del uPAR (suPAR) se han identificado en sobrenadantes de cultivos celulares y en diversos fluidos biológicos, tales como ascitis tumoral, fluido ascítico, suero, plasma y orina. El origen celular del suPAR circulante no se conoce. Muchas células, si no todas, que expresan uPAR también desprenden formas solubles del receptor cuando se cultivan *in vitro.*

Svendsen et al (2006) Surgical Infections 7, 463 - 471 divulgaron que concentraciones preoperatorias elevadas de suPAR estaban asociadas con el desarrollo de neumonía tras la cirugía de cáncer colorrectal.

El documento WO 2005/116077 divulgó el uso de un ligando que se une a un complejo uPA-uPAR binario, pero que no inhibe la unión uPA-uPAR, en el tratamiento de un gran número de enfermedades, incluidos varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (tales como aterosclerosis).

Ostrowski et al (2004) J. Acquir. Immune Defic. Syndro. 35, 337-342. Ostrowski et al (2006) Scand. J. Immunol. 63, 478-486 and Ostrowski et al (2005) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 39, 23-31 desvela estudios en los niveles de suPAR en pacientes infectados por VIH, y concluye que el nivel se correlaciona con la inflamación en tales pacientes. Disminuye cuando los pacientes se tratan con HAART.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento para diagnosticar inflamación de grado bajo de acuerdo con la reivindicación 1.

La invención también proporciona un método para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con una inflamación de grado bajo de acuerdo con la reivindicación 2.

La medición en la etapa (b) de cualquiera de estos métodos puede además compararse con un valor de referencia en el que un incremento del nivel de dicho marcador indica el grado de inflamación de grado bajo. En todas las realizaciones de la invención, es preferible que el sujeto mamífero no haya recibido ninguna transfusión de sangre en las 24 horas (más preferentemente 48 horas o una semana) anteriores a la extracción de la muestra para la medición *in vitro* de los niveles de suPAR.

El sujeto, en una realización específica, puede ser un sujeto humano. La muestra de la etapa (a) puede sufrir un procesamiento antes de llevar a cabo la etapa (b). Por ejemplo, podría congelarse y descongelarse, diluirse, concentrarse, estabilizarse, filtrarse o tratarse con conservantes.

El valor de referencia es un patrón de niveles de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una población. Como alternativa, el valor de referencia se obtiene midiendo el nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR de una muestra de un sujeto con un nivel conocido de inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico. En una realización concreta, el nivel de referencia es < = 3,0 ng por ml usando los ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo el kit suPARnostic™ comercializado por Virogates A/S, Dinamarca. El nivel de dicho marcador en un sujeto que tiene inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico aumenta en al menos aproximadamente un 10 % en comparación con dicha muestra de referencia. En realizaciones más específicas, el nivel de dicho marcador aumenta al menos aproximadamente un 25 %, 50 %, 75 % y/o por encima del 100%.

También se desvela un método para predecir el riesgo de desarrollar enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo, en particular, cáncer y/o el riesgo de mortalidad en 1 año, 3 años, 5 años, 10 años, 1-10 años, 1-5 años o 5-10 años en un sujeto mamífero, en particular un sujeto humano, que comprende:

(a) realizar una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras, que comprenden un fluido biológico derivado de dicho sujeto, y

(b) usar los valores de la medición obtenidos como factor para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo, el riesgo de desarrollar cáncer y/o el riesgo de mortalidad en, por ejemplo, 1, 3, 5, 10 o entre 1-10 años, 1-1 años, 5-10 años.

Por “riesgo de mortalidad”, los inventores quieren decir el riesgo de mortalidad general, en lugar el riesgo de morir por una enfermedad concreta.

Como se ha indicado anteriormente, el valor de referencia es un patrón de niveles de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una población. Como alternativa, el valor de referencia se obtiene midiendo el nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR de una muestra de un sujeto sin enfermedad relacionada con inflamación de grado bajo y/o enfermedad relacionada con el síndrome metabólico.

El nivel de dicho marcador aumenta al menos aproximadamente un 10 % y/o 1 ng/ml, o entre aproximadamente 1 - 20 ng/ml en dicha muestra en comparación con dicha muestra de referencia. En realizaciones específicas, el nivel

del marcador puede aumentar al menos aproximadamente 2 ng/ml, 3 ng/ml, 3,5 ng/ml, 5 ng/ml, 8 ng/ml, 10 ng/ml, 15, ng/ml, 20 ng/ml o en los intervalos siguientes: (1 - 3 ng/ml, 1 - 5 ng/ml, 3 - 5 ng/ml, 5 - 10 ng/ml, 10 - 15 ng/ml, 15 - 20 ng/ml). En una realización concreta, se diagnostica un mayor riesgo de desarrollar cualquiera de dichas enfermedades o mortalidad general en cualquiera de los periodos definidos anteriormente si el nivel de suPAR es superior a aproximadamente 3,0 ng/ml (o 4, 5 o 6 ng/ml) en varones y superior a aproximadamente 3,5 ng/ml (o 4,5, 5,5 o 6,5) en mujeres.

También se desvela un método para monitorizar el tratamiento de la inflamación de grado bajo en un sujeto mamífero que comprende:

(a) aislar una muestra de un sujeto sometido a tratamiento por inflamación de grado bajo (p. ej., tratamiento antiinflamatorio, cáncer);
(b) medir el nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR, en el que una disminución de los niveles de dicho marcador usado en la etapa (b) es una indicación de la progresión del tratamiento.

En una realización concreta, el nivel de dicho marcador disminuye en al menos aproximadamente un 10 % y/o 1 ng/ml, y, preferentemente, de aproximadamente 1,3 - 3 ng/ml en dicha muestra en comparación con dicha muestra de referencia durante el curso de dicho tratamiento. Como alternativa, el nivel de dicho marcador puede disminuir en al menos aproximadamente un 25 %, 50 %, 75 % y/o por encima del 100 % o entre al menos aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 %.

De acuerdo con los procedimientos anteriores, dicha enfermedad relacionada con inflamación de grado bajo puede ser enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o diabetes de tipo 2, enfermedad de Alzheimer, eccema crónico, asma bronquial, o enfermedad autoinmunitaria. En concreto, una enfermedad relacionada con inflamación puede ser cáncer (p. ej., de pulmón, de mama, leucemia, de próstata).

De acuerdo con los procedimientos anteriores, dicho fluido biológico es, preferentemente, uno de sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo u orina.

De acuerdo con una realización de los procedimientos anteriores, dicho sujeto es un ser humano infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana y en tratamiento con tratamiento antirretroviral altamente activo (HAART) o está aparentemente sano. Si el paciente está infectado por el VIH, preferentemente, al menos en el contexto de evaluar el riesgo de mortalidad, el paciente no tiene SIDA, Por “sano”, los inventores quieren decir que no se ha diagnosticado al paciente con una afección potencialmente mortal (tal como cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad pulmonar obstructiva crónica), una enfermedad autoinmunitaria o diabetes de tipo 2.

En las diversas realizaciones de la invención, el paciente puede tener más de 40 años de edad, por ejemplo más de 50 o más de 60 y puede tener menos de 70 años de edad, por ejemplo menos de 60 o menos de 50. El paciente puede ser de raza caucásica.

De acuerdo con una realización de los procedimientos anteriores, dichas una o más muestras derivan de dicho sujeto en uno o más puntos de tiempo. Opcionalmente, dicha una o más mediciones se comparan para evaluar la eficacia de un curso de acción profiláctica y/o tratamiento.

De acuerdo con los procedimientos anteriores, dicha medición *in vitro* es, preferentemente, un ensayo ELISA. ELISA adecuados para los niveles de suPAR se divulgan en laMizukami et al (1995) Blood 86, 203-211.

De acuerdo con los procedimientos anteriores, en la etapa b) una o más de las siguientes medidas adicionales derivadas del sujeto seleccionado del grupo que consiste en: edad, sexo, origen étnico, fumador, no fumador, presión arterial sistólica/diastólica, niveles de colesterol, niveles de triglicéridos y medida de la circunferencia de la cintura, se pueden utilizar para diagnosticar inflamación de grado bajo.

El procedimiento puede comprender además la realización de una prueba de tolerancia a la glucosa, el ensayo de TNF-alfa, IL-6, recuento de leucocitos, hsCRP, glucemia en ayunas (en sangre), presión arterial, colesterol, proteína reactiva con C y/o niveles de triglicéridos.

La divulgación también está dirigida a procedimientos y composiciones para el tratamiento del síndrome metabólico y/o inflamación de grado bajo. Específicamente, existe un procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad de una sustancia que disminuye el nivel de suPAR suficientemente para tratar dicha inflamación de grado bajo y/o el síndrome metabólico. Preferentemente, el nivel en plasma se reduce hasta por debajo de 6 ng/ml, más preferentemente por debajo de 5, 4 o 3 ng/ml. La sustancia que se administra puede ser un anticuerpo anti-suPAR (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal). La sustancia puede ser, como alternativa, un análogo de suPAR o derivado capaz de unir uPA o un producto de escisión de suPAR tales como una o más de las isoformas D2D3. La composición puede ser una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o prevención de la inflamación de grado bajo y/o el síndrome metabólico, que comprende una sustancia que

disminuye el nivel de suPAR en un sujeto mamífero.

En un aspecto relacionado, existe el uso de una sustancia para la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento o prevención de la inflamación de grado bajo y/o el síndrome metabólico, en el que dicha sustancia reduce el nivel de suPAR en un sujeto mamífero.

En un aspecto específico, existe un medio legible por ordenador que tiene lógica informática almacenada configurada para producir, cuando se ejecuta en un sistema de procesamiento de datos, que el sistema de procesamiento de datos calcule el riesgo y/o los cambios en el riesgo de una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo, una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, cáncer y/o mortalidad en, por ejemplo, 1, 3, 5, 10 o entre 1-10 años, 1-5 años, 5-10 años, que comprende:

(a) lógica para recibir una o más mediciones derivadas de un sujeto mamífero en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto;
(b) lógica para análisis de una o más de dichas mediciones de la etapa (a); y
(c) lógica para el cálculo de riesgo y/o el cambio en el riesgo de dicha enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo y/o dicha enfermedad relacionada con el síndrome metabólico (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diabetes tipo 2), cáncer (por ejemplo, , cáncer de mama o cáncer de pulmón), y/o mortalidad en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años, 10 años, 1-10 años, 1-5 años, 5-10 años, basado en el análisis de la etapa (b) de dichas mediciones.

En un aspecto concreto, la lógica en (a) comprende una lógica para recibir dos o más mediciones derivadas de un sujeto humano en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto. Si el sistema de procesamiento de datos se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar diabetes, la lógica puede recibir además mediciones de los niveles de glucosa en sangre derivados de un sujeto mamífero; si el sistema de procesamiento de datos se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, la lógica puede recibir además las mediciones de la presión arterial, HDL-colesterol, LDL-colesterol, colesterol total, hsCRP, y/o triglicéridos; si el sistema de procesamiento de datos se utiliza para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años , 10 años, 1-5 años, 1-10 años o 5-10 años, la lógica puede recibir además mediciones de las concentraciones de péptido natriurético cerebral.

Además, puede hacerse que el sistema de procesamiento de datos en dicho medio legible por ordenador monitorice la progresión del tratamiento de la enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo y/o la enfermedad relacionada con el síndrome metabólico con respecto a dicho cambio en el riesgo.

La invención abarca además un producto de programa informático, que comprende el medio legible por ordenador de la presente invención. Un producto de programa informático" se utiliza para referirse en general a medios tales como un disco duro y unidad de almacenamiento y unidad de almacenamiento extraíble. En una realización, el software se puede almacenar en un producto de programa informático y se carga en el ordenador mediante una unidad de almacenamiento extraíble, un disco duro y una interfaz de comunicaciones.

La divulgación se refiere además a un ordenador para la determinación del riesgo y/o cambio en el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, enfermedad relacionada con inflamación de grado bajo, cáncer y/o mortalidad en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años, 10 años, o entre 1 y 10 años, 1 y 5 años, o 5 y 10 años, que comprende

(a) un medio de almacenamiento de datos legible por ordenador configurado para almacenar un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por ordenador, en el que dichos datos comprende una o más mediciones derivadas de una o más muestras de un sujeto mamífero en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR;
(b) un medio de almacenamiento que tiene almacenado en el mismo instrucciones para el procesamiento de dichos datos legibles por ordenador;
(c) una unidad central de procesamiento que responde a dichas instrucciones acopladas a dicho medio de almacenamiento y a dicho medio de almacenamiento de datos legible por ordenador para el procesamiento de datos legibles por ordenador en la medición del riesgo y los valores de progresión del tratamiento; y
(d) un dispositivo de salida acoplado a dicha unidad central de procesamiento de (c) para la salida de dichos valores de riesgo y/o cambio de riesgo.

En un aspecto concreto, el medio de almacenamiento de datos legible por ordenador (a) del ordenador comprende datos que comprenden dos o más mediciones derivadas de un sujeto humano en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo

uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto. Si el ordenador se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar diabetes, los datos pueden comprender además mediciones de los niveles de glucosa en sangre derivados de un sujeto mamífero; si el ordenador se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, los datos pueden comprender además las mediciones de la presión arterial, HDL-colesterol, LDL-colesterol, colesterol total, hsCRP, y/o triglicéridos; si el ordenador se utiliza para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años , 10 años, 1-5 años, 1-10 años, 1 – 5 años, 5-10 años, los datos pueden además comprender mediciones de las concentraciones de péptido natriurético cerebral.

En un aspecto específico, existe un ordenador cliente para proporcionar acceso a un sistema de cálculo del riesgo para la determinación del riesgo y/o cambio en el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo (por ejemplo, cáncer) y/o el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años, 10 años o entre 1-10 años, 1-5 años, 5-10 años, comprendiendo el ordenador cliente:

(a) un dispositivo de entrada para recibir una o más mediciones derivadas de un sujeto mamífero en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto;
(b) una interfaz de comunicación para comunicar las una o más mediciones recibidas a un ordenador servidor configurado para analizar dicha una o más mediciones de la etapa (a), y calculan un valor de riesgo; y
(c) una interfaz de comunicaciones para recibir, desde el equipo servidor un valor de riesgo calculado.

En un aspecto concreto, el dispositivo de entrada (a) del ordenador cliente recibe dos o más mediciones derivadas de un sujeto humano en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto. Si el ordenador se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar diabetes, el dispositivo de entrada (a) puede recibir además mediciones de los niveles de glucosa en sangre de un sujeto mamífero; si el ordenador cliente se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, el dispositivo de entrada (a) puede además recibir mediciones de la presión arterial, HDL-colesterol, LDL-colesterol, colesterol y/o triglicéridos totales; si el ordenador cliente se utiliza para calcular el riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, cáncer de mama o cáncer de pulmón); si el ordenador cliente se utiliza para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero dentro de, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años, 10 años o entre 1-10 años, 1-5 años, 5-10 años, el dispositivo de entrada (a) puede recibir además mediciones de NT-proBNP.

En otro aspecto más, existe un método basado en ordenador para la determinación del riesgo y/o cambio en el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo (por ejemplo, cáncer) y/o el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años, 10 años o entre 1-10 años, 1-5 años o 5-10 años, que comprende:

(a) recibir bajo el control del ordenador una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras, que comprenden un fluido biológico derivado de dicho sujeto,
(b) analizar bajo control por ordenador dicha medición *in vitro* recibida en (a)
(c) calcular bajo el control del ordenador un valor del riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo (por ejemplo, cáncer) y/o el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en, por ejemplo, 5 años, 10 años o entre 5-10 años, usando las mediciones analizadas obtenidas en (b).

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra gráficas en cajas que muestran la concentración de suPAR sérica en ayunas en los pacientes infectados por VIH que reciben HAART con lipodistrofia (LIPO) y sin lipodistrofia (NONLIPO). Gráficos de cajas y bigotes muestran los percentiles 10, 25, 50 (mediana), 75 y 90. Los casos extremos de las variables individuales se indican con un asterisco.

La **Figura 2** muestra la correlación entre suPAR y las medidas Dl. metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. La **Figura 2A** muestra la correlación entre suPAR y el metabolismo oxidativo de la glucosa estimulada por insulina (NOGM). ●, pacientes lipodistróficos infectados por VIH; Δ, pacientes no lipodistróficos infectados por VIH. Se indican la línea de correlación lineal, el coeficiente de correlación y el nivel de significación. **La Figura 2B** muestra las correlaciones entre el nivel de suPAR en plasma frente a HOMA-IR (índice de resistencia a la insulina en la evaluación del modelo de homeostasia; Matthews et al. 1985) en pacientes infectados por VIH tratados con HAART (terapia antirretroviral altamente activa), que mostraban lipodistrofia (LIPO, n = 18) [○]; o sin lipodistrofia (NONLIPO, n = 18) [Δ]. Además, un grupo de pacientes infectados por el VIH no tratados previamente con HAART (NO TRATADOS n = 7) [] se incluyó en el análisis. Se presentan las líneas de regresión lineal que incluyen a todos los pacientes en el análisis. LIPO y NONLIPO (n = 36) p-suPAR vs. HOMA-IR r =

0,58, p < 0,001 (r corregido por edad = 0,49, p = 0,003). Todos (n = 43) p-suPAR vs. HOMA-IR r = 0,49, p < 0,001 (r corregido por edad = 0,45, p = 0,003). **La Figura 2C** muestra las correlaciones entre suPAR frente a glucosa en plasma de 2 horas después de una exposición estándar a glucosa oral (75 gramos) en pacientes infectados por el VIH que reciben HAART. ●, pacientes lipodistróficos infectados por VIH; Δ, pacientes no lipodistróficos infectados por VIH. Se indican la línea de correlación lineal, el coeficiente de correlación y el nivel de significación. La **Figura 2D** muestra las correlaciones entre suPAR frente a una medida compuesta de la sensibilidad a la insulina (ISI compuesta) obtenida durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa en pacientes infectados por el VIH en tratamiento con HAART. ●, pacientes lipodistróficos infectados por VIH; Δ, pacientes no lipodistróficos infectados por VIH. Se indican la línea de correlación lineal, el coeficiente de correlación y el nivel de significación.

La **Figura 3** muestra la correlación lineal entre suPAR en plasma en ayunas frente a suPAR en orina en ayunas durante la noche corregidos para la creatinina en orina en una submuestra de 24 pacientes infectados por el VIH, en los que ambas escalas son transformadas log. La fuerza de la correlación se da como R^2.

La **Figura 4** muestra las concentraciones circadianas de suPAR en intervalos de 20 min como un porcentaje de la media (100 %) de n = 5 pacientes infectados por el VIH que reciben HAART, que habían suprimido el ARN del VIH. El gráfico superior muestra perfiles diurnos individuales. El gráfico inferior muestra la media + /-SD de los mismos pacientes.

La **Figura 5** muestra la correlación entre los niveles de suPAR y la supervivencia global. La **Figura 5A** muestra las correlaciones entre suPAR, la edad y el sexo. El gráfico de cajas con líneas corresponde a mujeres y los puntos a varones. La **Figura 5B** muestra la supervivencia según los cuartiles de suPAR. La línea fina representa niveles bajos de suPAR (N = 650, suPAR inferior a 3.620 ng/ml), la línea fina media N = 651, suPAR entre 3.622 - 4.266), la línea gruesa media, N = 651, suPAR entre 4.269 – 4.912. La línea más gruesa representa 650 individuos con niveles altos de suPAR (> 4.915). Diferencia entre grupos significativa (orden logarítmico, p < 0,001).

La **Figura 6** muestra la correlación entre los niveles de suPAR y el hábito de fumar y el ejercicio. La **Figura 6A** muestra los niveles de suPAR entre varones de acuerdo a la condición de fumador. Las cajas con líneas horizontales representan a los fumadores, las cajas blancas son los fumadores ocasionales y las cajas con líneas verticales representan a los no fumadores. Los niveles medios de suPAR fueron significativamente mayores entre los varones fumadores (4,57 (sd 1,45) ng/ml, N = 580) en comparación con los fumadores ocasionales (3,64 (SD 0,86), N = 56), P < 0,001, prueba U de Mann-Whitney para todos los grupos de edad. El nivel de suPAR entre los no fumadores varones era de media 3,72 (std 1.22), N = 674), que fue significativamente más bajo que en los fumadores (Mann-Whitney p< 0,001), pero no diferente en comparación con los fumadores ocasionales (p = 0,8). La línea de color negro indica la mediana de suPAR y las cajas los cuartiles del 25 % por encima y por debajo de la mediana. La **Figura 6B** muestra los niveles de suPAR entre mujeres de acuerdo con su condición de fumador y la edad. Las cajas con líneas horizontales representan a los fumadores, las cajas blancas son los fumadores ocasionales y las cajas con líneas verticales representan a los no fumadores. Las mujeres fumadoras (N = 511) tenían niveles significativamente más altos de suPAR en comparación con los fumadores ocasionales (N = 50) y los no fumadores (N = 731), p < 0,001. No hay diferencia entre fumadores ocasionales y no fumadores. La línea de color negro indica la mediana de suPAR y las cajas los cuartiles del 25 % por encima y por debajo de la mediana. La **Figura 6C** muestra la relación entre suPAR y el ejercicio en los diferentes grupos de edad. El grupo de edad 1 consistió en individuos que no hacían ejercicio regularmente (N = 539), el grupo de edad 2 eran individuos que realizaban ejercicio bajo o moderado (paseaban etc.) (N = 1454), el grupo de edad 3 eran individuos que realzaban ejercicio con regularidad (por ejemplo, correr) (N = 546) y el grupo de edad 4 constaba de deportistas profesionales (N = 17).

La **Figura 7** muestra el riesgo de desarrollar una ECV como un modelo de riesgo competitivo. Cada línea representa un cuartil de suPAR, siendo el primer cuartil el suPAR más bajo.

La **Figura 8** muestra un análisis de riesgo de diabetes de acuerdo con la mediana de suPAR en el momento de la inclusión. Línea continua superior (con alto riesgo) representa individuos con suPAR por encima de la mediana, mientras que la línea inferior (línea de puntos) son los individuos con suPAR por debajo de la mediana.

La **Figura 9** muestra la relación de los niveles de suPAR con un número de componentes del síndrome metabólico en un sujeto, siendo los componentes uno o más de: circunferencia de cintura elevada: Varones - igual o mayor de 40 pulgadas (102 cm) y Mujeres - igual o mayor de 35 pulgadas (88 cm); triglicéridos elevados: Igual o superior a 150 mg/dl; colesterol HDL (“bueno”) reducido: Varones - Menos de 40 mg/dl, mujeres - menos de 50 mg/dl; presión arterial elevada: Igual o superior a 130/85 mm Hg; niveles elevados de glucosa en ayunas: Igual o superior a 100 mg/dl

La **Figura 10** muestra la relación de los niveles de suPAR y el número de componentes (como en la figura 9) del síndrome metabólico de un sujeto de acuerdo con el sexo.

La **Figura 11** muestra el riesgo de desarrollar IHD durante el seguimiento. La línea gruesa indica individuos con suPAR por encima de la mediana (4,03 ng/ml). La línea fina indica individuos con suPAR por debajo de la mediana. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$, prueba del orden logarítmico).

La **Figura 12** muestra el análisis ROC de las variables importantes para el desarrollo de ECV en análisis multivariables.

La **Figura 13** muestra el análisis de Kaplan Meier del tiempo hasta el diagnóstico de cáncer. La línea superior fina representa el cuartil más bajo de suPAR, la de abajo (línea fina mediana) representa el segundo cuartil más bajo de suPAR, la línea gruesa media representa el segundo cuartil más alto de suPAR y la más gruesa (línea inferior) representa el cuartil más alto de suPAR. $P < 0,001$, prueba del orden logarítmico.

La **Figura 14** muestra el análisis de Kaplan Meier del riesgo de desarrollar cáncer con el tiempo. La línea superior fina representa el cuartil más bajo de suPAR, la de abajo (línea fina mediana) representa el segundo cuartil más bajo de suPAR, la línea gruesa media representa el segundo cuartil más alto de suPAR y la más gruesa (línea inferior) representa el cuartil más alto de suPAR.

La **Figura 15** muestra el análisis de Kaplan Meier del riesgo de desarrollar cáncer de mama con el tiempo. La línea superior fina representa el 1er cuartil más bajo de suPAR, la de abajo (línea fina mediana) representa el segundo 2º cuartil más bajo de suPAR, la línea gruesa media representa el segundo 3er cuartil más alto de suPAR y la más gruesa (línea inferior) representa el 4º cuartil más alto de suPAR.

La **Figura 16** muestra el análisis de Kaplan Meier del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón con el tiempo. La línea superior fina representa el 1er cuartil (más bajo) de suPAR, la de abajo (línea fina mediana) representa el segundo cuartil (segundo más bajo) de suPAR, la línea gruesa media representa el segundo 3er cuartil (segundo más alto) de suPAR y la más gruesa (línea inferior) representa el 4º cuartil (el más alto) de suPAR.

La **Figura 17** muestra el análisis de Kaplan Meier del riesgo de desarrollar leucemia con el tiempo. La línea continua inferior (con alto riesgo) representa individuos con suPAR por encima de la mediana, mientras que la línea superior (línea de puntos) son los individuos con suPAR por debajo de la mediana.

La **Figura 18** muestra el análisis de Kaplan Meier del riesgo de desarrollar cáncer, excluyendo el cáncer de mama o de pulmón, con el tiempo. La línea continua inferior (con alto riesgo) representa individuos con suPAR por encima de la mediana, mientras que la línea superior (línea de puntos) son los individuos con suPAR por debajo de la mediana.

La **Figura 19** (Ejemplo 13) muestra que el suPAR de longitud completa, $D_1D_2D_{3\ (1\text{-}277)}$, y el fragmento de suPAR activo quimiotáctico, $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$, se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos que reconocen específicamente D_1 (anticuerpos R3 y R5) o D_3 (anticuerpo VG-1). TAG Copenhague sintetizó las secuencias de aminoácidos SRSRY y ATVYSRSRY. Se revistió una placa de microtitulación con $D_1D_2D_{3\ (1\text{-}277)}$ purificado (30 ng/ml), $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$ purificado (30ng/ml), SRSRY (50 ng/ml), ATVYSRSRY (50 ng/ml) o una mezcla de $D_1D_2D_{3\ (1\text{-}277)}$ y $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$ (58 ng/ml). Los pocillos se revistieron por triplicado y se incubaron con los anticuerpos. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano, que se desarrolló mediante la adición del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se detuvo mediante la aplicación de H_2SO_4. Un lector de ELISA midió la absorbancia a 450 nm.

Figura 20. suPAR de longitud total purificado, $D_1D_2D_{3\ (1\text{-}277)}$ y fragmento de suPAR escindido con quimiotripsina purificado, $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$ se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando ambos anticuerpos de la presente invención. El anticuerpo VG-1 reconocía el suPAR de longitud completa, $D_1D_2D_{3\ (1\text{-}277)}$ y la forma escindida, $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$. No obstante, se demostró que el anticuerpo VG-2 no era aplicable en el procedimiento de transferencia de Western. $D_1D_2D_{3(1\ -\ 277)}$ se cargó en las calles 2, 4 y 6, mientras que $D_2D_{3\ (83\text{-}277)}$ se cargó en las calles 1, 3 y 5. Las calles 1 y 2 se incubaron con un anticuerpo específico D1), las calles 3 y 4 con un anticuerpo específico D3) y las calles 5, 6 y 7 se incubaron con VG-1.

Figura 21: El suPAR purificado (4,6 µg/ml) se digirió con quimotripsina en concentraciones entre 1 y 300 ng/ml durante 4 o 24 horas o se analizó directamente sin la digestión (calle 4), se separó por tamaño por SDS-PAGE y después se transfirió a una membrana de PVDF mediante la transferencia de tipo Western. Al digerir con 40 ng/ml de quimotripsina durante 4 horas solo se digirió una pequeña parte del suPar de longitud completa (calle 1). Al usar 40 ng/ml durante 24 horas, el suPAR sólo se digirió parcialmente (calle 2). Al usar 100 ng/ml durante 24 horas, se obtuvo el suPAR de longitud completa completamente digerido (Calle 3). Se usó MagicMark como escalera proteica (Calle 5).

Figura 22: Tinción con plata de D2D3 (88-277) (calle 1), D1D2D3 (calle 2), una muestra de albúmina (calle 3) y SeeBlue (calle 4) después de la cromatografía de afinidad.

Figura 23. Gráficas de las citocinas reguladas por aumento. Concentración relativa (la media de cada muestra se dividió con la media de las muestras simuladas) en las muestras se estimularon con 100 ng/ml de $D1D2D3_{(1-277)}$ o $D2D3_{(88-277)}$.

Descripción detallada de la invención

La terminología usada en la presente memoria descriptiva es para el fin de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención, que solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de una unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado, entra dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse de forma independiente en los intervalos más pequeños y también entran dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o los dos límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención también se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos.

Cabe destacar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La invención se basa en la observación inesperada de que el uPAR soluble (suPAR) está presente en niveles elevados en suero, plasma y orina de individuos con inflamación de grado bajo y en individuos con trastornos metabólicos. Se muestra que el nivel de suPAR varía independientemente del índice de masa corporal (IMC) y, por lo tanto, proporciona un marcador más útil de la inflamación de grado bajo y el síndrome metabólico que los marcadores disponibles en la actualidad. Además, se muestra que los niveles de suPAR medidos en un fluido biológico derivado de un individuo son un fuerte marcador predictivo para el riesgo de desarrollo de enfermedades que pueden proceder de inflamación de grado bajo y trastornos metabólicos, incluyendo enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes de tipo 2 y desarrollo de cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de próstata y de mama y/o el riesgo de mortalidad en, por ejemplo, 1 año, 3 años, 5 años, 10 años o entre los 1-5 años, 5 años-10 años, 1 -10 años.

Como se define en el presente documento, "la inflamación de grado bajo" se caracteriza por (1) niveles elevados de una o más de una citocina proinflamatoria (por ejemplo, IL-6, TNF alfa, IFN gamma), amiloide A sérico (AAS), orosomucoide, fibrinógeno, gamma-globulina, y/o (2) aumento de la viscosidad del plasma, la velocidad de sedimentación globular (VSG) y/o el recuento de leucocitos, y/o (3) disminución de niveles de seroalbúmina en comparación con un valor de referencia (véase, por ejemplo, Kolb et al., 2005, Diabetologia 48:1038 - 1050); y/o (4) aumento de la respuesta de fase aguda, medido, por ejemplo, mediante la proteína C-reactiva hipersensible (hs-CRP) (por ejemplo, un nivel de hs-CRP de 1,5 a 3,5 veces, preferentemente aproximadamente dos veces, el nivel normal); todo en la ausencia de inflamación observable. En una realización particular, la inflamación de grado bajo se caracteriza por la elevación de uno o más de los marcadores mencionados, en ausencia de inflamación observable. En particular, la inflamación de grado bajo puede caracterizarse por un nivel de hs-CRP –superior a 1 mg/l (en particular superior a 3 mg/l), por ejemplo, medida usando el ensayo de inmunoturbidimetría potenciado con partículas (Roche Diagnostics) descrito más adelante.

Como se define en el presente documento, “síndrome metabólico” se caracteriza por una combinación de hipertensión, resistencia a la insulina con incremento de producción de glucosa y disminución de uso de glucosa, obesidad central (abdominal), dislipidemia (es decir, niveles elevados de triglicéridos, LD-colesterol y colesterol total, y reducción del colesterol de lipoproteínas de alta densidad, e “inflamación de grado bajo” como se ha indicado anteriormente. Los criterios ampliamente aceptados para el diagnóstico de síndrome metabólico, proporcionados por el National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATPIII) con pequeñas modificaciones son los siguientes:

circunferencia de cintura elevada: Varones - igual o mayor de 40 pulgadas (102 cm) y Mujeres

- igual o mayor de 35 pulgadas (88 cm);

Triglicéridos elevados: Igual o superior a 150 mg/dl;
Niveles bajos de colesterol HDL (“bueno”): Varones - Menos de 40 mg/dl, mujeres - menos de 50 mg/dl; presión arterial elevada: Igual o superior a 130/85 mm Hg;

Glucosa en sangre en ayunas elevada: Igual o superior a 100 mg/dl. De acuerdo con ello, en una realización particular de la invención, se diagnostica a un sujeto el síndrome metabólico si el sujeto exhibe 3 o más de los 5 componentes enumerados anteriormente.

En una realización más concreta, el síndrome metabólico se define de acuerdo a la definición de la Federación Internacional de la Diabetes como obesidad central (cintura en varones/mujeres > 94/80 cm) junto con al menos dos de los siguientes: niveles elevados de triglicéridos > 1,7 mmol /l (150 mg/dl), niveles reducidos de colesterol-lipoproteínas de alta densidad (<1,03 mmol/l (40 mg/dl), niveles elevados de glucosa en plasma (> 5,6 mmol/l (100 mg/dl) o PA elevada (PA sistólica > 130 mm de Hg o PA diastólica > 85 mm Hg).

La disminución de los niveles de suPAR se puede conseguir mediante la disminución de la tasa de producción de suPAR o mediante la disminución de la estabilidad del suPAR producido, por ejemplo, eliminándolo del cuerpo con anticuerpos anti-suPAR.

1. suPAR y/o sus productos de escisión para su uso como marcador:

La proteína suPAR (Nº de registro en NCBI AAK31795 e isoformas del receptor, NP_002650, Q03405, NP_002650, NP_001005376) es la porción soluble del receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa activador (uPAR), que se libera por escisión del anclaje GPI del uPAR unido a la membrana. suPAR es una familia de proteínas glicosiladas que consisten en suPAR de longitud completa (277 aminoácidos (1-277)) y fragmentos de suPAR D1 (1-83), y D2D3 (84-277) generados mediante la escisión con uroquinasa o proteasa de tipo tripsina de las vías respiratorias humanas, D1 (1-87) y D2D3 (88-277) generados por escisión de MMP, D1 (1-89) y D2D3 (90-277) también generados por escisión con uroquinasa o proteasa de tipo tripsina de las vías respiratorias humanas, D1 (1-91) y D2D3 (92-277) generados por la escisión con plasmina. Se pueden usar epítopos continuos y discontinuos presentes en la proteína suPAR y sus productos de escisión para supervisar su presencia y abundancia en un fluido biológico mediante inmunodetección con anticuerpos mono-o policlonales. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos a epítopos accesibles comunes a suPAR y sus productos de escisión (por ejemplo, D2D3) se pueden usar para detectar tanto suPAR como sus productos de escisión en un fluido biológico.

El uso de suPAR como marcador tiene la ventaja de que es más estable que otros marcadores de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, TNF-α e IL-6. Por ejemplo, se sabe que los niveles de suPAR en individuos sanos son estables durante todo el día (Sier CF, et al., 1999, Lab Invest 79:717-722). Del mismo modo, se ha demostrado que los cambios circadianos en la concentración plasmática de suPAR en pacientes infectados por VIH que reciben HAART estable son muy limitados (Ejemplo 1). Por lo tanto, las mediciones de suPAR basadas en un fluido biológico derivado de un sujeto serán válidas, con independencia de si el sujeto está en ayunas o no, y en gran medida con independencia del programa de tiempo para la obtención de muestras. Este no es el caso para los marcadores alternativos, tales como TNF-α e IL-6, que muestran fluctuaciones circadianas sustanciales. Un programa flexible de obtención de muestras y la estabilidad de las moléculas de suPAR en muestras almacenadas de fluido biológico es una gran ventaja para su uso como marcador un contexto clínico.

2. Muestras biológicas adecuadas para la detección de suPAR o sus productos de escisión como marcador

suPAR, o sus productos de degradación (por ejemplo, D2D3), se pueden utilizar como marcador para fines diagnósticos, pronósticos y de predicción midiendo el nivel de suPAR o sus productos de escisión en un fluido biológico derivado de un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano o paciente, como se ilustra en los ejemplos del presente documento. suPAR y sus productos de escisión están presentes en todos los fluidos biológicos derivados de un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano, incluyendo líquido cefalorraquídeo, plasma, suero, sangre, orina, semen, saliva y esputo.

Cuando la muestra biológica es orina, las mediciones pueden basarse en el valor de suPAR/creatinina en orina de un sujeto, ya que se sabe que este valor se correlaciona considerablemente con la concentración de suPAR en una muestra de suero (plasma) derivada del mismo sujeto. Del mismo modo, los valores de suPAR/creatinina en orina de un paciente con VIH tratado con HAART está altamente correlacionada con la concentración de suPAR en muestras de suero (plasma) derivadas del mismo sujeto (Ejemplo 1). Por lo tanto, las muestras de orina también se pueden usar para la medición de suPAR, o sus productos de escisión, en un sujeto (incluyendo un paciente con VIH tratado con HAART), cuando el nivel medido en orina se normaliza para el contenido proteico (por ejemplo, usando creatinina). Estos valores normalizados se pueden emplear como marcador para los fines de diagnóstico, pronóstico o predicción de la presente invención.

3. Detección y cuantificación de suPAR y sus productos de escisión

Procedimientos precisos para medir el nivel de suPAR y/o de sus productos de escisión en un fluido biológico derivado de un sujeto incluyen procedimientos de inmunodetección, por ejemplo ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), que son especialmente adecuados, ya que dichos procedimientos son relativamente baratos y fáciles de realizar en el entorno clínico. Los ELISA se pueden adaptar para analizar un número de muestras tanto pequeño como grande e incluyen un formato de placa de ELISA con pocillos revestidos con anticuerpos específicos

de suPAR o adaptado a un formato de tira reactiva que incorpora todos los componentes del ensayo ELISA. Además, los niveles de suPAR se pueden medir mediante enfoques proteómicos, tales como transferencia de tipo western, Luminex, MALDI-TOF, HPLC y plataformas analizadoras inmunes automatizados, tales como Bayer Centaur, Abbott Architect, Abbott AxSym, Roche COBAS y Axis Shield Afinion.

4. suPAR como marcador para el diagnóstico de la inflamación de grado bajo y el síndrome metabólico en A) pacientes infectados por el VIH en tratamiento HAART y B) sujetos aparentemente sanos

La inflamación de grado bajo, como se ha definido anteriormente, es un estado subclínico en un sujeto aparentemente sano, que no presenta inflamación observable, sin embargo, en los cuales se puede detectar la activación inmunitaria, aunque a un nivel muy por debajo de lo observada en las infecciones agudas. Actualmente se usa la hsCRP (proteína reactiva con C), medida mediante pruebas sensibles disponibles, como un marcador de la inflamación de grado bajo en un sujeto.

Los marcadores para el diagnóstico de la inflamación de grado bajo en un sujeto tienen una importancia especial, ya que esta afección subclínica parece estar relacionada con el posterior desarrollo de enfermedades relacionadas con inflamación de grado bajo, como la diabetes tipo 2 y las ECV. El diagnóstico de la inflamación de grado bajo, en una población identificaría los miembros cuyo riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la inflamación de grado bajo deberían controlarse más.

A) Pacientes infectados por VIH en tratamiento con HAART, que muestran una acumulación de características dismetabólicas, tienen niveles elevados de suPAR, en comparación con los pacientes infectados por el VIH no lipodistróficos tratados del mismo modo (Ejemplo 1). Los niveles de suPAR en estos grupos de pacientes con VIH se correlacionaron positivamente con el recuento de leucocitos, linfocitos y monocitos, todos los cuales son células sanguíneas de particular importancia para la activación inmunitaria y el estado inflamatorio de un paciente. Estos datos, y la fuerte correlación positiva observada entre suPAR y TNF-α, identifican a suPAR como un nuevo y fuerte marcador diagnóstico de la inflamación de grado bajo en los pacientes infectados por el VIH.
Los niveles de suPAR en estos grupos de pacientes con VIH también se correlacionaron fuertemente con, respectivamente, la distribución de la grasa, la sensibilidad a la insulina y lipidemia, de modo que se identifica al suPAR como marcador del síndrome metabólico en estos pacientes. También se muestra que el uso de suPAR como marcador proporciona una predicción más fuerte de síndrome metabólico que los marcadores alternativos, TNF-α y la IL-6

B) El recuento de glóbulos blancos (GB, es decir, leucocitos) es un marcador de la activación inmunitaria y de la inflamación de grado bajo en la población general. En la población humana general, que comprende la cohorte Monica10, el nivel de suPAR y el recuento leucocitario se correlacionó considerablemente y se demostró que es independiente de la edad y del sexo (Ejemplo 4, Tabla 9; Ejemplo 5). Estos datos establecen suPAR como un nuevo marcador de la inflamación de grado bajo en la población general, que incluye a individuos aparentemente sanos. Además, los niveles de suPAR proporcionan un valioso marcador con el objetivo de estadificar el progreso de la inflamación de grado bajo en un sujeto. suPAR tiene aplicación como marcador para supervisar el riesgo de enfermedades relacionadas con la inflamación de grado bajo, ya que se ha demostrado que suPAR es un marcador de las enfermedades diabetes de tipo 2 y ECV. El cáncer es una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo para la cual os niveles de suPAR son un marcador útil. Esto es consistente con la observación de que los leucocitos (glóbulos blancos) son un marcador bien establecido de la inflamación, ligado al desarrollo del cáncer.

El síndrome metabólico se define por los 5 componentes siguientes: circunferencia de la cintura, niveles de la glucosa en ayunas, niveles bajos de HDL-colesterol, niveles elevados de triglicéridos en plasma, aumento de la presión arterial diastólica y/sistólica, de acuerdo con la definición del NCEP ATPIII 2001 con la modificación de la glucosa de 2004; (Grundy SM et al., 2005, Circulation 112:2735-2752).

En la población humana general, que comprende la cohorte Monica10, los niveles de suPAR se correlacionaron positivamente con el número de componentes del síndrome metabólico detectado en un individuo (Ejemplo 6). Este fue el caso de varones y mujeres en la población analizada y la asociación fue independiente de la edad del sujeto. Estos datos establecen suPAR como un nuevo marcador del síndrome metabólico en la población general, que incluye a individuos aparentemente sanos.

4. suPAR como marcador para predecir el riesgo de un sujeto aparentemente sano de desarrollar diabetes tipo 2.

Se ha mostrado que suPAR es un predictor independiente del riesgo de desarrollar diabetes (Ejemplo 5). En los análisis univariables y multivariables, los niveles altos de suPAR, la edad (mayor), el sexo (ser varón) y tener síndrome metabólico se asociaron significativamente con un mayor riesgo de desarrollar diabetes. Independientemente de la edad, el sexo y el síndrome metabólico, un aumento de 1 ng/ml de los niveles de suPAR se asoció con un incremento del riesgo del 28 % de desarrollar diabetes. El uso de suPAR como marcador para predecir el riesgo de desarrollar diabetes que permite que los individuos en riesgo mejoren sus posibilidades de

salud mediante el inicio de un curso profiláctico de la acción en un punto de tiempo suficientemente temprano.

También se demostró que los niveles de suPAR se correlacionan significativamente con un aumento de la glucosa en ayunas (Tabla 9). Ejemplo 5 demuestra que suPAR predice fuertemente la diabetes tipo 2. A partir de estas observaciones, se deduce que muy probablemente el suPAR es un fuerte marcador de la resistencia a la insulina, que es una causa subyacente del síndrome metabólico y la diabetes mellitus de tipo 2 (Grundy SM et al 2005, Circulation 112:2735-2752).

Como la prediabetes, en forma de, por ejemplo, alteración de la tolerancia a la glucosa, precede a la diabetes tipo 2 y es más prevalente en los individuos que presentan el síndrome metabólico que en los individuos que no tienen este síndrome, lo más probable es que suPAR sea a la vez un fuerte marcador y un fuerte predictor de la prediabetes y la tolerancia alterada a la glucosa en la población general. En apoyo de suPAR como fuerte marcador de la resistencia a la insulina es que esta asociación particular se ha demostrado en los individuos infectados por VIH en un régimen HAART estable mediante la medición de referencia de la sensibilidad a la insulina (Ejemplo 1, Figura 2A). También, una medida más sencilla de sensibilidad a la insulina, es decir, HOMA-IR, se asoció con suPAR (Figura 2B). Además, la correlación observada entre el nivel de suPAR en plasma y los niveles de glucosa en plasma a las 2 horas durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa en individuos infectados por el VIH en un régimen HAART estable (Figura 2C) confirma suPAR como un fuerte marcador de la tolerancia a la glucosa.

5. suPAR como marcador para predecir el riesgo en sujetos aparentemente sanos de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV) y cardiopatía isquémica (IHD)

Se ha demostrado que suPAR es un fuerte marcador de riesgo independiente de desarrollo de un acontecimiento de ECV en individuos aparentemente sanos, que no se correlaciona, lo hace solo débilmente, con predictores clásicos de desarrollo de ECV (Ejemplo 4). Independientemente de la edad, el sexo, el estado de tabaquismo y el síndrome metabólico, un aumento de 1 ng en los niveles de suPAR se asoció con un incremento del riesgo del 15,4 % de desarrollar ECV.

Los niveles de suPAR son un predictor significativo del riesgo de desarrollar una cardiopatía isquémica en individuos que no han experimentado previamente un infarto de miocardio agudo (Ejemplo 7). El SuPAR predijo el riesgo de CI de forma independiente de otros marcadores clásicos de la CI. En un análisis ajustado por edad, un incremento de 1 ng/ml en los niveles de suPAR se asoció con un mayor riesgo de CI del 21 %.

suPAR como un marcador para la predicción del riesgo de desarrollar tanto CVC como CI también da a un individuo en riesgo la posibilidad de iniciar un curso profiláctico de la acción en un punto de tiempo que es lo suficientemente temprano como para reducir el riesgo.

6. suPAR como marcador para predecir el riesgo de sujetos aparentemente sanos de desarrollar cáncer

Se ha mostrado que suPAR es un fuerte marcador independiente del riesgo de desarrollar cáncer en individuos aparentemente sanos (Ejemplo 10). Independientemente del sexo y la edad, un aumento de 1 ng de los niveles de suPAR se asoció con un cociente de riesgos instantáneos de un incremento del riesgo de 1,34 de desarrollar cáncer. Se hallaron asociaciones significativas dentro de los siguientes subgrupos de cáncer de cáncer de mama, leucemia, cáncer de próstata y cáncer de pulmón

suPAR como un marcador para la predicción del riesgo de desarrollar cáncer también da a un individuo en riesgo la posibilidad de iniciar un curso profiláctico de la acción en un punto de tiempo que es lo suficientemente temprano como para reducir el riesgo. El efecto de la intervención riesgo puede monitorizarse usando los niveles de suPAR. Una intervención eficaz bajará el nivel de suPAR.

7. suPAR como predictor de la supervivencia y la eficacia de la intervención del estilo de vida

Se ha demostrado que los niveles de suPAR en individuos aparentemente se asocian fuertemente con la mortalidad, independientemente de otros marcadores (Ejemplo 3). En el análisis multivariable, el nivel de suPAR fue el segundo marcador más fuerte de mortalidad, después de la edad.

Se demuestra el estilo de vida de un individuo aparentemente sano afecta a sus niveles de suPAR significativamente. En el caso del hábito de fumar, los fumadores tienen un impacto significativo su nivel de suPAR y sus perspectivas de supervivencia. Del mismo modo, el hábito de ejercicio tiene un impacto significativo en los niveles de suPAR en un individuo, en el que el nivel de ejercicio se asocia con niveles de suPAR inferiores. Por tanto, es evidente que las mediciones regulares de suPAR en un fluido biológico derivado de un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano, permitirían al médico guiar a su sujeto con respecto a su esperanza de vida basada en el estilo de vida actual, y la eficacia de los cambios del estilo de vida realizados en el curso profiláctico de la acción, por ejemplo, un programa de ejercicio físico puede ser propuesto por un médico. Del mismo modo, las mediciones regulares de suPAR permitirían al médico monitorizar la eficacia de la medicación, vigilar el cumplimiento del paciente en la toma de la medicación prescrita y vigila la eficacia de un tratamiento para prevenir o tratar las

enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, incluyendo CI, ECV y diabetes tipo 2.

8. suPAR como marcador para la vigilancia de la progresión de tratamiento del síndrome metabólico y/o de la inflamación de grado bajo

Los niveles de suPAR también pueden usarse para monitorizar el tratamiento del síndrome metabólico y/o de la enfermedad inflamatoria de grado bajo. Antes de comience el tratamiento se puede efectuar una medida de suPAR. Durante el tratamiento, las mediciones de suPAR pueden tomarse en varios puntos de tiempo. Una disminución de al menos aproximadamente el 10 % y/o 1 ng/ml sería indicativa de la efectividad de un protocolo de tratamiento, los niveles de suPAR pueden además medirse en diversos puntos temporales después del tratamiento.

9. Tratamiento del síndrome metabólico y/o de la inflamación de grado bajo

Las sustancias que disminuyen el nivel de suPAR en un sujeto mamífero se pueden utilizar para tratar el síndrome metabólico y/o la inflamación de grado bajo. En un aspecto particular, la sustancia puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal frente a suPAR. Tales anticuerpos se pueden obtener usando procedimientos conocidos en la técnica. Se pueden usar varios huéspedes e incluyen, entre otros, cabras, conejos, ratas, ratones, seres humanos, y otros. Estos huéspedes se pueden inmunizar mediante inyección con suPAR o fragmentos peptídicos que tienen una longitud mínima de 5-10 aminoácidos con propiedades inmunogénicas (véase, por ejemplo, el documento WO90/12091). Se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Entre dichos adyuvantes se incluyen adyuvantes de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias de superficie activa tales como isolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. El BCG (bacilo de Calmette- Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente preferibles en seres humanos. Las siguientes etapas se pueden usar para obtener dicho anticuerpo: (a) opcionalmente conjugar uPAR o una parte inmunogénica del mismo a una proteína portadora; (b) inmunizar un animal huésped con dicho polipéptido o conjugado polipéptido-transportador de la etapa (a) con un adyuvante y (c) obtener anticuerpos a partir de dicho animal huésped inmunizado. Preferentemente, cualquier anticuerpo que se utiliza se une al suPAR de longitud completa, no sólo a fragmentos de los mismos, tales como el fragmento D2D3.

Los anticuerpos monoclonales frente a dicho receptor o péptidos receptores se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, entre otras, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma con linfocitos B humanas y la técnica del hibridoma-EBV. Véase, por ejemplo, Kohler, et al., 1975, Nature 256: 495 - 497; Kozbor et al., 1985, J. Immunol. Methods 81: 31 - 42; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026 - 2030; Cole et al., 1984, Mol. Cell Biol. 62: 109 - 120. Específicamente, el procedimiento comprende las etapas siguientes: (a) inmunizar un animal con un péptido receptor inmunogénico; (b) aislar las células productoras de anticuerpos del animal; (c) fusionar las células productoras con células inmortalizadas en cultivo para formar células de hibridoma productoras de anticuerpos; (d) cultivar las células de hibridoma, y (e) aislar del cultivo los anticuerpos monoclonales que se unen a dicho polipéptido.

La especificidad antigénica es conferida por los dominios variables y es independiente de los dominios constantes, como se sabe a partir de experimentos que implican expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpos, conteniendo todos uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better et al (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv) en las que los dominios de V_H y V_L están unidos a través de un oligopéptido flexible (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 85, 5879) y anticuerpos de dominio único (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específicos se encuentra en Winter y Milstein (1991) Nature 349, 293-299. Por "moléculas ScFv", los inventores quieren decir moléculas en las que los dominios de pareja V_H y V_L están unidos a través de un oligopéptido flexible. Estas moléculas se pueden usar en la presente invención.

Se pueden usar varios inmunoensayos para la detección selectiva para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. En la técnica se conocen bien numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas. Tales inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejo entre el(los) polipéptido (s) y su anticuerpo específico.

Otras sustancias que pueden utilizarse para obtener agentes que disminuyen los niveles de suPAR incluyen, entre otros, un producto de escisión D2D3 y/u otro fragmento de suPAR. La sustancia también puede incluir, entre otros, un análogo de suPAR o derivado capaz de unirse a uPA. En un aspecto específico, dichas sustancias incluyen, entre otras, 1) uPAR que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una sustitución, una deleción, un truncamiento y/o una adición, 2) uPAR químicamente modificado tales como diferentes grados de glicosilación y 3) péptidos sintéticos que contienen parte de la secuencia de uPAR. Los análogos o fragmentos de suPAR son lo suficientemente grandes como para generar anticuerpos que reconocen suPAR humano, uPAR y/o fragmentos de

suPAR/uPAR. Tales análogos tendrán generalmente al menos 60 %, preferentemente al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la región más similar de suPAR humano.

Las formulaciones de las sustancias en composiciones farmacéuticas son bien conocidas en la técnica y se describen adicionalmente en Gennaro (ed.), 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000); y Ansel et al., 1999, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Tal composición contiene normalmente de aproximadamente del 0,1 al 90 % en peso (tal como aproximadamente del 1 al 20 % o aproximadamente del 1 al 10 %) de polipéptido o anticuerpo de la invención en un vehículo aceptado farmacéuticamente.

Se pueden preparar varias formulaciones líquidas y en polvo mediante procedimientos convencionales para inhalación en los pulmones del mamífero que se va a tratar.

Las formulaciones inyectables de las composiciones pueden contener diversos vehículos, tales como aceites vegetales, dimetilacetamida, dimetilformamida, lactato de etilo, carbonato de etilo, miristato de isopropilo, etanol, polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares). Para inyecciones intravenosas, las versiones solubles en agua de los compuestos se pueden administrar por el procedimiento de goteo, mediante el cual se infunde una formulación farmacéutica que contiene el agente antifúngico y un excipiente fisiológicamente aceptable. Excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, un 5 % de dextrosa, un 0,9 % de solución salina, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Preparaciones intramusculares, por ejemplo, una formulación estéril de una forma de sal soluble adecuada de los compuestos, se pueden disolver y administrarse en un excipiente farmacéutico tal como agua para inyectables, un 0,9 % de solución salina o solución de glucosa al 5 %. Una forma insoluble adecuada del compuesto puede prepararse y administrarse como una suspensión en una base acuosa o una base oleosa farmacéuticamente aceptable, tal como un éster de un ácido graso de cadena larga (por ejemplo, oleato de etilo).

El porcentaje óptimo del agente terapéutico en cada formulación farmacéutica varía de acuerdo con la propia formulación y el efecto terapéutico deseado en las patologías específicas y regímenes terapéuticos correlacionados.

Se pueden usar procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, para administrar composiciones para el paciente. Estos incluyen, entre otros, las vías subcutánea, intrapulmonar, transmucosa, intraperitoneal, intrauterina, sublingual, intratecal, o intramuscular usando procedimientos estándar. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente mediante vías de administración depot inyectables tales como mediante el uso de procedimientos y materiales biodegradables o inyectables depot a 1, 3 o 6-meses.

Independientemente de la vía de administración, la sustancia de la presente invención se administra normalmente a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal del paciente (por ejemplo, 1 mg/kg a 5 mg/kg). La formulación farmacéutica se puede administrar en dosis múltiples al día, si se desea, para conseguir la dosis diaria total deseada.

Se pueden usar procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, para administrar la(s) formulaciones farmacéutica(s) al paciente. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar solas, o en combinación con otros agentes terapéuticos o intervenciones. Específicamente, las composiciones pueden comprender además una pluralidad de agentes.

10. Herramientas basadas en suPAR para predecir enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, enfermedades relacionadas con la inflamación de grado bajo, el cáncer y/o la mortalidad en 10 años

Una combinación de factores, uno de los cuales es suPAR, son predictivos del riesgo de desarrollar ECV (incluyendo CI e IMA), diabetes tipo 2, cáncer y/o mortalidad en 10 años. Por ejemplo, la regresión logística escalonada inversa identifica los factores que tienen la significación estadística más alta en la determinación del resultado de una población de seres humanos grande y su riesgo de desarrollar cualquiera de estas enfermedades. La combinación de factores de predicción, o criterios, comprende un modelo que se puede emplear en forma de un algoritmo para predecir los riesgos para la salud individuales de un sujeto, tal como se establece en los Ejemplos 8 y 9. Pueden implementarse otros algoritmos para calcular el riesgo de mortalidad o el desarrollo de las enfermedades. Por ejemplo, en una realización alternativa, un algoritmo de análisis de riesgos puede incluir suPAR y edad, o suPAR, edad y sexo, o suPAR, la edad y el tabaquismo. El uso de estos factores como los valores de entrada del algoritmo, la puntuación de salida puede ser los diferentes porcentajes de riesgo en los próximos 5 años, 10 años o 5 años-10 años para las diferentes enfermedades. De este modo, cada enfermedad puede obtener un porcentaje de riesgo específico, tal como, por ejemplo:

Diabetes de tipo 2	Riesgo del 22 %
ECV	Riesgo del 19 %
Cáncer	Riesgo del 36 %
Mortalidad	Riesgo del 33 %

Para estimar aún más el riesgo específico para una persona, podrían, por ejemplo, medirse los siguientes parámetros y usarse como valores de entrada en un cálculo adicional de riesgo:

Para la diabetes de tipo 2	Glucosa en sangre en ayunas
Para ECV	presión arterial, HDL-colesterol, LDL-colesterol, colesterol total, triglicéridos
Para cáncer	tabaquismo, edad
Para la mortalidad	Concentraciones de NT-proBNP

El fragmento en N-terminal del péptido natriurético de tipo cerebral en el contexto de diagnosticar el riesgo de desarrollar cáncer, la invención puede tener una utilidad particular en relación con las mujeres que pertenecen a una familia con cáncer de mama hereditario y/o que se ha demostrado que tienen un marcador genético asociado con el cáncer, como las mutaciones BRCA1 y BRCA2.

La combinación descrita de factores de predicción puede usarse en la fabricación de un medio legible por ordenador para introducir mediciones del factor de predicción determinado y medios para calcular y proporcionar el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico y/o enfermedades relacionados con la inflamación de grado bajo, por ejemplo, ECV (incluyendo CI e IAM), diabetes tipo 2, el desarrollo de cáncer y/o la mortalidad en un año, tres años, cinco años, 10 años o 1-5 años, 1-10 años, cinco años, diez años.

Con el fin de llegar a una predicción para un paciente dado, el médico realiza una serie de mediciones, incluyendo la medición de los suPAR en una muestra, por ejemplo un fluido biológico, derivado del paciente, e introduce los valores determinados en una lógica del ordenador para recibir información de la prueba que comprende el nivel o la cantidad relativa de una proteína que es suPAR y/o un productos de escisión D2D3 de los mismos en un fluido biológico derivado de un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano, y además uno o más parámetros del factor de predicción obtenida de dicho sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano, la ejecución de la lógica del ordenador para el análisis del nivel o la cantidad relativa de dicha proteína en dicho fluido biológico, y dichos uno o más parámetros, en el que la lógica del ordenador analiza los valores determinados introducidos y calcula el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, la enfermedad relacionado con la inflamación de grado bajo, desarrollar cáncer y/o mortalidad en un año, tres años, cinco años, 10 años o uno y cinco años, uno de diez años, cinco años, diez años.

El uso de un ordenador que comprende dicho medio legible por ordenador permitiría al médico predecir el riesgo de desarrollar ECV (incluyendo CI e IAM) y/o diabetes tipo 2 en un sujeto mamífero, en particular, un ser humano, así como supervisar la eficacia de los medicamentos y el cumplimiento del paciente en la toma de la medicación prescrita, en el curso del tratamiento para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, incluyendo ECV (incluyendo CI e IAM), diabetes tipo 2.

El uso de un ordenador que comprende dicho medio legible por ordenador puede también permitir al médico predecir el riesgo de desarrollar cáncer y/o la mortalidad en un año, tres años, cinco años, 10 años o uno y cinco años, uno de diez años, de cinco años, diez años en un mamífero, en particular un sujeto humano.

Uno de tales equipos que puede usarse es un ordenador cliente, por ejemplo en la consulta del médico, para proporcionar acceso a un sistema de cálculo de riesgo para la determinación del riesgo y/o cambio en el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo, cáncer y/o mortalidad en. por ejemplo, un año, cinco años, diez años, 1-5 años, 1-10 años o cinco años-diez años, que comprenda:

(a) un medio de almacenamiento de datos legible por ordenador configurado para almacenar un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por ordenador, en el que dichos datos comprende una o más mediciones derivadas de una o más muestras de un sujeto mamífero en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR;
(b) un medio de almacenamiento que tiene almacenado en el mismo instrucciones para el procesamiento de dichos datos legibles por ordenador;
(c) una unidad central de procesamiento que responde a dichas instrucciones acopladas a dicho medio de almacenamiento y a dicho medio de almacenamiento de datos legible por ordenador para el procesamiento de datos legibles por ordenador en la medición del riesgo y los valores de progresión del tratamiento; y

(d) un dispositivo de salida acoplado a dicha unidad central de procesamiento de (c) para la salida de dichos valores de riesgo y/o cambio de riesgo.

Como alternativa, el equipo cliente comprende: un dispositivo de entrada para recibir una o más mediciones derivadas de un sujeto mamífero en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto; una interfaz de comunicaciones para la comunicación de las una o más mediciones recibidas a un ordenador servidor configurado para analizar dichas una o más mediciones de la etapa (a), y calcular un valor de riesgo, y una interfaz de comunicaciones para recibir, desde el ordenador servidor un valor de riesgo calculado.

El dispositivo de salida puede incluir cualquier dispositivo o circuito adecuado para la salida de datos. Ejemplos de tales dispositivos incluyen dispositivos de salida para presentar los datos en una forma legible por el usuario, tales como una pantalla, una impresora, y/o similares. Como alternativa o adicionalmente, el dispositivo de salida puede incluir una interfaz de comunicaciones para la comunicación de los datos a uno o más de otros dispositivos, por ejemplo, ordenadores. Por ejemplo, la interfaz de comunicaciones puede incluir un puerto serie, un puerto USB, un puerto paralelo, un interfaz de comunicaciones inalámbricas de corto alcance, por ejemplo, un puerto de infrarrojos (por ejemplo, IrDa), un transmisor-receptor de Bluetooth, o similares. Otros ejemplos de circuitos de interfaz incluyen una tarjeta de red, un módem DSL, un equipo de puerta de enlace, un circuito de comunicaciones inalámbricas de telecomunicaciones celulares, o similar. Sin embargo, otros ejemplos de dispositivos de salida incluyen dispositivos o circuitos para la escritura de los datos en un medio legible por ordenador, tal como una unidad de disco, una interfaz de tarjeta de memoria, y/o similares.

Por ejemplo, el sistema de procesamiento de datos para procesar los datos legibles por ordenador puede comprender un ordenador de servidor o de otro sistema de procesamiento de datos que tiene acceso a la interfaz de comunicaciones. En algunas realizaciones, la funcionalidad del sistema de cálculo del riesgo descrito en el presente documento se puede distribuir entre una pluralidad de ordenadores, por ejemplo, los ordenadores conectados a través de una red informática, por ejemplo, una red de área local, una red de área amplia, una Internet o similares

El dispositivo de entrada puede incluir cualquier dispositivo o los circuitos adecuados para la recepción de datos, tales como una interfaz de usuario, por ejemplo, un teclado, una interfaz gráfica de usuario, un dispositivo de señalización, y/o similares. Otros ejemplos de dispositivos de entrada incluyen interfaces de comunicaciones como se describe en el presente documento y dispositivos o circuitos para la lectura de datos desde un medio de almacenamiento, tal como una unidad de disco, un lector de tarjeta de memoria, y/o similares.

Ejemplos

Ejemplo 1: suPAR es un marcador de la inflamación de grado bajo y de síndrome metabólico (dismetabolismo) en pacientes infectados por VIH

Recientemente se ha descubierto que los individuos infectados por VIH tratados con HAART desarrollan dismetabolismo, que es una forma de síndrome metabólico similar al observado en personas no infectadas, pero dentro de un marco de tiempo más corto. El siguiente estudio en pacientes con VIH demuestra la utilidad de **suPAR** como un marcador para el síndrome metabólico y muestra que este marcador tiene una potencia predictora más fuerte que los marcadores, IL-6 y TNF-α para el síndrome metabólico en este grupo de pacientes.

Grupos de pacientes. En una cohorte de 36 pacientes varones infectados por VIH que reciben HAART se estimaron los niveles de suPAR en ayunas durante la noche (Andersen et al., 2003, Metabolismo 52:1343-1353). Esta cohorte comprende 18 pacientes con lipodistrofia (LIPO), un marcador del síndrome metabólico en pacientes con VIH y 18 sin ningún tipo de manifestación del síndrome metabólico (NOLIPO) juzgado mediante una investigación clínica y un cuestionario, ambos descritos por (Andersen et al., 2003, Metabolismo 52:1343-1353). Todos los pacientes habían recibido HAART durante al menos 12 meses antes del examen, tenían un peso estable, y carecían de cualquier episodio de infección aguda en los tres meses anteriores a su exploración. Todos los participantes eran de raza blanca, excepto dos NOLIPO (negros africanos). Los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Copenhague, Dinamarca, y se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki II.

Protocolo: Los datos obtenidos de la técnica de pinzamiento hiperinsulinémico (40 mU $m^{-2} \cdot Min^{-1}$) euglucémico (5,0 mM) que incluyen una técnica marcadora de glucosa y calorimetría indirecta proporcionaron estimaciones de la sensibilidad a la insulina (Rd) y la tasa de eliminación de glucosa no oxidativa (NOGM) de los 18 pacientes LIPO y los 18 pacientes NOLIPO, como describen (Haugaard et al. 2005, Eur J. Endocrinol. 152:103 - 112). En cinco pacientes varones infectados por VIH tratados con HAART se determinaron sus niveles circadianos de suPAR plasma circadiano obteniendo sangre venosa de forma continua durante períodos de 20 min (6 ml/h) durante 24 horas a partir de las 08:00 de la mañana después de ayunar durante la noche (bomba de extracción de sangre constante de tipo 3003, Swemed LAB, International AB, V. Frölunda, Suecia). Las muestras se extrajeron de un catéter (insertado en la vena antecubital izquierda) en tubos de ensayo sin conservantes y se dejaron coagular

durante 1 hora a 25 °C, y, posteriormente, se centrifugaron a 4 °C. El suero se almacenó a -80 °C para su posterior análisis. A estos 5 pacientes se les sirvieron las comidas a las 9:00, las 12:30 y las 18:00. Se proporcionó un aperitivo a las 15:00 y a las 21:00. No se les permitió dormir antas de la hora de acostarse a las 22:30. Se les permitió pasear en el área del hospital, aunque se les prohibió el ejercicio como tal.

Para comprobar si suPAR en plasma en pacientes infectados por VIH tratados con HAART estable puede correlacionar con suPAR en orina, como se ha demostrado previamente en individuos negativos para el VIH (Sier et al., 1999, Lab Invest 79:717-722) se obtuvo una submuestra de orina en ayunas durante la noche de 24 de los 36 pacientes. El efecto de las diferencias en la dilución de la orina en los niveles de suPAR se corrigió con la cantidad de creatinina, como se describió previamente (Sier et al., 1999, Lab Invest 79:717-722). Los niveles de creatinina en orina se midieron como se ha descrito (Mustjoki et al., 2000, Cancer Res. 60:7126-7132)

Medición de suPAR: Los niveles de suPAR se determinaron mediante ensayo ELISA de la siguiente manera: Las placas de ELISA Nunc Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se revistieron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo anti-suPAR monoclonal de rata (VG-1, ViroGates A/S, Copenhague, Dinamarca, 3 µg/ml, 100 µl/pocillo). Las placas se bloquearon con tampón de PBS + 1 % de BSA y 0,1 % de Tween 20, 1 hora a TA, y se lavaron 3 veces con tampón PBS que contenía 0,1 % de Tween 20. 85 µl del tampón de dilución (100 mm de fosfato, 97,5 mm de NaCl, 10 gl^{-1} de seroalbúmina bovina (BSA, Fracción V, Boehringer Mannheim, Penzberg, Alemania), 50 U ml^{-1} de sal de sodio de heparina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,1 % (v/v) de Tween-20, pH 7,4) que contiene 1,5 µg//ml de anticuerpo anti-ratón marcado con HRP frente a suPAR (VG-2-HRP, ViroGates) y 15µl de la muestra de plasma (o de orina) se añadió por duplicado a la placa ELISA. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, las placas se lavaron 10 veces con tampón PBS + 0,1 % de Tween 20 y 100 µl//pocillo de sustrato de HRP añadido (paquete de reactivo de sustrato, R & D Systems Minneapolis, Minnesota). La reacción de color se detuvo después de 30 minutos usando 50µl/ pocillo de H_2SO_4 1M y se midió a 450 nm. La variación dentro del ensayo fue de 9,6 % y la variación entre ensayos 12,4 %. Los niveles de suPAR en plasma en ayunas se midieron en los 36 pacientes infectados por VIH en tratamiento con HAART.

Otros ensayos: La medición de la glucosa en plasma, insulina, péptido C, ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos incluyendo parámetros inmunológicos y hematológicos se realizó como describen (Andersen et al., 2003, Metabolismo 52:1343-1353; Haugaard et al., 2005, Eur J Endocrinol 152:103-112; Lihn et al, 2003, Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E1072-E1080). La composición corporal se estimó mediante barrido de absorciometría dual de rayos X (DEXA) (XR-36; Sistema Médico de Norland, Fort Atkinson, WI) y la distribución regional de la grasa se determinó como se ha descrito anteriormente (Andersen et al., 2003, Metabolismo 52:1343-1353).

Cálculos: La tasa de eliminación de glucosa total (Rd) se calculó utilizando las ecuaciones de estado no estacionario de Steele adaptadas para infusiones de glucosa marcadas (Hother-Nielsen et al., 1996, Metabolismo 45:82-91). El volumen de distribución de la glucosa se tomó como 200 ml/kg peso corporal y la fracción acumulada como 0,65. La tasa de oxidación de la glucosa (GOX) se calcula a partir de ecuaciones validadas (Frayn, 1983, J Appl Physiol 55:628-634). La NOGM se calculó como la diferencia entre Rd y GOX.

Análisis estadístico: Los datos se presentan como las medias ± SEM y como las medianas y los rangos intercuartílicos cuando se sesgan las distribuciones. El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó para comparar la distribución de datos entre LIPO y NOLIPO. Dado que la edad era ligeramente mayor en pacientes con LIPO frente a los NOLIPO, la edad se ajustó mediante el cálculo de las correlaciones parciales. Si se sesgó la distribución de datos, los datos se transformaron con log antes de aplicar el ANOVA. Se aplicaron el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el coeficiente de correlación de Spearman (p) para estimar las asociaciones entre variables, cuando proceda. Se usó un modelo de regresión lineal múltiple para analizar la solidez de suPAR como variable explicativa para los parámetros dismetabólicos. Los cálculos se realizaron mediante SPSS (SPSS ver. 12,0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.). Los valores P bilaterales inferiores a 0,05 se definieron como estadísticamente significativos. Se observó una tendencia si P era mayor o igual a 0,05 pero inferior a 0,2.

Resultados:

A. Los niveles de suPAR están fuertemente correlacionados con la inflamación de grado bajo y el síndrome metabólico en pacientes con VIH

Los niveles de suPAR se pudieron medir en los 36 pacientes, con una mediana del nivel en plasma de suPAR de 2,52 ng/ml (intervalo 0,38 - 19,25). Dado que los niveles de suPAR mostraron una correlación positiva significativa con la edad ($r = 0,60$, $P < 0,001$), las comparaciones entre los grupos de estudio y los análisis de correlación se corrigieron para la edad (Tabla 1 y Tabla 2). La mediana de suPAR en plasma se multiplicó por 2 en pacientes LIPO en comparación con pacientes NOLIPO ($P < 0,005$), aunque la diferencia se atenuó después de ajustar según la edad (Figura 1, Tabla 1).

Tabla 1. Antropometría, lipidemia, sensibilidad a la insulina e inmunología de los grupos de estudio

	LIPO	NOLIPO	P
Número	18	18	
Edad (años)	50 (2)	43 (2)	< 0,05
IMC (kg/m^2)	24,7 (0,6)	22,6 (0,8)	< 0,05
Masa grasa total (kg)	16 (1)	13 (2)	0,13
Masa magra total(kg)	61 (2)	54 (2)	< 0,05[a]
Grasa de las extremidades (%)	36 (1)	46 (2)	< 0,0001[c]
$Rd_{pinzamiento}$ (mg min^{-1} kg_{FFM}^{-1})	5,9 (0,5)	8,9 (0,6)	< 0,001[b]
$NOGM_{pinzamiento}$ (mg min^{-1} kg_{FFM}^{-1})	2,5 (0,4)	4,9 (0,5)	< 0,005[a]
$GOX_{pinzamiento}$ (mg min^{-1} kg_{FFM}^{-1})	3,3 (0,2)	4,0 (0,3)	0,056[a]
fP-insulina (mmol/l)	77 (11)	32 (4)	< 0,001[b]
fP-glucosa (mmol/l)	4,9 (0,1)	4,8 (0,1)	ns
fP-total colesterol (mmol/l)	6,2 (0,4)	4,8 (0,2)	< 0,01[a]
fP-no HDL colesterol (mmol/l)	5,2 (0,4)	3,8 (0,2)	< 0,01[a]
fP-TG (log10 mmol/ml)	0,47 (0,08)	0,30 (0,06)	0,09
fP-suPAR (log10 ng/ml)	0,56 (0,07)	0,20 (0,09)	< 0,005[#]
fP-TNF-α (log10 pg/ml)	0,42 (0,06)	0,32 (0,07)	ns
fP-IL-6 (log 10 pg/ml)	0,54 (0,06)	0,46 (0,06)	ns
Hemoglobina (mmol/l)	8,8 (0,2)	8,6 (0,2)	ns
Leucocitos (10^9/L)	7,2 (6,0 - 9,0)	5,6 (4,6 - 6,5)	< 0,05
Neutrófilos (10^9/L)	3,4 (2,5 - 4,8)	3,1 (2,1 - 4,3)	ns
Linfocitos (10^9/L)	2,1 (0,2)	1,6 (0,1)	< 0,05[a]
Monocitos (10^9/L)	0,57 (0,06)	0,43 (0,06)	0,14
CD4 (células/µl)	427 (45)	352 (46)	ns
ARN del VIH (copias/ml)	< 20 (< 20, 70)	< 20 (< 20, < 20)	ns
CD4 nadir (células/µl)	130 (25)	123 (32)	ns
Pico del ARN del VIH (log de copias/m)	4,85 (0,33)	5,05 (0,15)	ns
Duración de la infección por VIH (m)	99 (14)	72 (11)	0,16
Duración de la terapia con NRTI (m)	47 (7)	42 (6)	ns
Duración de la terapia con IP (m)	32 (4)	25 (4)	0,16
Clasificación CDC: número A/B/C	6/6/6	4/5/9	ns

Media (SEM) o mediana (rango intercuartílico);[a], P < 0,05; [b], P <0,01; [c], P <0,001, después del ajuste por edad (años); [#], P = 0,06 después del ajuste por edad; grasa en las extremidades (%) (masa grasa en las extremidades + masa grasa en el tronco; Rd es la eliminación de glucosa según las estimaciones del pinzamiento hiperinsulinémico euglucémico usando la técnica de rastreo de glucosa , Rd menos GOX (tasa de oxidación de la glucosa) es la tasa del metabolismo no oxidativo de la glucosa (NOGM). fP, plasma en ayunas; clasificación de los CDC: clasificado de acuerdo con el sistema de clasificación de estadios clínicos A, B y C de los Centros para el Control y Prevención de las enfermedades, en los que C indica diagnóstico de SIDA.

Los pacientes LIPO fueron ligeramente mayores de media que los NOLIPO y tenían un IMC ligeramente superior atribuible a un incremento de la masa corporal magra, mientras que la masa grasa total no difirió significativamente entre los grupos de estudio (Tabla 1). El porcentaje de grasa en las extremidades se redujo significativamente en los pacientes LIPO en comparación con los NOLIPO, consistente con la lipodistrofia en los pacientes LIPO. Varias características dismetabólicas fueron evidentes en pacientes LIPO, a pesar de que sus niveles de glucosa en ayunas son normales. Los pacientes LIPO mostraron una menor eliminación de glucosa estimulada por la insulina tanto en la vía oxidativa como no oxidativa en comparación con los pacientes NOLIPO. Los recuentos de insulina en ayunas, colesterol no HDL, leucocitos totales, linfocitos y monocitos aumentaron en pacientes LIPO. Los niveles en plasma de TNF-α y de IL-6 aumentaron en pacientes LIPO, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La duración de la infección por VIH, la duración de la HAART y el número de células CD4 no difirió significativamente entre los grupos de estudio. El ARN del VIH se suprimido completamente en ambos grupos de estudio (Tabla 1). La clasificación de los pacientes de acuerdo con el sistema de clasificación de estadios clínicos A,

B y C de los Centros para el Control y Prevención de las enfermedades, en los que C indica diagnóstico de SIDA no reveló diferencias significativas entre pacientes LIPO y pacientes NOLIPO (Tabla 1).

Todos pacientes LIPO y pacientes NOLIPO recibieron tratamiento con inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NRTI) como parte de la terapia HAART, que fueron respectivamente: lamivudina (83 %, 83 %), zidovudina (39 %, 50 %), estavudina (56 %, 39 %) y didanosina (6 %, 11 %). Los inhibidores de la proteasa (IP) VIH-1 fueron utilizados por el 89 % de los pacientes LIPO y NOLIPO, es decir indinavir (44 %, 22 %), ritonavir (22 %, 39 %), nelfinavir (22 %, 22 %), y saquinavir (17 %, 11 %), respectivamente.

Los análisis de correlación univariable revelaron que suPAR se correlacionaba con los siguientes parámetros relacionados con dismetabolismo.

1) suPAR se correlacionó muy significativamente con las medidas de la distribución de la grasa, la sensibilidad a la insulina y lipidemia independientemente de la edad, en todos los pacientes (n = 36, Figura 2 y la Tabla 2)
2) suPAR se correlacionó fuerte y positivamente con TNF-α que une suPAR a un mediador clave de la inflamación. Sorprendentemente se encontró que suPAR era un predictor más fuerte que el TNF-α de la distribución de la grasa, la sensibilidad a la insulina y el colesterol total (Tabla 2 y Tabla 3)
3) suPAR se correlacionó positivamente con leucocitos, linfocitos, y monocitos de modo que se establece una asociación con las células sanguíneas de importancia para la activación inmune y el estado inflamatorio del paciente (Tabla 4).

Tabla 2. Coeficientes de correlación lineal entre suPAR y los parámetros de distribución de la grasa, la sensibilidad a la insulina, lipidemia e inmunología

n = 36	**Valor r de suPAR**	**P**
Grasas de las extremidades (%)	-0,48	< 0,005[b]
Índice de masa corporal	0,19	ns
Masa grasa total (% del PC)	0,11	ns
$Rd_{pinzamiento}$	-0,58	< 0,001[a]
$NOGM_{pinzamiento}$	-0,66	< 0,001 [b]
$GOX_{pinzamiento}$	0,03	ns
fP-Insulina	0,58	< 0,001 [b]
fP-glucosa	-0,11	ns
Colesterol total	0,54	< 0,001 [a]
Colesterol no HDL	0,51	< 0,005 [a]
Triglicéridos	0,22	0,19
TNF-α	0,54	< 0,001 [b]
IL-6	0,26	0,13
CD4	0,06	ns
Duración de la infección por VIH	0,20	ns
Duración del tratamiento con NRTI	0,07	ns
Duración del tratamiento con IP	0,14	ns
Nadir CD4	-0,20	ns
Pico de ARN del VH	-0,24	0,17

Las abreviaturas se dan en la Tabla 1; [a], P < 0,05; [b], P < 0,01 después del ajuste por edad (años); suPAR, triglicéridos, TNF-α, IL-6 y el pico de ARN de VIH se transformaron con log para obtener una distribución normal de estos parámetros.

Tabla 3. Coeficientes de correlación lineal entre TNF-α e IL-6 frente a los parámetros de distribución de la grasa, la sensibilidad a la insulina, lipidemia e inmunología

n = 36	**Valor r del TNF-α**	**P**	**IL-6**	**Valor r P**
Grasas de las extremidades (%)	-0,34	< 0,05	0,08	ns
$Rd_{pinzamiento}$	-0,25	0,15	-0,13	ns
$NOGM_{pinzamiento}$	-0,17	ns	-0,33	< 0,05
Colesterol total	0,44	< 0,01 [a]	0,14	ns
Colesterol no HDL	0,49	< 0,005 [a]	0,07	ns
Triglicéridos	0,53	< 0,001[c]	-0,03	ns

Las abreviaturas se dan en la Tabla 1; [a], P < 0,05; [b], P < 0,001 después del ajuste por edad (años); suPAR, triglicéridos, TNF-α, IL-6 y el incremento relativo de CD4 se transformaron con log para obtener una distribución normal de estos parámetros.

Tabla 4. Correlaciones univariables (p de Spearman p) entre suPAR y células de la sangre, que son activadores de la respuesta inmunitaria e inflamatoria

n = 36	**ρ**
Correlaciones entre suPAR y:	
Leucocitos	0,48**
Neutrófilos	0,18
Linfocitos	0,51**
Monocitos	0,34*

* P < 0,05; ** P < 0,01

Se realizaron análisis de regresión múltiple para demostrar que suPAR es un marcador sólido de parámetros clave de dismetabolismo. El metabolismo no oxidativo de la glucosa se mantuvo fuertemente correlacionado con suPAR (R^2= 0.43, P < 0,001) en un modelo en el que se incluyeron suPAR, la edad, el TNF-α, IL-6, triglicéridos en ayunas y colesterol no HDL. La mayor parte de la variación del colesterol no HDL se podría explicar por los niveles de triglicéridos en ayunas y suPAR (R^2= 0,69, P < 0,0001) en un modelo en el que también se incluyeron la edad, el TNF-α, y la IL-6 como variables explicativas. Además, suPAR se mantuvo como marcador importante de Rd (R^2= 0.33, P < 0,001) en un modelo, que incluía suPAR, la edad, el TNF-α e IL-6.

La Figura 3 muestra que los niveles de suPAR en plasma en ayunas y de suPAR en orina están altamente correlacionados en los pacientes infectados por VIH que en tratamiento con HAART estable. Dado que se ha mostrado que suPAR en orina es una estimación sólida de suPAR del plasma, el nivel de suPAR se puede realizar en la orina, así como en muestras de plasma de tales individuos. Anteriormente se ha demostrado que el suPAR en orina corregido para la creatinina en orina se correlaciona positivamente y fuertemente con suPAR en plasma en individuos sanos, y que los cambios diurnos en la orina de suPAR son pequeños (Sier et al. 1999, Lab Invest 79:717 - 722).

Los presentes datos indican que los cambios circadianos en la concentración plasmática de suPAR en pacientes infectados por VIH que reciben HAART estable limitados (Figura 4).

Conclusión: Los datos muestran que los pacientes infectados por VIH en tratamiento con HAART, que presentan una acumulación de características dismetabólicas, son aquellos con niveles relativamente elevados de suPAR, en comparación con los pacientes infectados por el VIH no lipodistróficos tratados del mismo modo. El hecho de que los niveles de suPAR están fuertemente correlacionados con, respectivamente, el número de células blancas de la sangre, el TNF-α, la distribución de grasa, sensibilidad a la insulina y la lipidemia, se hace hincapié en que suPAR es un enlace importante entre la constitución inmune y el metabolismo en estos pacientes. Los datos actuales muestran que suPAR es un marcador más fuerte de síndrome metabólico en este grupo de pacientes que el TNF-α y la IL-6

La fuerte correlación positiva observada entre suPAR y TNF-α, que se observó en el presente ejemplo, muestran que suPAR es un nuevo marcador de un estado inflamatorio de bajo grado en los pacientes infectados por el VIH en régimen HAART estable, y, por lo tanto, diagnóstico para esta afección. Por otra parte, se observó en el presente estudio que suPAR se correlacionaba positivamente con leucocitos, linfocitos y monocitos, que son en sí mismos marcadores y efectores de la inflamación de bajo grado. La densidad de uPAR en la superficie celular de estas células de la sangre es alta, y se cree que mucho de suPAR en plasma se origina a partir de estas células, lo que sería coherente con los datos actuales.

En estudios epidemiológicos anteriores se ha demostrado que el recuento total de leucocitos y el recuento de linfocitos que se correlacionan inversamente con la resistencia a la insulina y que se asocian con un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Se sugiere que la activación crónica del sistema inmune puede desempeñar un papel en la patogenia de la diabetes tipo 2. Los datos del presente estudio de pacientes con VIH LIPO/NOLIPO VIH muestran que suPAR es un nuevo marcador de la inflamación de bajo grado y el síndrome metabólico, lo que apoya la conclusión de que la inflamación de bajo grado es un factor determinante en el desarrollo del síndrome metabólico y, con ello de las enfermedades asociadas el síndrome metabólico, incluyendo la diabetes 2 y enfermedades cardiovasculares en pacientes con VIH.

Ejemplo 2. suPAR lleva valor de predicción en individuos sanos

Se ha demostrado que los niveles de suPAR son predictor de la esperanza de vida global

Grupo de población: La cohorte MONICA 10: En 1982-1984, 4.807 personas, de 30, 40, 50 o 60 años de edad seleccionadas al azar de la población que vive en las cercanías del Hospital Universitario Glostrup, Dinamarca, fueron invitados a participar en una encuesta de población. En 1993 a 1994, se volvió a invitar a 4444 y 2656 vinieron y participaron en investigaciones posteriores y donaron sangre. 2605 muestras de plasma de 1993-1994 estaban disponibles para el estudio.

Medición de suPAR: SuPAR se midió utilizando el kit de suPARnostic ™ (ViroGates, Copenhague, Dinamarca), tal como se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, el kit comprende una placa de ELISA pre-revestida con anticuerpo monoclonal de captura. De acuerdo con el protocolo, se añadió un anticuerpo monoclonal de detección marcado con HRP para el tampón de dilución de la muestra. A continuación, 25 µl de la muestra de plasma se mezcló con 225 µl de tampón de dilución y alícuotas de 100 µl (por duplicado) se alicuotaron en los pocillos de la placa ELISA y se incubaron durante una hora. A continuación, la placa ELISA se lavó y después se añadieron 50 µl de sustrato durante 20 minutos y la reacción se detuvo con 50 µl de H_2SO_4 0,5M. Las placas se midieron a 450 nm. La variación dentro del ensayo del kit fue del 2,75 % y la variación entre ensayos del 9,17 %. Se midieron 2605 muestras. La curva estándar del kit fue se validó para medir los niveles de suPAR entre 0,6 a 22,0 ng/ml. Tres muestras dieron niveles de suPAR por debajo de (2) o por encima (1) del intervalo validado y se excluyeron de los resultados.

Análisis estadístico: La supervivencia se analizó mediante análisis univariable y multivariable de regresión de Cox y el análisis de Kaplan-Meier. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. Para el análisis se usó la versión 13 del software estadístico SPSS. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados:

Niveles de suPAR como un predictor de la supervivencia global: La mediana suPAR en los 2.602 individuos fue de 4,03 ml de plasma/ng (intervalo 1,3 a 19,9). Los niveles de suPAR aumentaron con la edad y eran más altos entre las mujeres (N = 1292, mediana de suPAR 4,26, intervalo 1,9-19,9) en comparación con los varones (N = 1,310, mediana de suPAR 3,84, intervalo 1,3-17,8), p <0,001 (Figura 5A

Supervivencia global: durante el seguimiento > 10 años, 391 individuos murieron y 13 se perdieron para el seguimiento, Mediante un análisis de regresión de Cox, niveles altos de suPAR se asociaron significativamente con un mayor riesgo de mortalidad durante el seguimiento (N = 2,602, HR = 1,30 ng por aumento suPAR, IC del 95 %: 1,25 - 1,34). suPAR se asoció con la supervivencia en varones (N = 1310, RH = 1,41, IC del 95 %: 1,35 - 1,47) y mujeres (1292, RH = 1,23, IC del 95 %: 1,16 - 1,31).

Análisis univariable y multivariable de análisis: Otros marcadores que se asociaron con la supervivencia fue la edad (HR por cada año mayor = 1,10, IC del 95 %: 1,09 - 1,14) y colesterol LDL (RH = 1,002 por unidad de aumento, IC del 95 %: 1.001 - 1.002) y no fumadores (RH = 0,79, IC del 95 %: 0,72 - 0,88) y el sexo (RH = 0,613 mujeres frente a varones, IC del 95 %: 0,50 - 0,75). Cuando todos los marcadores significativos en el análisis univariable se incluyeron en el análisis multivariable, suPAR siguió siendo un predictor significativo e independiente de mortalidad (Tabla 5, RH por ng de incremento de suPAR 1,22, IC del 95 %: 1,67 - 1,28).

Tabla 5: Análisis multivariable ajustado por edad

	Variables en la ecuación				
	Wald	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para Exp (B)	
				Inferior	Superior
SuPAR (por ng/ml de incremento)	73,5	0,000	1,219	1,165	1,275
Sexo	28,7	0,000	1,780	1,441	2,197
Edad (por año mayor)	248,1	0,000	1,102	1,088	1,115
Fumador regular	36,3	0,000	1,884	1,534	2,315
Colesterol- LDL (mmol/l)	0,75	0,385	0,955	0,861	1,060

Análisis de Kaplan-Meier: Con el fin de visualizar el impacto de suPAR sobre la supervivencia, los valores de suPAR se dividieron en 3 grupos de igual tamaño; un grupo de suPAR bajo (N = 867, intervalo suPAR 1,34 - 3,590 ng/ml), un grupo de suPAR medio (N = 868, intervalo 3,591 a 4,56) y un grupo de suPAR alto (N = 867, intervalo de 4,57 -. 19,4). El análisis de Kaplan-Meier mostró diferencias significativas en la supervivencia entre los 3 grupos, se midió que la mortalidad aumenta con el incremento de los niveles de suPAR ($p < 0,001$). Del mismo modo, este fue el caso cuando se divide en 4 grupos (Figura 5).

Conclusión: Se ha demostrado que los niveles de suPAR en individuos aparentemente se asocian fuertemente con la mortalidad, independientemente de otros marcadores. De acuerdo con el valor de Wald obtenido en el análisis multivariable (Tabla 5), el nivel de suPAR fue el segundo marcador más fuerte de mortalidad, después de la edad. Por lo tanto, para una edad, sexo y estado de tabaquismo dados, los niveles de suPAR predicen significativamente el riesgo de mortalidad.

Ejemplo 3. suPAR como un marcador de la eficacia de la intervención

Este ejemplo demuestra la influencia de la intervención del estilo de vida sobre los niveles de suPAR y el riesgo de enfermedad previsto de este modo de un individuo.

Grupo de población: Cohorte MONICA 10 como se define anteriormente en el Ejemplo 2.

Procedimientos: Los niveles de SuPAR se midieron como se describe en el Ejemplo 2.

Estadística: La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. La supervivencia se analizó mediante análisis de regresión de Cox.

Resultados:

SuPAR se asocia significativamente con el hábito de tabaquismo de un individuo y con la supervivencia tanto en fumadores como en no fumadores: De los 2.602 individuos, 1.091 eran fumadores, 1.405 no fumadores y 106 fumadores ocasionales. Los fumadores tenían niveles significativamente más altos de suPAR en comparación con los no fumadores y los fumadores ocasionales (ambos p>0,001). No se observaron diferencias en los niveles de suPAR entre no fumadores y fumadores ocasionales (p = 0,7).

Tabaquismo y niveles de suPAR entre varones: Los fumadores varones tenían niveles más altos de suPAR en comparación con los no fumadores para todos los grupos de edad (p < 0,001, Figura 6A). Entre los varones fumadores (N = 580), 133 murieron durante el seguimiento. suPAR se asoció significativamente con la supervivencia (regresión de Cox HR = 1,32, IC del 95 %: 1,24 - 1,41). Entre varones no fumadores (N = 674), 100 murieron durante el seguimiento. SuPAR se asoció significativamente con la supervivencia (HR = 1,73, IC del 95 %: 1,57 - 1,90). 56 varones eran fumadores ocasionales y 6 fallecieron durante el seguimiento. HR fue 2,16, IC del 95 %: 0,88 - 5,30).

Tabaquismo y niveles de suPAR entre mujeres: Los fumadores mujeres tenían niveles más altos de suPAR en comparación con los no fumadores para todos los grupos de edad (p < 0,001, Figura 6B). Las mujeres fumadoras (N = 511) tuvieron niveles significativamente mayores de suPAR que las fumadoras ocasionales (N = 56) p < 0,001), Mann-Whitney. La media de suPAR entre las mujeres fumadoras fue 5,11 (std 1,38) en comparación con las fumadoras ocasionales (media 3,99 ng/ml), std 0.93).

No se observó ninguna diferencia en los niveles de suPAR entre fumadoras ocasionales (n = 50) y no fumadoras (N = 731), Mann-Whitney p = 0,79. Las mujeres fumadoras tenían mayores niveles de suPAR (media 5,11 ng/ml, std 1,38) en comparación con las no fumadoras (N = 731, media 4.07 std 1,14), p < 0,001. La regresión de Cox para las mujeres fumadoras mostró que suPAR estaba asociado significativamente con la supervivencia. Entre las 511 mujeres, 72 murieron durante el seguimiento. Niveles altos de SuPAR se asociaron significativamente con una menor supervivencia (HR = 1,26, IC del 95 %:

Entre las 731 mujeres no fumadoras, 73 murieron durante el seguimiento. Niveles altos de suPAR se asociaron con una menor supervivencia, HR = 1,21, 95 % IC 1.11 a 1.31. 50 mujeres eran fumadoras ocasionales y 5 murieron durante el seguimiento, HR = 2,91, 95 % IC 1,10 a 7,69

El ejercicio y suPAR: Se preguntó a todos los individuos de la cohorte MONICA acerca de sus hábitos de ejercicio. Los individuos se agruparon en cuatro grupos; el grupo de edad 1 consistió en individuos que no hacían ejercicio regularmente (N = 539), el grupo de edad 2 eran individuos que realizaban ejercicio bajo o moderado (paseaban etc.) (N = 1454), el grupo de edad 3 eran individuos que realizaban ejercicio con regularidad (por ejemplo, correr) (N = 546) y el grupo de edad 4 constaba de deportistas profesionales (N = 17). Como el ejercicio es dependiente de la edad, la figura 6C muestra niveles de suPAR entre los diferentes grupos de ejercicio de acuerdo a la edad. En todos los grupos de edad, excepto para las personas de 71 años de edad, se observaron niveles significativamente más bajos de suPAR para las personas que hacían ejercicio regularmente en comparación con los individuos que no hacían ejercicio (p < 0,004 para todos los análisis). El análisis de correlación ajustado por edad y sexo mostró una correlación negativa significativa entre el ejercicio y suPAR (p < 0,001, r = -012).

Conclusión: Se demuestra que suPAR es un marcador que cambia con un cambio de estilo de vida, es decir, los individuos que no fuman o que han dejado de fumar tienen niveles de suPAR significativamente más bajos que los individuos que continúan fumando. suPAR está elevado para un número de diversas enfermedades, que inducen la activación inmune y en el presente documento se muestra que niveles altos de suPAR predicen un aumento de la mortalidad.

También se ha mostrado que suPAR es un marcador dinámico de los cambios de estilo de vida asociados con el ejercicio y la aptitud física. Los individuos que tienen niveles altos de suPAR pueden reducir sus niveles de suPAR por el ejercicio, una observación que fue significativa para todos los individuos menores de 71 años de edad, que a su vez extiende su vida útil.

Ejemplo 4: suPAR es un marcador de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV)

La ECV es la causa más frecuente de enfermedad en el mundo. Por ejemplo, en Suecia, las condiciones no transmisibles representan el 83 % de todas las muertes, el 41 % del total de muertes se deben a enfermedades cardiovasculares (ECV), el 26 % al cáncer y alrededor del 7 % a causas externas (lesiones intencionadas y no intencionadas).

Grupo de población: Cohorte MONICA 10 como se define en el Ejemplo 2.

Procedimientos: medición de suPAR como en el Ejemplo 2.

Estadística: Se muestra un factor negativo del estimador de Kaplan-Meier para el tiempo hasta la muerte La incidencia acumulada (probabilidad de experimentar un acontecimiento) se muestra para el tiempo hasta ECV. La incidencia acumulada de ECV se estima en un modelo de riesgos en competencia con ECV, censura debido a la muerte y censura debido a otras razones como las tres causas de la competencia. Todos los análisis se estratificaron según los cuartiles de la distribución de suPAR. Los cortes de los cuartiles se generaron en los 2.602 pacientes iniciales y es 3,361 ng/ml (25 %), 4.029 ng/ml (50 %) y 4.910 ng/ml (75 %). El seguimiento de acontecimientos ECV estaba disponible para el análisis hasta el 31 de diciembre de 2001

Resultados:

En el momento de la obtención de muestras, 208 individuos habían experimentado ya una ECV y fueron excluidos del análisis de riesgos de desarrollo de ECV. Aquéllos que habían experimentado una ECV antes de la obtención de la muestra de sangre tenían niveles de suPAR más altos en comparación con aquéllos que no habían experimentado una ECV en el momento de la obtención de la muestra de sangre (Mann-Whitney, $p < 0{,}001$). Durante el seguimiento, 318 desarrollaron un acontecimiento ECV, de los que 70 fueron un infarto de miocardio agudo. El riesgo de desarrollar una ECV de acuerdo con los cuarteles de suPAR se muestra como un modelo de riesgos competitivo en la Figura 7-

suPAR es un predictor independiente del riesgo de ECV: En el análisis multivariable se disponía de datos para el análisis para un total de 2.394 individuos, de los cuales 316 desarrollaron un acontecimiento de ECV. El uso de valores continuos de suPAR, suPAR siguió siendo un predictor significativo de riesgo de ECV, cuando se conocen la edad, el sexo, el tabaquismo y la circunferencia de la cintura (Tabla 6).

Tabla 6: Análisis multivariable de riesgo de desarrollar Variables de ECV en la ecuación

	Wald	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
				Inferior	Superior
SuPAR (ng/ml)	19,290	0,000	1,153	1,082	1,229
Sexo	6,623	0,010	1,400	1,083	1,808
Edad	162,778	0,000	1,082	1,069	1,095
Cintura (cm)	13,207	0,000	1,018	1,008	1,028
Fumadores habituales	17,102	0,000	1,629	1,293	2,053

El LDL-colesterol se asoció significativamente con un riesgo de desarrollo de un acontecimiento de ECV en el análisis univariable Cox, sin embargo no es un predictor significativo de ECV en el análisis multivariable (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis multivariable con LDL-colesterol incluido (mmol/l)

	Wald	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
				Inferior	Superior
suPAR_ng_ml	20,950	0,000	1,158	1,088	1,233
Sexo	6,510	0,011	1,397	1,081	1,807
Edad (por año mayor)	146,721	0,000	1,079	1,066	1,093
Cintura (cm)	14,740	0,000	1,020	1,010	1,030
Tabaquismo	16,466	0,000	1,619	1,283	2,044
LDL-colesterol (mmol/l)	1,564	.211	1,073	.961	1,198

El síndrome metabólico también se asoció de forma independiente con el desarrollo de ECV. Cuando se incluye el síndrome metabólico en el modelo, suPAR todavía seguía siendo un predictor altamente significativo e independiente de otros acontecimientos de ECV (análisis multivariable en la Tabla 8).

Tabla 8. El análisis multivariable, incluido el síndrome metabólico, definido de acuerdo con la definición del NCEP ATPIII 2001 con la modificación de la glucosa de 2004

	Wald	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
				Inferior	Superior
suPAR_ng_ml	19,542	0,000	1,154	1,083	1,229
Sexo	21,346	0,000	1,719	1,366	2,164
Edad (por año mayor)	169,495	0,000	1,083	1,070	1,096
Fumadores habituales	14,865	0,000	1,574	1,250	1,981
Síndrome metabólico	7,212	0,007	1,438	1,103	1,875

En un análisis de correlación parcial, controlando por sexo y edad, suPAR mostró poca o ninguna correlación con otros marcadores conocidos de riesgo de ECV, incluyendo el índice de masa corporal (IMC), el colesterol LDL y los triglicéridos (Tabla 9).

Tabla 9. Correlación parcial entre suPAR y marcadores de riesgo conocidos de ECV ajustada por sexo y edad

Variables de Control			
SEXO Y EDAD	SuPAR (ng/ml)	Correlación	1,000
		Significación (2-colas)	.
		DF	0
	Fumador habitual (sí o no)	Correlación	-0,383
		Significación (2-colas)	0,000
		DF	2550
	Leucocitos	Correlación	0,355
		Significación (2-colas)	0,000
		DF	2550
	LDL-colesterol	Correlación	-0,003
		Significación (2-colas)	0,896
		DF	2550
	Triglicéridos	Correlación	0,097
		Significación (2-colas)	0,000
		DF	2550
	Circunferencia de la cintura	Correlación	0,027
		Significación (2-colas)	0,172
		DF	2550
	Presión arterial sistólica	Correlación	0,042
		Significación (2-colas)	0,032
		DF	2550
	Glucosa en ayunas	Correlación	0,081
		Significación (2-colas)	0,000
		DF	2550

Conclusión. Se ha mostrado que suPAR es un marcador sorprendentemente fuerte e independiente del riesgo de desarrollar un acontecimiento de ECV en individuos aparentemente sanos. Independientemente de la edad, el sexo, el estado de tabaquismo y el síndrome metabólico, un aumento de 1 ng en los niveles de suPAR se asoció con un incremento del riesgo del 15,4 % (IC del 95 % 8,4 a 22,8 %, P < 0,001) de desarrollar ECV durante el seguimiento. Curiosamente, suPAR no se correlaciona, o lo hace sólo débilmente, con predictores clásicos de desarrollo de ECV, lo que refuerza el papel fuerte e independiente de suPAR como marcador de riesgo de ECV.

Ejemplo 5: El nivel de suPAR en plasma es diagnóstico de inflamación de grado bajo y predictor independiente de desarrollo de la diabetes tipo 2

El número de personas que desarrollan diabetes (diabetes tipo 2) se ha incrementado en las últimas décadas. Hay una mayor prevalencia de la diabetes en individuos con sobrepeso. Sin embargo, no todos los individuos con sobrepeso desarrollan diabetes. Por lo tanto, hay una necesidad de marcadores para predecir el riesgo de un individuo desarrollar diabetes independientemente del IMC.

Grupo de población: Cohorte MONICA 10 como se define en el Ejemplo 2.
Procedimientos: determinación suPAR que en el ejemplo 2; el síndrome metabólico se definió de acuerdo con el NCEP ATPIII 2001 con la modificación de la glucosa de 2004. Al inicio del estudio, 425 (16,3 %) tenían síndrome metabólico

Resultados: En el momento de la extracción de sangre de la cohorte Monica10, 34 individuos habían sido diagnosticados de diabetes de acuerdo con la ICD-8 y -10 Estos individuos tenían niveles significativamente más altos de suPAR en comparación con aquellos que no tenían diabetes en el momento de la inclusión (Mann-Whitney, p < 0,001). Durante el periodo de seguimiento, 65 de 2.568 individuos, que previamente no habían sido diagnosticados con diabetes I o II, pasó a desarrollar diabetes.

Cuando la cohorte original (2.602 individuos) se dividió en 2 grupos, basados en la mediana de suPAR, significativamente más individuos que tienen niveles de suPAR superiores a la mediana pasó a desarrollar diabetes (prueba del orden log, p < 0,001, gráfico de Kaplan Meier, Figura 8).

Análisis multivariable de riesgo de diabetes: Fumar no se asoció con un riesgo de desarrollar diabetes. En los análisis univariables, los niveles altos de suPAR, la edad (mayor), el sexo (ser varón) y tener un IMC alto se asociaron significativamente con un mayor riesgo de desarrollar diabetes. En el análisis multivariable (Tabla 10), estos últimos factores todos permanecieron significativamente asociados con el riesgo de desarrollar diabetes.

Tabla 10. El análisis multivariable de univariable predictores significativos del desarrollo de la diabetes

Variables en la ecuación					
	Wald	**Sig.**	**Exp(B)**	**IC del 95,0 % para el Exp. (B)**	
				Inferior	**Superior**
Presión arterial sistólica	6,895	0,009	1,019	1,005	1,034
SuPAR (ng/ml)	19,551	0,000	1,247	1,131	1,376
Sexo	9,547	0,002	2,326	1,362	3,974
Edad (por año mayor)	6,510	0,011	1,037	1,008	1,066
IMC	26,968	0,000	1,138	1,084	1,195

Recuento de leucocitos como predictor de desarrollo de diabetes mellitus - la fuerza de suPAR: Se ha demostrado que el número de glóbulos blancos (WBC), es decir, leucocitos, que se acepta como marcador para la activación inmune y la inflamación de grado bajo en la población general, predice significativamente el desarrollo de diabetes mellitus (Vozarova B et al., 2002, Diabetes 51:455-461). Se demostró que el recuento de leucocitos tenía una fuerte correlación positiva con el nivel de suPAR tanto en análisis univariable (r = 0,34, P < 0,0001) como después de la corrección para el sexo y la edad (correlación parcial r = 0,35, P < 0,0001) en la cohorte MONICA 10, Por tanto, el suPAR se puede considerar un marcador de la activación inmunitaria y de la inflamación de grado bajo en la población general. Sustituyendo suPAR por recuento de glóbulos blancos en la Tabla 10, los glóbulos blancos se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus independiente de la edad, el sexo y el síndrome del 13 % por a edad, el 10^9 CMB por litro (IC del 95 %: 0 % % a 26 %, P < 0,05). Sin embargo, teniendo tanto suPAR y los valores de WBC, el recuento de glóbulos blancos no era significativo (P = 0.), mientras que suPAR permaneció fuertemente asociado con un mayor riesgo de desarrollar diabetes (27 % por aumento 1 ng/ml en el plasma de suPAR, IC del 95 %: 13 % a 43 %, P < 0,0001). Por lo tanto, suPAR es un predictor más fuerte de la diabetes que WBC.

Conclusión. Estos datos muestran que suPAR es un predictor independiente del riesgo de desarrollar diabetes. Cuando se conocen la edad, el sexo y el síndrome metabólico, un aumento de 1 ng/ml de los niveles de suPAR se asoció con un incremento del riesgo del 28 % de desarrollar diabetes (IC del 95 % %15 - 43 %). Además, estos datos proporcionan evidencias de que suPAR se correlaciona fuertemente con recuento de leucocitos con independencia de la edad y el género, estableciendo así suPAR como un marcador de la activación inmune y la inflamación de grado bajo en la población general. Excluyendo los individuos que tenían niveles basales de azúcar en sangre superiores a 6,9 mM o insulina utilizada no cambiaron el significado de suPAR en relación con el desarrollo de diabetes.

Ejemplo 6: suPAR es un marcador del síndrome metabólico

Grupo de población: Cohorte MONICA 10 como se define anteriormente en el Ejemplo 2.

Procedimientos: determinación de suPAR como en el Ejemplo 2. El síndrome metabólico se definió de acuerdo con la definición del NCEP ATPIII 2001 con la modificación de la glucosa de 2004 (Grundy SM et al, 2005, Circulation 112: 2735 - 2752). La distribución de los 2.602 individuos en 5 clases metabólicas, identificadas con ninguno o 1-5 componentes del síndrome metabólico se muestra en la Tabla 11. Los 5 componentes son: circunferencia de cintura elevada: Varones - igual o mayor de 40 pulgadas (102 cm) y Mujeres - igual o mayor de 35 pulgadas (88 cm); triglicéridos elevados: Igual o superior a 150 mg/dl; colesterol HDL (“bueno”) reducido: Varones - Menos de 40 mg/dl, mujeres - menos de 50 mg/dl; presión arterial elevada: Igual o superior a 130/85 mm Hg; niveles elevados de

glucosa en ayunas: Igual o mayor de 100 mg/dl, (basado en la definición dada por (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III), con modificaciones menores que comprenden)

Tabla 11: Distribución de síndrome metabólico y los valores de suPAR entre 2.602 individuos

Número de componentes del síndrome metabólico	Frecuencia	Porcentaje	media de suPAR (ng/ml)
0	748	29,2	3,97
1	816	32,7	4,27
2	548	21,8	4,47
3	315	11,4	4,52
4	136	4,6	4,65
5	39	0,4	4,80
Total	2602	100,0	

Resultados: Los niveles de suPAR aumentaron a medida que aumentaba el número de componentes del síndrome metabólico en un individuo. Los individuos que no tienen componentes del síndrome metabólico (0) tenían niveles significativamente más bajos de suPAR en comparación con los individuos que tenían uno o más componentes (Tabla 11 y Figura 9), $p < 0,001$ prueba U de Mann Whitney. Este fue el caso para varones y mujeres (Figura 10). En la correlación univariable de Pearson suPAR (log transformado) se correlacionó positivamente con un mayor número de componentes metabólicos ($r = 0,17$, $P < 0,0001$), una correlación, que seguía siendo altamente significativa después de la corrección por edad y género (correlación parcial $r = 0,13$, P &< 0,0001).

Conclusión: SuPAR es un fuerte marcador de síndrome metabólico independientemente de la edad y el género. También se demostró que los niveles de suPAR se correlacionan significativamente con un aumento de la glucosa en ayunas (Tabla 9). En el ejemplo 5 se demostró que suPAR predice fuertemente la diabetes tipo 2. A partir de estas observaciones se deduce que suPAR es un fuerte marcador de resistencia a la insulina, que es una causa subyacente del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2.

Ejemplo 7. SuPAR como marcador de cardiopatía isquémica como un componente de ECV

Se demuestra que SuPAR es un marcador predictivo de la evolución futura de la cardiopatía isquémica (CI), que se clasifica como un componente de ECV.

Grupo de población: Cohorte MONICA 10 como se define en el Ejemplo 2.

Procedimientos: determinación de suPAR como en el Ejemplo 2.

Resultados: De los 2.534 individuos sin cardiopatía isquémica previa, 115 desarrollaron cardiopatía isquémica durante el seguimiento. El análisis de regresión de Cox multivariable mostró que un aumento de 1 ng/ml suPAR, independientemente del sexo, la edad, el consumo de tabaco y la presencia de síndrome metabólico, se asoció con un incremento del 16,7 % (IC del 95 % 4,8 a 29,9 %, $P = 0,005$) del riesgo de desarrollar CI. De los 115 individuos que desarrollaron una CI, 9 habían desarrollado previamente diabetes. Cuando se excluyó a estos 9 individuos del análisis, suPAR seguía siendo significativa y relacionada de forma independiente con el riesgo de CI.

Análisis de regresión de Cox ajustado por edad multivariable para el riesgo de CI: En un análisis de regresión de Cox ajustado por edad, un incremento de 1 ng/ml en los niveles de suPAR se asoció con un mayor riesgo de CI del 21 % (RH= 1,21, IC del 95 %: 1,09 a 1,35), padecer el síndrome metabólico aumentó el riesgo con el 61 % (HR = 1,61, 95 % IC 1,00 a 2,80), ser mujer en comparación con los hombres disminuyó el riesgo con el 61 % (HR = 0,39, IC 95 % 0,25-0,60), ser no fumador frente a fumador disminuyó el riesgo con el 33 % (HR = 0,67, 95 % IC 0,54 a 0,84) y un aumento del colesterol LDL (por aumento de 10 mM) con un incremento del 3,5 % en el riesgo (HR = 1,035, IC del 95 %: 1,02 - 1,05).

Análisis de Kaplan-Meier: Para llevar a cabo el análisis de Kaplan-Meier, los individuos fueron divididos en 2 grupos en función de la mediana del valor de suPAR de los 2.602 individuos incluidos en el estudio (4,03 ng) (Figura 11).

Conclusión: Los resultados indican que los niveles de suPAR son un predictor significativo del riesgo de desarrollar CI, como componente de ECV, en individuos que no han experimentado previamente un IM. El SuPAR predijo el riesgo de CI de forma independiente de otros marcadores clásicos de la IHD.

Ejemplo 8: Algoritmo para la predicción del riesgo de desarrollar ECV o diabetes mellitus tipo II

Una combinación de factores, uno de los cuales es suPAR, son predictivos del riesgo de desarrollar ECV o diabetes tipo II. En una forma de realización se empleó la regresión logística escalonada hacia atrás para identificar los factores que tienen la significación estadística más alta en la predicción del resultado de un gran número de sujetos

humanos, y el riesgo de desarrollo de cada una de estas enfermedades. La combinación de factores predictivos o criterios proporciona un modelo empleado en la forma de un algoritmo para la predicción de los riesgos para la salud de un sujeto individual.

Análisis de regresión inverso y escalonado

Los siguientes parámetros univariables se asociaron significativamente con el desarrollo futuro de una ECV: suPAR (HR (HR = cociente de riesgos instantáneos) por incremento en ng 1,23 (IC del 95 %: 1,18 - 1,29)) hipertensión (RH = 2,45, (IC del 95 %: 1,93 - 3,10)) asma (RH = 1,60, (IC del 95 %: 1,12 - 2,30)), diabetes (RH = 3,19 (IC del 95 %: 2,01 - 5,08) bebidas cortas (RH por incremento 1,03 (IC del 95 %: 1,01 - 1,04)) tabaquismo (RH = 1,19, (IC del 95 %: 1,08 - 1,34)) recuento de glóbulos rojos (RH = 1,05, (IC del 95 %: 1,02 - 1,08)) presencia de síndrome metabólico (RH = 1,73, (IC del 95 %: 1,33 - 2,25) colesterol total (RH incremento por mmol/l= 1.002 (IC del 95 %: 1.001 - 1.003) colesterol-LDL (RH incremento por mmol/l= 1.003 (IC del 95 %: 1.001 - 1.004) triglicéridos (RH incremento por mmol/l= 1.001 (IC del 95 %: 1.000 - 1.002) presión arterial diastólica (RH por incremento de si (unidad de presión Si) 1,04 (IC del 95 %: 1,03 - 1,06) presión arterial sistólica (RH por incremento de si 1.036 (IC del 95 %: 1.030 - 1.041) edad (RH incremento anual 1,08 (IC del 95 %: 1,07 - 1,10)) niveles de glucosa en ayunas (RH = 1,02, (IC del 95 %: 1.015 - 1.026)) en tratamiento para el asma (RH = 1,56, (IC del 95 %: 1,07 - 2,29)) sexo (varones frente a mujeres, RH = 1,62, (IC del 95 %: 1,30 - 2,03)).

Análisis multivariable: Todos los datos importantes univariable se introdujeron luego en un análisis multivariable. El análisis multivariable se muestra en la Tabla 12. Esos factores significativos en la Tabla 12 se introdujeron entonces en un nuevo análisis multivariable (Tabla 13). La capacidad de cada parámetro diferente para predecir el acontecimiento de ECV en 8 años desde la extracción de sangre se analizó mediante curvas características de operación (ROC), como se muestra en la Figura 12. De acuerdo con el área bajo la curva (AUC), la edad, seguido de suPAR fueron los mejores predictores del futuro desarrollo de la ECV (tabla 14). Combinando la información de todos los parámetros que fueron significativas en el análisis multivariable, mejorará la exactitud de predicción para el desarrollo de una futura ECV. La identificación de la combinación lineal de los parámetros que da la AUC más alta se puede llevar a cabo utilizando el procedimiento por Xiong et al., 2004, Med. Decision Making; 24:659 – 69, basado en la transformación Z de Fisher. De esta manera, se pueden añadir datos adicionales al algoritmo, también parámetros todavía no descubiertos o incluidos en el modelo actual para aumentar las AUC combinadas. Además, los datos también pueden omitirse en el modelo si no están disponibles. Por ejemplo, si no se dispone de datos de glucosa en ayunas, el modelo se puede utilizar con los datos disponibles. El resultado del modelo es una salida de riesgo, que puede estar en % de riesgo o como la edad calculada (que luego se puede comparar con la edad de la paciente). Si el riesgo es más alto de lo normal, la edad calculada será mayor entonces la edad del individuo.

12: Análisis multivariable por 1 unidad de cambio de parámetros asociados significativamente con el riesgo de desarrollo de ECV en el análisis univariable

	Wald	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
				Inferior	Superior
Presión arterial diastólica	7,539	0,006	1,027	1,008	1,047
SuPAR (ng/ml)	11,342	0,001	1,135	1,054	1,221
Sexo	12,078	0,001	1,629	1,238	2,146
Edad	89,715	0,000	1,074	1,059	1,091
Asma	0,114	0,735	1,129	0,559	2,278
Consumo de alcohol	1,146	0,284	1,014	0,989	1,039
Tratamiento del asma	0,683	0,409	1,368	0,650	2,882
Tabaquismo	17,159	0,000	1,340	1,167	1,541
LDL-colesterol	0,080	0,778	1,000	0,997	1,004
Triglicéridos	0,538	0,463	1,001	0,999	1,002
Colesterol total	0,067	0,796	1,000	0,997	1,004
Leucocitos	5,288	0,021	1,008	1,001	1,015
Recuento de glóbulos rojos	0,014	0,906	1,002	0,968	1,037
Diabetes	1,585	0,208	1,501	0,797	2,833
Hipertensión	4,096	0,043	1,340	1,009	1,779
Presión arterial sistólica	1,255	0,263	1,006	0,995	1,017
Niveles de glucosa en ayunas	3,039	0,081	1,009	0,999	1,019

Tabla 13. Análisis multivariable de parámetros asociados significativamente con la ECV en la Tabla 12.

	Wald	df	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
					Inferior	Superior
Presión arterial diastólica	26,545	1	0,000	1,033	1,020	1,045
SuPAR (ng/ml)	15,132	1	0,000	1,145	1,070	1,227
Sexo	16,752	1	0,000	1,629	1,289	2,053
Edad	160,881	1	0,000	1,082	1,069	1,096
Tabaquismo	17,426	1	0,000	1,290	1,601	1,516

Leucocitos	4,131	1	0,042	1,007	1,000	1,013
Hipertensión	9,908	1	0,002	1,536	1,176	2,008

Tabla 14. Área bajo la curva para los datos correspondientes a la Figura 12

Área bajo la cuerva					
Variable(s) del resultado de la prueba	**Área**	**Error est. (a)**	**Sig. asintomáticos (b)**	**Intervalo de confianza del 95 % asintomático**	
				Límite inferior	**Límite superior**
SuPAR (ng/ml)	0,620	0,017	0,000	0,587	0,653
Hipertensión	0,432	0,018	0,000	0,397	0,467
Estado de tabaquismo	0,451	0,017	0,005	0,417	0,485
Sexo	0,446	0,017	0,002	0,413	0,480
Edad	0,705	0,015	0,000	0,677	0,734
Leucocitos	0,546	0,017	0,008	0,512	0,580
Presión arterial diastólica	0,616	0,017	0,000	0,583	0,648

Ejemplo 9: Evaluación informática implementada del riesgo de mortalidad y/o el desarrollo de las ECV, diabetes tipo 2, y/o cáncer DE TIPO 2

A continuación se expone el desarrollo de un algoritmo estadístico para la evaluación del riesgo de mortalidad y/o el desarrollo de ECV, cáncer o diabetes tipo 2 en un plazo determinado de tiempo en el que el suPAR es un parámetro. El cálculo se puede ejecutar en un programa de ordenador estándar como una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

En el presente ejemplo, el algoritmo se basa en el conjunto de datos de covariables determinados para los sujetos en la cohorte MONICO10 tal como se establece en los Ejemplos 2 y 10, y se ha aplicado por separado para los cuatro puntos finales diferentes, tiempo hasta ECV, el cáncer, la diabetes y la muerte. El algoritmo se basa en un denominado modelo de riesgos proporcionales, que es un modelo estadístico desarrollado en el campo estadístico de análisis de supervivencia. La función basal de la razón de probabilidades se escoge para que sea una función potente y da tiempos de acontecimientos distribuidos en La escala de tiempo subyacente es la edad, y las horas de los acontecimientos se dejan truncadas y censuradas derecha.

El algoritmo produce estimaciones separadas del riesgo de adquirir las enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes o de morir dentro de un tiempo especificado, como una función de las características de un individuo (de aquí en adelante denominados "covariables"). Estas estimaciones de riesgo se obtienen mediante la inserción de efectos estimados de las covariables obtenidos a partir del modelo en la siguiente expresión

$$P = 1 - \exp(-(\exp(a*\log(age+t)) - \exp(a*\log(age)))*\exp(z*beta - a*\log(b)))$$

donde a, b y beta son estimaciones de los parámetros de forma y escala y el efecto de las covariables, respectivamente, obtenido del ajuste de los datos al modelo, por ejemplo, mediante el uso de estimación de máxima verosimilitud,

Las variables "edad", t y z contienen las covariables de un (posiblemente ficticio) individuo para el cual se puede estimar el riesgo de contraer ECV, cáncer o diabetes o de morir puede estimarse P es la probabilidad de que el individuo adquiera ECV, cáncer o diabetes o de morir dentro de t años, "edad" es la edad actual del individuo, y z es un vector que contiene todas las otras covariables incluidas en el modelo para el cálculo de la probabilidad.

Las estimaciones de riesgo dependen de qué covariables se incluyen en el modelo, del criterio de valoración y de las estimaciones de a, b y beta. Las covariables principales para cada evaluación de riesgos son los siguientes:

Tiempo hasta la ECV: edad, sexo, suPAR, fumador/fumador ocasional o no fumador, presión arterial sistémica/diastólica, circunferencia de la cintura, HDL-colesterol, LDL-colesterol;

Tiempo hasta el cáncer: edad, el sexo, fumador/ocasional o no-fumador, suPAR;

Tiempo hasta la diabetes: edad, sexo, glucosa en sangre en ayunas, suPAR;

Tiempo hasta la muerte: Edad, sexo, suPAR, fumador/fumador ocasional o no fumador, presión arterial sistémica/diastólica, circunferencia de la cintura.

Por otra parte, además de las covariables que se muestran anteriormente, el modelo permite añadir más covariables (colesterol total, triglicéridos, hs-CRP, NTproBNP, IMC, actividad física, consumo de alcohol y polimorfismos genéticos asociados con el riesgo de la enfermedad). Las interacciones entre las covariables pueden incluirse en el

modelo también.

A continuación se proporcionan cuatro ejemplos, uno para cada criterio de valoración. Algoritmos con menos covariables se incluyen fácilmente en el modelo mediante la omisión de z y betas, y las interacciones se incluyen introduciendo más zetas y betas. En todos los ejemplos, el individuo se considera un hombre de 58 años de edad, con una medida de suPAR de 3,0 ng/ml. El riesgo que se evalúa es el riesgo de experimentar un acontecimiento dentro de 10 años. El intervalo de trabajo para cada parámetro viene dado por el intervalo de confianza del 95 %, que es el intervalo de la estimación menos dos veces su error estándar para la estimación más dos veces su error estándar ([est-2 * SE; est 2 * SE]). En los ejemplos se proporciona un error estándar (SE) (entre paréntesis) cada vez que se muestra una estimación.

Tiempo hasta la ECV. Los cálculos son los siguientes: beta1 = 0,13 (0,03) (una unidad de aumento de la concentración de suPAR), beta2 = 0,38 (0,14) (varón vs mujer), beta3 = -0,14 (0,33) (fumador ocasional vs no fumador), beta4 = 0,66 (0,12) (fumador habitual vs no fumador), beta5 = 0,007 (0,005) (un mm Hg de aumento de la presión arterial sistólica), beta6 = 0,029 (0,009) (un mm Hg de aumento de la presión arterial diastólica), beta7 = 0.009 (0,006) (un aumento cm en la medida de la cintura), beta8 = 0,64 (1,58) (aumento de una unidad de HDL-colesterol) y beta9 = 0,50 (0,58) (una unidad de incremento del LDL-colesterol). El logaritmo de la forma parámetro es log (a) = 1,75 (0,08), y el logaritmo del parámetro de escala es log (b) = 5,34 (0,17).

Según la fórmula, si el varón es un no fumador con una presión arterial de 160/120, una circunferencia de cintura de 100 cm, una medición de HDL de 0,14 y una medición de LDL de 0,4, tiene un riesgo de P = 45,3 % de contraer ECV en 10 años. Si hubiera tenido 48 años de edad, su riesgo habría sido del 23,4 %. Su riesgo de contraer ECV en 5 años es P = 21,8 %. El riesgo correspondiente de una mujer es de 33,8 % en 10 años. Si el varón hubiera tenido una medición de suPAR de 2,0 ng/ml, habría tenido una probabilidad del 41,1 % de contraer ECV en 10 años, y si fuera de 4,0 ng/ml, habría sido de 49,8 %. Si el varón comenzara a fumar regularmente, aumentaría su riesgo de contraer ECV en 10 años a 68,9 %. Si disminuyera la presión arterial a 120/80, reduciría su riesgo de contraer ECV en 10 años al 13,4 %. Si pudiera disminuir su cintura en 5 cm, reduciría su riesgo a 43,9 %. Si pudiera aumentar su medición de HDL a 0.15, se obtendría un riesgo del 45,5 %, y si pudiera bajar la medición de LDL a 0,3 obtendría un riesgo del 43,7 %.

Tiempo hasta el cáncer: Los cálculos son los siguientes: beta1 = 0,25 (0,05) (una unidad de aumento de la concentración de suPAR), beta2 = 0,08 (0,17) (varón vs mujer), beta3 = 0,04 (0,52) (fumador ocasional vs no fumador) y beta4 = 0,62 (0,19) (fumador regular vs no fumador). El logaritmo de la forma parámetro es log (a) = 4,83 (0,07), y el logaritmo del parámetro de escala es log (b) = 1,73 (0,10).

Según la fórmula, si el hombre es un no fumador, tiene un riesgo de P = 4,2 % de contraer cáncer en 10 años. Si hubiera tenido 48 años de edad, su riesgo habría sido del 1,9 %. Su riesgo de sufrir cáncer en 5 años es P = 1,7 %. El riesgo correspondiente de una mujer es de 3,9 % en 10 años. Si el varón hubiera tenido una medición de suPAR de 2,0 ng/ml, habría tenido una probabilidad del 3,3 % de sufrir cáncer en 10 años, y si fuera de 4,0 ng/ml, habría sido de 5,3 %. Si el varón comenzara a fumar regularmente, aumentaría su riesgo de sufrir cáncer en 10 años a 7,6 %.

Tiempo hasta la diabetes: Los cálculos son los siguientes: beta1 = 0,22 (0,06) (una unidad de aumento de la concentración de suPAR), beta2 = 0,79 (0,27) (varón vs mujer), beta3 = 0,45 (0,03) (una unidad de aumento de la glucosa en ayunas. El logaritmo de la forma parámetro es log (a) = 5,81 (0,32), y el logaritmo del parámetro de escala es log (b) = 1,45 (0,20).

Según la fórmula, si el hombre tiene una glucemia en ayunas de 5, tiene un riesgo de P = 2,3 % de desarrollar diabetes en 10 años. Si hubiera tenido 48 años de edad, su riesgo habría sido del 1,3 %. Su riesgo de sufrir diabetes en 5 años es P = 1,0 %. El riesgo correspondiente de una mujer es de 1,0 % en 10 años. Si el varón hubiera tenido una medición de suPAR de 2,0 ng/ml, habría tenido una probabilidad del 1,8 % de sufrir diabetes en 10 años, y si fuera de 4,0 ng/ml, habría sido de 2,8 %. Si el hombre fuera capaz de reducir su nivel de glucosa en ayunas de 4, su riesgo de sufrir diabetes se reduciría hasta el 1,5 %.

Tiempo hasta la muerte: Los cálculos son los siguientes: beta1 = 0,20 (0,03) (una unidad de aumento de la concentración de suPAR), beta2 = 0,49 (0,12) (varón vs mujer), beta3 = -0,12 (0,33) (fumador ocasional vs no fumador), beta4 = 0,72 (0,11) (fumador habitual vs no fumador), beta5 = 0,001 (0,004) (un mm Hg de aumento de la presión arterial sistólica), beta6 0,021 (0,007) (un mm Hg de aumento de la presión arterial diastólica) y beta7 = 0,002 (0,005)) (un aumento cm en la medida de la cintura). El logaritmo de la forma parámetro es log (a) = 2,01 (0,06), y el logaritmo del parámetro de escala es log (b) = 4,89 (0,08).

Según la fórmula, si el varón es un no fumador con una presión arterial de 160/120 y una circunferencia de cintura de 100 cm, tiene un riesgo de P = 16,9 % de morir en 10 años. Si hubiera tenido 48 años de edad, su riesgo habría sido del 5,9 %. Su riesgo de morir en 5 años es P = 6,7 %. El riesgo correspondiente de una mujer es de 10,7 % de morir en 10 años. Si el varón hubiera tenido una medición de suPAR de 2,0 ng/ml, habría tenido una probabilidad del 14,1 % de morir en 10 años, y si fuera de 4,0 ng/ml, habría sido de 20,1 %. Si el varón comenzara a fumar

regularmente, aumentaría su riesgo de morir en 10 años a 31,5 %. Si disminuyera la presión arterial a 120/80, reduciría su riesgo de morir en 10 años al 7,7 %. Si pudiera disminuir su cintura en 5 cm, reduciría su riesgo a 16,7 %.

Ejemplo 10 Los niveles de suPAR es un marcador de riesgo de desarrollo de cáncer en el futuro

Objetivo del estudio. Estudios anteriores han demostrado que los niveles de suPAR son predictivos de pronóstico en ciertos tipos de pacientes de cáncer. Sin embargo, nunca se ha investigado si los niveles de suPAR son predictivos del desarrollo futuro de cáncer en individuos aparentemente sanos sin cáncer. Por lo tanto, los inventores han investigado si suPAR predice el desarrollo del cáncer

Sujetos y procedimientos:

La cohorte MONICA 10: En 1982-1984, 4.807 personas, de 30, 40, 50 o 60 años de edad seleccionadas al azar de la población que vive en las cercanías del Hospital Universitario Glostrup, Dinamarca, fueron invitados a participar en una encuesta de población. En 1993 a 1994, se volvió a invitar a 3785 y 2656 vinieron y participaron en investigaciones posteriores y donaron sangre. 2605 muestras de plasma obtenidas de junio de 1993 hasta diciembre 94 estaban disponibles para el estudio. Los 2.605 participantes completaron un cuestionario de auto-administración. Sobre la base de la actividad física auto-reportada, los participantes fueron divididos en 3 grupos: sujetos sin actividad física (20 %), los sujetos con una actividad física moderada (caminar todos los días, andar en bicicleta o menos de media hora de actividad deportiva cada día (55 %) y sujetos que ejercen más de media hora todos los días (21 %). El 4 % no llenó el cuestionario sobre el ejercicio 1.091 participantes eran fumadores diarios (42 %), 106 (4 %) indicaron que fumaban ocasionalmente y 1405 (54 %) eran no fumadores. El consumo de alcohol se agrupó en dos grupos en función de si los participantes bebieron más o menos de la recomendación de los Ministerios de Salud Daneses (21 unidades de alcohol (1 unidad = 12 g de alcohol) por semana para varones y 14 para las mujeres). La información de cáncer se obtuvo a través del Registro Nacional de Salud de Dinamarca. El IMC se calculó como el peso dividido por la altura al cuadrado (kg/m^2)- El síndrome metabólico se definió de acuerdo a la definición de la Federación Internacional de la Diabetes como obesidad central (cintura en varones/mujeres > 94/80 cm) junto con al menos dos de los siguientes: niveles elevados de triglicéridos > 1,7 mmol /l (150 mg/dl), niveles reducidos de colesterol-lipoproteínas de alta densidad (<1,03 mmol/l (40 mg/dl), niveles elevados de glucosa en plasma (> 5,6 mmol/l (100 mg/dl) o PA elevada (PA sistólica > 130 mm de Hg o PA diastólica > 85 mm Hg).

Ejercicio: Sobre la base de la actividad física auto-notificada los participantes fueron divididos en 3 grupos: 1) sujetos sin actividad física, 2) sujetos con una actividad física moderada (caminar todos los días, andar en bicicleta o menos de media hora de actividad deportiva cada día), 3) sujetos que ejercen más de media hora todos los días y 4) atletas profesionales.

Determinaciones de alta sensibilidad de CRP (hsCRP): Las concentraciones en plasma se determinaron utilizando el ensayo de inmunoturbidimetría potenciada con partículas (Roche/Hitachi; Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) con un intervalo de 0,1-20 mg/l y un límite de detección inferior de 0,03 mg/l. Los niveles de hsCRP se midieron en muestras de 2510 y la mediana de hsCRP fue de 1,81 (intervalo de 0,12 a 98,45 mg/ml).

Mediciones de SuPAR: SuPAR se midió utilizando el kit de suPARnostic ™ (ViroGates, Copenhague, Dinamarca). El kit se desarrolló para medir la progresión de la enfermedad en el VIH-1 en individuos infectados. Brevemente, el kit viene con placas prerevestidas con anticuerpo monoclonal de captura y un anticuerpo monoclonal de detección marcado con HRP, que se añade al tampón de dilución de la muestra. A continuación, 25 µl de la muestra de plasma se mezclan con 225 µl de tampón de dilución y a la placa prerevestida se añaden 100 µl (por duplicado) y se incuban durante una hora. Después del lavado, se añadieron 50 µl de sustrato durante 20 minutos y la reacción se detuvo con 50 µl de H_2SO_4 0,5,5M. Las placas se midieron a 450 nm con referencia a 630 nM. Se midieron 8 planchas por día de trabajo (312 muestras). Las muestras se marcaron con un número y el técnico no tenía conocimiento de la identidad de la muestra del paciente. La variación dentro del ensayo fue de 2,75 % y la variación entre ensayos 9,17 %. Se midieron 2605 muestras. La curva estándar del kit fue se valida para medir los niveles de suPAR entre 0,6 a 22,0 ng/ml. Tres muestras dieron niveles de suPAR por debajo de (2) o por encima (1) del intervalo validado del ensayo y se excluyeron del análisis. Datos sobre cáncer se obtuvieron del Registro Nacional de Salud por un estadístico, sin conocimiento de los niveles de los individuos suPAR. El cáncer se diagnosticó utilizando la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) -8 y 10 códigos. Si el código ICD era C500: C509, el diagnóstico se establece como el cáncer de mama. C340: C349 se establece en el cáncer de pulmón. Durante el seguimiento, 28 desarrollaron colorrectal, 5 neoplasias desarrollados, 37 desarrollaron cáncer de pulmón, 4 de melanoma, cáncer de mama 23, uno cuello uterino, endometrio 3, seis de ovario, 12 de próstata, 9 de vejiga, 9 de leucemia El estudio MONICA fue aprobado por el comité local de atención.

Estadística: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se llevó a cabo en cuartiles suPAR y la prueba de diferencia entre los cuartiles utilizando la prueba del orden logarítmico. Se utilizó un análisis de regresión de Cox para determinar los cocientes de riesgos instantáneos y la independencia de suPAR. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados: 66 individuos tenían un diagnóstico de cáncer antes de tomar muestras de sangre y fueron excluidos del análisis. Durante el seguimiento, 136 desarrollaron cáncer.

Análisis de Kaplan Meier del tiempo hasta el diagnóstico de cáncer. La cohorte de dividió en 4 grupos de igual tamaño sobre la base de los niveles de suPAR; un grupo de suPAR bajo (N = 650, rango de suPAR 1,34 a 3,4 ng/ml), un grupo de suPAR bajo a medio (N = 651, rango de 3,4 a 4,0), un mediano grupo de alto suPAR (N = 651, rango de 4.0 - 4.9) y un grupo de alto suPAR (N = 650, rango de 4,9 a 19,9). . Los individuos que tenían un diagnóstico de cáncer fueron censurados a partir del análisis y un análisis de Kaplan Meier en el momento de diagnóstico de cáncer se muestra en la Figura 14 (p del orden log, p < 0,001).

Análisis de regresión de Cox ajustado por la edad en el tiempo hasta el diagnóstico de cáncer Con el fin de abordar si suPAR era predictor independiente de cáncer, el análisis multivariable se llevó a cabo En el análisis de regresión de Cox ajustado por edad y por sexo, un incremento de 1 ng de suPAR (suPAR osciló entre 1,3 y 19,9 ng/ml) se asoció con un aumento del cociente de riesgos instantáneos (HR) de desarrollar cáncer de 1,34 (IC del 95%: 1,32 - 1,44 %). El análisis de Cox univariable (ajustado por la edad) se realizó durante una serie de posibles predictores de riesgo de cáncer, incluyendo el sexo (p = 0,8), la presión diastólica y sistólica (p = 0,5 y 0,3, respectivamente), el síndrome metabólico (p = 0,3), la diabetes (p = 0,9), el ejercicio (p = 0,02), tabaquismo (p <0,001), hemoglobina (p = 0,9), el colesterol LDL (p = 0,14), colesterol HDL (p = 0,4), colesterol total (P = 0,06), triglicéridos (P = 0,5), el nivel de glucosa en ayunas (p = 0,5), la hsCRP (P = 0,4) y el IMC (P = 0,04). En el análisis multivariable de regresión de Cox ajustado por edad, se incluyeron predictores que fueron significativos o llevan una tendencia en el análisis multifactorial ajustado por edad. Incluyendo suPAR, el IMC, el ejercicio, el colesterol total y el tabaquismo, sólo suPAR y fumar predice el desarrollo de cáncer (Tabla 15). **Cáncer de mama (análisis de subgrupos).** Durante el seguimiento, 22 mujeres desarrollaron cáncer. En el análisis univariable, un aumento de 1 ng/ml de suPAR estaba asociado con una HR de 1,37 (IC del 95 %: 1,15 - 1,62), p < 0,001). El ajuste por edad no alteró este aumento del riesgo (edad ajustada HR = 1,35, IC del 95 %: 1,13 - 1,61) para el desarrollo de cáncer de mama. El tabaquismo, el ejercicio o los lípidos no se asociaron significativamente con el riesgo futuro de desarrollar cáncer de mama. Sólo mujeres desarrollaron cáncer de mama. El análisis de Kaplan Meier en los cuartiles de suPAR (basado en los 2602 individuos y con exclusión de los individuos con cualquier tipo de cáncer al inicio del estudio) mostró que los individuos con suPAR más bajo (línea fina de la figura 15) tenían un riesgo significativamente menor de desarrollar cáncer de mama en comparación con los individuos en el cuartil más alto de suPAR (línea más gruesa en la Figura 15).

TABLA 15

suPAR0123	**Total N**	N de acontecimientos	**Censurado**	
			N	**Porcentaje**
0,00	642	2	640	99,7 %
1,00	638	6	632	99,1 %
2,00	631	4	627	99,4 %
3,00	625	10	615	98,4 %
Global	2536	22	2514	99,1 %

Comparaciones globales –TABLA 16

	Chi-cuadrado	**DF**	**Sig.**
Orden log (Mantel-Cox)	5,389	1	0,020

Cáncer de pulmón; Durante el seguimiento, 36 individuos desarrollaron cáncer de pulmón. En el análisis de regresión de Cox multivariable ajustado por edad, suPAR (HR = 1,49, IC del 95 %: ,32 a 1,69 por ng/ml de aumento), sexo (los varones tenían un mayor riesgo de 3,1 (IC del 95 %: 1,45 a 1,45 a 6,56) y el tabaquismo (fumadores diarios tenían un mayor riesgo de 5,16 (IC del 95 % 02.21 a 12.04) se asociaron significativamente con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Al mirar el valor wald (Tabla 17), suPAR era la mejor variable para explicar el desarrollo futuro de cáncer de pulmón.

El análisis de Kaplan Meier en los cuartiles de suPAR (basado en los 2602 individuos y con exclusión de los individuos con cualquier tipo de cáncer al inicio del estudio) mostró que los individuos con suPAR más bajo (línea fina de la figura 16, más adelante) la mediana de bajo suPAR (línea más fina), suPAR mediano alto (segunda línea más gruesa) y suPAR más alto (línea más gruesa) tuvieron un riesgo significativamente diferente de desarrollar cáncer de pulmón (p < 0,001, prueba del orden log.) en comparación con individuos en el cuartil de suPAR más alto.

TABLA 17-Resumen de procesamiento de Casos

suPAR0123	**N Total**	**N de acontecimientos**	**Censurado**	
			N	**Porcentaje**
0,00	642	1	641	99,8 %
1,00	638	5	633	99,2 %
2,00	631	9	622	98,6 %
3,00	625	21	604	96,6 %

Global	2536	36	2500	98,6 %

TABLA 18-Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	DF	Sig.
Orden log (Mantel-Cox)	25,167	1	0,000

Leucemia; Durante el seguimiento, 9 individuos desarrollaron leucemia. En el análisis de univariable, suPAR (HR = 1,45, IC del 95 %: 1,15 - 1,82 por cada incremento ng) se asoció significativamente con el riesgo de desarrollar leucemia. Ni la edad (HR = 1,06, IC del 95 %: 0,99 - 1,14), el sexo (HR = 0,28 para ser varón, IC del 95 % 0,6-1,2) o el tabaquismo (HR = 2,85, IC del 95 %:0.7-11 0,4) se asoció significativamente con el riesgo de desarrollar leucemia. Debido al pequeño número de acontecimientos (9 desarrollaron leucemia), Kaplan Meier se llevó a cabo utilizando la mediana de suPAR sobre los 2.602 individuos con exclusión de los que tenían cáncer al inicio del estudio (Ver la Figura 17).

Tabla 19 – Leucemia

suPAR0123	N Total	N de acontecimientos	Censurado	
			N	Porcentaje
suPAR bajo	642	0	642	100,0 %
suPAR mediano bajo	638	1	637	99,8 %
suPAR mediano alto	631	2	629	99,7 %
SuPAR alto	625	6	619	99,0 %
Global	2536	9	2527	99,6 %

Tabla 20-Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	DF	Sig.
Orden log (Mantel-Cox)	8,882	1	0,003

Cáncer de próstata: Durante el seguimiento, 10 individuos desarrollaron cáncer de próstata. SuPAR tiende a predecir el desarrollo con una HR de 1,31 ng por aumento suPAR/ml (IC del 95 %: 0,98 - 1,75). Número de acontecimientos en cada cuartil de suPAR se muestra a continuación (p = 0,12)

Tabla 21 Cáncer de próstata

suPAR0123	N Total	N de acontecimientos	Censurado	
			N	Porcentaje
0,00	642	1	641	99,8 %
1,00	638	2	636	99,7 %
2,00	631	3	628	99,5 %
3,00	625	4	621	99,4 %
Global	2536	10	2526	99,6 %

Discusión: Los resultados indican que suPAR es un predictor altamente significativo e independiente del riesgo futuro de desarrollar cáncer en las personas que no tienen cáncer en el momento de la extracción de sangre. De acuerdo con el valor-wald, suPAR fue el predictor más fuerte de desarrollo de cáncer en general (ver Tabla 22). El análisis de subgrupos mostró, independiente de otros predictores, incluyendo la edad, el sexo y el tabaquismo, que el aumento de los niveles de suPAR basales aumenta significativamente el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, de mama y la leucemia y la tendencia se observó con respecto al cáncer de próstata. Con respecto a las formas de cáncer menores (excluyendo cáncer de mama y de pulmón) suPAR se asoció significativamente con el desarrollo de cáncer no de pulmón/no de mama. Las formas de cáncer menores incluyeron los cánceres colorrectales, neoplasias, melanoma, cuello uterino, endometrio, ovario, próstata y vejiga

Tabla 22 Todos los Cánceres

	Wald	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
				Inferior	Superior
SuPAR (ng/ml)	20,1	0,000	1,27	1,15	1,41
Sexo	0,1	0,825	1,04	0,73	1,48
Tabaquismo	7,7	0,006	1,70	1,17	2,48
Colesterol total	3,5	0,060	1,00	0,99	1,00
Ejercicio	3,4	0,065	0,77	0,587	1,02
IMC	2,1	0,145	0,97	0,928	1,01

Tabla 23. Análisis multivariable de regresión de Cox ajustada por edad en el desarrollo de un exceso de todos los cánceres (N = 136)

	Wald	Sig.	(B).	IC del 95,0 % para el Exp. (B)	
				Inferior	Superior
SuPAR (por incremento de ng/ml)	**39,535**	0,000	**1,492**	1,317	1,690
Edad (por año mayor)	24,377	0,000	1,098	1,058	1,140
Sexo (varones vs mujeres)	8,540	0,003	3,083	1,449	6,561
Fumar (fumadores diarios vs fumadores no diarios)	14,385	0,000	5,157	2,209	12,038

Como se ha indicado anteriormente, el análisis de Kaplan Meier del tiempo hasta el diagnóstico del cáncer en general se muestra en la Figura 14. La línea superior fina representa el cuartil más bajo de suPAR, la de abajo (línea fina mediana) representa el segundo cuartil más bajo de suPAR, la línea gruesa media representa el segundo cuartil más alto de suPAR y la más gruesa (línea inferior) representa el cuartil más alto de suPAR. P < 0,001, prueba del orden logarítmico. SuPAR y el riesgo de desarrollar cáncer no de pulmón/no de mama. Al excluir de pulmón y cáncer de mama, 66 individuos desarrollaron otras formas de cáncer. De acuerdo con la mediana de suPAR, aquellos con suPAR encima de la mediana tuvieron significativamente mayor probabilidad de desarrollar cáncer no de pulmón/no de mama. durante el seguimiento (Figura 18)

Ejemplo 11. Otros estudios sobre el uso de suPAR, como un predictor de enfermedad cardiovascular y la mortalidad en individuos aparentemente sanos

Materiales y procedimientos

La cohorte MONICA 10: En 1982-1984, 4.807 personas, de 30, 40, 50 o 60 años de edad seleccionadas al azar de la población que vive en las cercanías del Hospital Universitario Glostrup, Dinamarca, fueron invitadas a participar en una encuesta de población. En 1993 a 1994, se volvió a invitar a 3785 y 2656 vinieron y participaron en investigaciones posteriores y donaron sangre. 2605 muestras de plasma obtenidas de junio de 1993 hasta diciembre 94 estaban disponibles para el estudio. Los 2.605 participantes completaron un cuestionario de auto-administración.

Sobre la base de la actividad física auto-reportada, los participantes fueron divididos en 4 grupos: sujetos sin actividad física (20 %), los sujetos con una actividad física moderada (caminar todos los días, andar en bicicleta o menos de media hora de actividad deportiva cada día (55 %) y sujetos que ejercen más de media hora todos los días (21 %) deportistas profesionales (N = 17). El 4 % no llenó el cuestionario sobre el ejercicio 1.091 participantes eran fumadores diarios (42 %), 106 (4 %) indicaron que fumaban ocasionalmente y 1405 (54 %) eran no fumadores. Cuando se introduce en los modelos estadísticos, los fumadores ocasionales se agruparon con los no fumadores. El consumo de alcohol se agrupó en dos grupos en función de si los participantes bebieron más o menos de la recomendación de los Ministerios de Salud Daneses (21 unidades de alcohol (1 unidad = 12 g de alcohol) por semana para varones y 14 para las mujeres). Información de la ECV se obtuvo en diciembre de 2001 a través del Registro Nacional de Salud de Dinamarca y de los datos se han validado previamente. Un criterio de valoración ECV compuesto de muerte CV, infarto de miocardio no mortal e ictus no mortal se utilizaron para el análisis estadístico, ya que las apariciones previas de estos criterios de valoración se registraron al inicio del estudio. La mediana del tiempo de seguimiento fue de 7,6 años ECV. Durante el seguimiento, 316 desarrollaron ECV de los cuales 291 eran no fatales. De los 316, 118 desarrollaron un CI de los cuales 70 fueron diagnosticados de IAM. Tras una mediana de 11,0 años de seguimiento (diciembre de 2005), la información sobre la mortalidad se obtuvo a través del Sistema de Registro Civil. Durante el seguimiento 388 murieron, y 13 se perdieron durante el seguimiento, El IMC se calculó como el peso dividido por la altura al cuadrado (kg/m^2)-

La presión arterial se midió sentado después de 5 minutos de descanso usando un esfigmomanómetro de mercurio y se informó de la media de dos mediciones

Ejercicio: Sobre la base de la actividad física auto-notificada los participantes fueron divididos en 3 grupos: 1) sujetos sin actividad física, 2) sujetos con una actividad física moderada (caminar todos los días, andar en bicicleta o menos de media hora de actividad deportiva cada día), 3) sujetos que ejercen más de media hora todos los días y 4) atletas profesionales. El estudio fue aprobado por el comité local de atención y los sujetos dieron su consentimiento informado.

Mediciones de SuPAR: SuPAR se midió utilizando el kit de suPARnostic ™ (ViroGates, Copenhague, Dinamarca). El kit se desarrolló para medir la progresión de la enfermedad en el VIH-1 en individuos infectados. Brevemente, el kit viene con placas prerevestidas con anticuerpo monoclonal de captura y un anticuerpo monoclonal de detección marcado con HRP, que se añade al tampón de dilución de la muestra. A continuación, 25 µl de la muestra de plasma se mezclan con 225 µl de tampón de dilución y a la placa prerevestida se añaden 100 µl (por duplicado) y se incuban durante una hora. Después del lavado, se añadieron 50 µl de sustrato durante 20 minutos y la reacción se detuvo con 50 µl de H_2SO_4 0,5M. Las placas se midieron a 450 nm con referencia a 630 nM. Las muestras se marcaron con un número y el técnico no tenía conocimiento de la identidad de la muestra del paciente. La variación dentro del ensayo fue de 2,75 % y la variación entre ensayos 9,17 %. Se midieron 2605 muestras. La curva estándar del kit fue

se valida para medir los niveles de suPAR entre 0,6 a 22,0 ng/ml. Tres muestras dieron niveles de suPAR por debajo de (2) o por encima (1) del intervalo validado del ensayo y se excluyeron del análisis. No se observaron correlaciones entre los niveles de suPAR y la fecha de la toma de muestras de plasma (las muestras se obtuvieron entre junio de 1993 y diciembre de 1994), lo que indica el tiempo de congelación de la muestra no influye en el nivel en plasma de suPAR (rho = 0,001, p = 0,96).

Estadística: La importancia pronóstica de suPAR fue investigado para dos resultados diferentes. Estos fueron el tiempo transcurrido desde la muestra de sangre en 1993-94 hasta el 1) el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares y 2) la muerte. Después de estratificar suPAR en cuatro grupos de acuerdo a sus cuartiles, en un gráfico de Kaplan-Meier se dibujó para el tiempo hasta la muerte, Para el tiempo hasta la ECV, se llevó a cabo un análisis de riesgos competitivos con ECV y la muerte como los riesgos de la competencia, y se dibujó la estimación del tiempo hasta la ECV, Se usó el modelo de riesgos proporcionales de Cox se utilizó para el análisis de rendimiento cociente de riesgos instantáneos para la cuantificación de la magnitud del efecto. En primer lugar, el efecto de suPAR se estimó en diferentes modelos, todos incluyendo la edad y el sexo. Para investigar si se confunden los efectos de suPAR sobre los resultados, tres grupos de variables, denominadas estilo de vida, lípidos, y cardiovascular, se incluyeron por separado y conjuntamente, y el efecto de suPAR se estimó en estos modelos. En el análisis, las siguientes variables se introdujeron como continuas: edad, suPAR, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, el IMC y la circunferencia de la cintura; Las siguientes variables se introdujeron como categóricas: sexo, tabaquismo (def), ejercicio (def) y alcohol (def). En segundo lugar, ajustada por edad y sexo, los cocientes de riesgos instantáneos se calculan para todas las demás variables.

Utilizando análisis de regresión múltiple, los riesgos relativos se ajustaron por edad y sexo, calculando el cociente de regresión estandarizado para las medidas de estilo de vida (ejercicio diario, el consumo de alcohol y tabaquismo), lípidos (colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos) y los factores de riesgo metabólico (diastólica y la presión arterial sistólica, índice de masa corporal, cintura),

Resultados: SuPAR se cuantificó en 2.602 individuos. La mediana suPAR fue de 4,03 ml de plasma/ng (intervalo 1,3 a 19,9). Los niveles de suPAR aumentaron con la edad y eran más altos entre las mujeres (N = 1292, mediana de suPAR 4,26, intervalo 1,9-19,9) en comparación con los varones (N = 1,310, mediana de suPAR 3,84, intervalo 1,3-17,8), p <0,001.

SuPAR predice ECV independiente de marcadores cardiovascular clásicos. En el momento de la obtención de muestras, 209 individuos habían experimentado ya una ECV y fueron excluidos del análisis de riesgos de ECV. Durante el seguimiento, 316 desarrollaron un acontecimiento cardiovascular. En el análisis de regresión de Cox ajustado por edad y por sexo, un aumento de 1 ng/ml de suPAR estaba asociado con un incremento del riesgo de 19 % (IC del 95 %: 12 - 25 %) de desarrollar un acontecimiento cardiovascular. Para determinar si suPAR era un marcador independiente de CV se determinó la influencia de los marcadores clásicos de riesgo cardiovascular en el cociente de riesgos instantáneos (HR) de suPAR (ver tabla 24).

Tabla 24. El riesgo relativo por incremento suPAR ng ajustar para otros factores de riesgo

	ECV HR (IC del 95 %)	**Mortalidad HR (IC del 95 %)**
SuPAR	N = 2379 1,19 (1,12 - 1,25)	N = 2602 1,24 (1,19 - 1,29)
Estilo de vida (tabaquismo, ejercicio, alcohol)	N = 2324 1,15 (1,08 - 1,22)	N = 2537 1,21 (1,16 - 1,27)
Lípidos (Colesterol total (COL, colesterol HDL, triglicéridos)	N = 2378 1,19 (1,12 - 1,25)	N = 2601 1,24 (1,19 - 1,29)
Factores de riesgo de ECV Diastólica y la presión arterial sistólica, índice de masa corporal, cintura	N = 2379 1,18 (1,12 - 1,25)	N = 2602 1,25 (1,19 - 1,30)
Todos	N = 2323 1,13 (1,06 - 1,22)	N = 2536 1,22 (1,16 - 1,28)

Como se muestra en la Tabla 24, el efecto sobre suPAR se mantuvo prácticamente sin cambios cuando se incluyeron los marcadores de riesgo cardiovascular y se puede concluir que suPAR es un predictor independiente de ECV.

Con el fin de comparar directamente los valores predictivos de suPAR y los marcadores de riesgo clásicos sobre el futuro riesgo de desarrollar ECV, se utilizó el cambio de una desviación estándar (SD). Como se muestra en la Tabla 25, suPAR fue el segundo mejor predictor (después de la presión arterial diastólica) para la evaluación de un futuro acontecimiento de ECV.

Tabla 25. Cocientes de riesgos instantáneos de un cambio de 1 SD para el riesgo de desarrollar ECV y la mortalidad

	HR de ECV (IC del 95 %)	Mortalidad total
SuPAR	1,26 (1,17 - 1,36)	1,34 (1,27 - 1,41)
HDL	0,92 (0,81 - 1,04)	0,96 (0,86 - 1,07)
Colesterol total	1,07 (0,96 - 1,20)	0,95 (0,85 - 1,05)
Triglicéridos	1,10 (1,00 - 1,21)	1,03 (0,93 - 1,15)
Presión arterial sistémica	1,07 (0,96 - 1,20)	1,15 (1,04 - 1,28)
Presión arterial diastólica	1,41 (1,26 - 1,58)	1,14 (1,03 - 1,26)
Índice de masa corporal	1,05 (0,93 - 1,18)	0,93 (0,84 - 1,04)
Cintura	1,22 (1,08 - 1,38)	1,07 (0,95 - 1,20)

Los niveles de SuPAR son predictivos de la longevidad

Durante el seguimiento de 11 años, 388 individuos murieron (150 mujeres y 238 varones) y 13 se perdieron para el seguimiento, Al dividir la cohorte en cuartiles basándose en los valores de suPAR, se observó una diferencia significativa en la supervivencia entre todos los cuartiles.

En el análisis de regresión de Cox, un aumento de 1 ng/ml de suPAR estaba asociado con un incremento del riesgo de 24 % de la mortalidad durante el seguimiento (IC del 95 %: 19 - 29 %). En el análisis multivariable (Tabla 24), el riesgo permaneció prácticamente sin cambios mediante la adición de otros factores de riesgo de mortalidad. En la comparación directa con otras variables medidas y registradas, un cambio de 1 SE en suPAR fue el marcador más fuerte de la mortalidad. Para determinar si el efecto de suPAR era más pronunciada en la etapa temprana o tardía de la vida, se realizó un análisis por subgrupos para los cuatro grupos de edad. El RH de la mortalidad entre individuos de 41 años de edad fue de 1,47 (IC del 95 %: 1,30 a 1,67 por 1 ng/ml incremento suPAR), para individuos de 51 años de edad 1,53 (IC del 95 %: 1,31 a 1,79), para individuos de 61 años de edad 1,36 (IC del 95 %: 1,31 a 1,49), para individuos de 71 años de edad 1,12 (IC del 95 %: 1,05 - 1,20).

Los niveles de SuPAR se correlacionan con el estilo de vida

De los 2.602 individuos, 1.091 eran fumadores, 1511 no fumadores y 106 fumadores ocasionales (106 de los 1511). Tanto en varones como en mujeres, el tabaquismo diario se asoció con niveles de suPAR significativamente elevados. Los varones no fumadores (N = 730) tenían un nivel medio de suPAR de 3,72 ng/ml (SD 1,20), que fue significativamente más bajo que el de los varones fumadores (N = 580, media de suPAR= 4,57, SD 1.45 ng/ml), $p < 0,001$. Del mismo modo, las mujeres no fumadoras (N = 781) tenían una media de suPAR 4,07 (SD 1,13) y las mujeres fumadoras (N = 511) de 5,11 (SD 1,38), $p < 0,001$. Entre los 1.511 fumadores, 614 indicaron que antes fumaban. Los exfumadores tenían niveles significativamente menores de suPAR en comparación con los individuos que continuaban fumando (44,0 vs 4,8 ng/ml, $p < 0,001$). El riesgo de ECV fue significativo tanto entre los no fumadores (ajustado por edad y sexo, HR = 1,11 por incremento ng/ml (IC del 95 %: 1,01 - 1,23) y fumadores (HR = 1,21, (IC del 95 %: 1,10 - 1,31). Con respecto a la mortalidad total, el HR entre los no fumadores fue de 1,17 (IC del 95 %: 1,10 - 1,25) y entre los fumadores habituales 1,31 (IC del 95 %: 1,21 - 1,42) (por ng de incremento de suPAR.

También se determinó si los niveles de uPAR se veían influidos por el ejercicio. Utilizando la prueba de Mann-Whitney, se encontró que los individuos que hacían ejercicio más de 30 minutos al día tenían niveles de suPAR significativamente más bajos que los individuos que indicaban no hacer ejercicio, una observación que fue significativa entre los individuos de 41 ($p < 0,001$), 51 ($p < 0,001$), y 61 ($p = 0,01$) años de edad.

Los resultados indican que el nivel en plasma de suPAR predice la enfermedad cardiovascular futura. El aumento del riesgo por ng/ml de incremento del nivel de suPAR no se redujo mediante la adición de los marcadores clásicos de las ECV, lo que indica que suPAR es un nuevo e independiente marcador de ECV.

Ejemplo 12: De salud a enfermedad, un análisis compuesto

Materiales y procedimientos

La cohorte MONICA10 como se ha descrito en lo que antecede.

Para determinar la capacidad de suPAR para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad (ECV, DMT2, cáncer o muerte) en individuos sanos, se excluyeron los 220 individuos con un acontecimiento anterior de ECV, DMT2, o cáncer diagnosticado al inicio del estudio. En las 2.382 personas restantes, en el análisis de regresión de Cox ajustado por la edad y el sexo, un aumento de 1 cuartil del suPAR se asoció con un incremento del riesgo de 59 % de desarrollar la variable compuesta que consiste en las enfermedades ECV, DNT2, cáncer o muerte (IC del 95 %: 47 - 72 %, Tabla 26). Tras ajustar por otros marcadores, suPAR siguió siendo un predictor significativo de enfermedad con un HR del 41 % (IC del 95 %: 29 - 57 %, Tabla 26). Los individuos dentro del cuartil más alto suPAR presentaban el mayor riesgo de desarrollar la enfermedad ($P < 0,001$).

La Tabla 26, a continuación, muestra el cociente de riesgos instantáneos para el rango intercuartílico de cada variable (excepto tabaquismo, ejercicio y alcohol, que se introdujeron como variables agrupadas). Los rangos intercuartílicos se muestran en la Tabla 1. Los individuos con antecedentes de la enfermedad investigada fueron excluidos del análisis. Todos los cocientes de riesgos instantáneos se ajustaron por sexo y edad.

Tabla 26

Variable	Grupos/unidad	ECV	Diabetes	Cáncer	Mortalidad	Compuesto
SuPAR	por 1,55 ng/ml	1,35 (1,23 - 1,49)	1,46 (1,20 - 1,76)	1,59 (1,39 - 1,81)	1,39 (1,31 - 1,48)	1,59 (1,46 - 1,73)
Tabaquismo	No	1	1	1	1	1
	Ocasional	0,89 (0,47 - 1,69)	0,58 (0,08 - 4,34)	1,99 (0,95 - 4,16)	0,86 (0,45 - 1,62)	1,02 (0,59 - 1,76)
	Habitual	1,78 (1,42 - 2,24)	0,86 (0,43 - 1,71)	2,58 (1,85 - 3,60)	2,11 (1,72 - 2,59)	2,15 (1,76 - 2,63)
Ejercicio	Inactivo	1	No analizada	1	1	1
	Ligeramente activo	0,65 (0,49 - 0,86)	No analizada	0,72 (0,49 - 1,05)	0,56 (0,44 - 0,71)	0,36 (0,11 - 1,16)
	Muy activo	0,51 (0,36 - 0,73)	No analizada	0,42 (0,25 - 0,73)	0,39 (0,28 - 0,52)	0,52 (0,17 - 1,64)
	Profesional	0,41 (0,06 - 2,20)	No analizada	1,25 (0,91 - 1,71)	1,6 (0,5 - 5,11)	0,83 (0,26 - 2,62)
Ingesta de alcohol	Inferior a lo recomendado	1	1	1	1	1
	Superior a lo recomendado	11,48 (1,12 - 1,95)	2,25 (1,09 - 4,65)	1,22 (0,82 - 1,83)	1,63 (1,28 - 2,08)	1,52 (1,19 - 1,93)
HDL	Por 0,53 mmol/l	0,90 (0,77 - 1,05)	0,92 (0,18 - 4,70)	0,88 (0,71 - 1,09)	0,95 (0,83 - 1,10)	0,74 (0,46 - 1,10)
Triglicéridos por 0,83 mmol/l		1,08 (1,00 - 1,17)	1,28 (1,16 - 1,40)	1,29 (1,03 - 1,64)	1,03 (0,94 - 1,12)	1,07 (0,99 - 1,15)
Colesterol total por 1,4 mmol/l		1,10 (0,95 - 1,26)	0,89 (0,64 - 1,24)	0,77 (0,50 - 1,20)	0,94 (0,82 - 1,07)	1,03 (0,91 - 1,16)
Presión arterial sistólica		1,60 (1,39 - 1,85)	1,74 (1,28 - 2,36)	1,76 (1,19 - 2,61)	1,19 (1,04 - 1,37)	1,34 (1,18 - 1,52)
Presión arterial diastólica		1,32 (1,21 - 1,44)	1,85 (1,34 - 2,56)	1,96 (1,31 - 2,93)	1,12 (1,03 - 1,21)	1,26 (1,10 - 1,44)
IMC	Por 5,27 kg/m^2	1,07 (0,93 - 1,23)	2,07 (1,48 - 2,87)	0,78 (0,63 - 0,97)	0,92 (0,80 - 1,05)	0,98 (0,88 - 1,11)
Cintura	Por 18 cm	1,33 (1,11 - 1,59)	2,55 (1,61 - 4,04)	0,89 (0,68 - 1,16)	1,10 (0,93 - 1,30)	1,16 (0,99 - 1,37)
Glucosa en sangre	Por 0,6 mmol/l	1,11 (1,05 - 1,16)	8,43 (3,72 - 19,1)	1,01 (0,92 - 1,10)	1,09 (1,05 - 1,13)	1,23 (1,10 - 1,38)
hsCRP	Por 3,17 mg/ml	1,59 (1,31 - 1,94)	1,12 (1,01 - 1,24)	1,23 (0,96 - 1,57)	1,58 (1,35 - 1,84)	1,11 (1,07 - 1,14)
Leucocitos	Por 2,2 x10^9 células/l	1,35 (1,17 - 1,56)	1,37 (0,98 - 1,93)	1,22 (1,03 - 1,46)	1,37 (1,23 - 1,53)	1,37 (1,24 - 1,52)

*No analizado por disponer de muy pocos criterios de valoración

Ejemplo 13 Anticuerpos para la cuantificación de suPAR en una muestra de un individuo

Un procedimiento para la medición de fragmentos suPAR y de suPAR en una muestra biológica de un individuo emplea los anticuerpos (VG-1 y VG-2) que tienen las siguientes características:

- son capaces de reconocer y unirse a suPAR de longitud completa
- son capaces de reconocer y unirse al fragmento de suPAR $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$ obtenido por escisión con quimotripsina

- no reconocen ni se unen a la secuencia de aminoácidos quimotáctica SRSRY, que se muestra mediante la escisión de suPAR con quimotripsina
- no reconocen ni se unen a la secuencia de aminoácidos ATVYSRSRY, que se encuentra a partir de los aminoácidos 84 a 92 en la región de engarce entre D_1y D_2D_3

Descripción de la especificidad de anticuerpo VG-1 y VG-2

La especificidad de los anticuerpos usados en el ELISA, suPARnostic ® (disponible comercialmente en Virogates A/S, Dinamarca), a saber VG-1 (anticuerpo de recubrimiento) y VG-2 (anticuerpo de detección), se muestra en las figuras 19 y 20. Estos anticuerpos monoclonales producidos contra el suPAR de longitud completa humano en rata (VG-1) y ratón (VG-2), reconocen específicamente los suPAR de longitud completa, $D1D_2D_{3\ (1\text{-}277)}$., Los anticuerpos también reconocen específicamente el fragmento suPAR, $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$, que se obtiene por escisión con quimotripsina Los anticuerpos no reconocen la secuencia de ácido amino sintetizado SRSRY, que corresponde a los residuos activos quimiotácticos 88 a 92 de la $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$ que se muestra en el extremo amino después de la escisión con quimotripsina (figura 19). Tampoco reconocen los anticuerpos la secuencia de aminoácidos sintetizada ATVYSRSRY, que corresponde a los residuos en el extremo amino de 84 a 92 que pueden obtenerse por escisión con la uPA. Sin embargo, una mezcla de anticuerpo policlonal obtenida por inmunización de conejos con suPAR de longitud completa fue capaz de reconocer, aunque con intensidades bajas, la secuencia del péptido ATVYSRSRY. Además, un anticuerpo policlonal obtenido de conejos inmunizados con la secuencia peptídica SRSRY reconoció tanto la secuencia SRSRY como ATVYSRSRY.

En conclusión, se ha demostrado que los anticuerpos (VG-1 y VG-2) reconocen y se unen a suPAR de longitud completa y al fragmento de suPAR $D_2D_{3\ (88\text{-}277)}$ obtenido por escisión con quimotripsina. Sin embargo, los anticuerpos no reconocen ni se unen a la secuencia quimotáctica activa SRSRY o la secuencia en el extremo amino AVTYSRSRY, que puede obtenerse por escisión con la uPA.

Los anticuerpos del tipo VG-1 y VG-2 son adecuados para su uso en cualquiera de estos procedimientos.

Ejemplo 14: suPAR es un inductor de la inflamación

Se ha demostrado que los niveles elevados de suPAR se son diagnósticos de una afección proinflamatoria y que predicen el riesgo de enfermedad. Si suPAR induce la afección proinflamatoria, la eliminación de suPAR, por ejemplo, mediante la administración de anticuerpos anti-suPAR, reduciría la inflamación del individuo

El propósito del presente ejemplo era investigar si suPAR induce la afección proinflamatoria subclínica o si refleja una afección proinflamatoria. En el presente ejemplo, el suPAR de longitud completa purificado ($D1D2D3_{(1\text{-}277)}$) así como el fragmento D2D3 de suPAR ($D2D3_{(88\text{-}27)}$), se añadió a sangre humana recién extraída y se midieron 10 citocinas relevantes en diferentes momentos después de la estimulación.

<u>Materiales y procedimientos</u>

A continuación se muestra una visión general del flujo experimental

Producción de la línea de células CHO de suPAR $D1D2D3_{(1\text{-}277)}$

↓

Purificación de $D1D2D3_{(1\ -\ 277)}$ del medio de cultivo celular por cromatografía de afinidad

↓

Digestión con quimotripsina de $D1D2D3_{(1\text{-}277)}$ en $D2D3_{(88\text{-}277)}$ y $D1_{(1\text{-}87)}$.

↓

Cromatografía de afinidad utilizando adicional los anticuerpos de unión D3 y D1, respectivamente

↓

Análisis por SDS-PAGE, transferencia de tipo Western y tinción de plata para la prueba de pureza

↓

exposición de D1 D2D3 y $D2D3_{(88\text{-}277)}$ a sangre completa

↓

Análisis de perfil de citocinas por Luminex múltiplex

↓

Resultados

Producción de la línea de células CHO de suPAR D1D2D3$_{(1-277)}$

La línea de células CHO se transfectó de forma estable con el gen de uPAR humano recombinante de longitud completa.

Las células CHO se cultivaron en 90 % de Medio Eagle Modificado de Dulbecco con GlutaMAX ™ I, piruvato de sodio (D-MEM, Invitrogen Nº de cat. 31966-021) y 10 % de FBS a 37 °C en un incubador humidificado con 5 % de CO_2 suplementado con 50 unidades/ml de penicilina y estreptomicina 50µg/ml (Sigma, Nº de cat. P4333) y metotrexato 100 nM (MTX, Sigma-Aldrich Nº de cat. A6770) como agente selectivo para asegurar que solo las células transfectadas de forma estable dominan la población.

Purificación de D1D2D3$_{(1 - 277)}$ del medio de cultivo celular por cromatografía de afinidad

Una columna de VG-1 anti-suPAR (ViroGates, Dinamarca) se equilibró con 20 ml de PBS antes de que los medios de la línea celular CHO-celular que contenía suPAR humano recombinante se aplicara a una velocidad de la bomba volumétrica de 1,5 ml/min. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 20 ml de PBS a pH 7,4 para eliminar las proteínas no unidas y los componentes del medio, especialmente la albúmina, la proteína más abundante en el suplemento de crecimiento de suero bovino. Por último, el suPAR obligado por inmunoafinidad a VG-1 se eluyó con 0tampón citrato ,1 M a pH 3,0 (Cat Sigma-Aldrich. No. c1909) para romper los enlaces no covalentes y eluir fragmentos de suPAR solamente. Los eluidos se recogieron en volúmenes de 2,5 ml y se intercambió el tampón en PBS 0,1 M a pH 7,4 usando las columnas PD-10 como se ha descrito previamente y se mantienen ya sea a -20 °C hasta su posterior análisis.

Digestión con quimotripsina de D1D2D3$_{(1 - 277)}$ a D2D3$_{(88 - 277)}$ and D1$_{(1 - 87}$

Para generar D2D3 (88-277) de suPAR de longitud completa, los eluidos se trataron con quimotripsina (Chymotrypsin sequencing grade Roche Applied Biosciences (Cat. No. 11 418 467 001) que escinde entre los aminoácidos 87 y 88). 3,5 ml del eluido de suPAR a una concentración de 9,2 mg/ml de suPAR se mezcló con 3,5 ml de tampón de digestión que consiste en 0,1 % de CHAPS y Tris.HCl 0,1 M a pH 8,1 dando una concentración final de tampón de 0,05 % de CHAPS y 0,05 % de Tris-HCl y una concentración final de suPAR de 4,6 g/ml. La solución se dividió en alícuotas en tubos de eppendorf en volúmenes de 250 µl y se añadió quimiotripsina para dar la concentración final deseada que van de 1 a 300 ng/ml de quimotripsina. Se añadió PBS hasta un volumen final de 500 µl. Después de 4 o 24 horas de incubación a 37 °C, la reacción enzimática se terminó mediante congelación de la muestra correspondiente a -20 °C. Los productos resultantes se separaron por tamaño mediante SDS-PAGE y después se transfirieron a una membrana de PVDF mediante transferencia de tipo Western (Figura 21).

Cromatografía de afinidad utilizando los anticuerpos de unión D3 y D1, respectivamente, Generación de D1D2D3 puro

Después de la purificación primaria por afinidad por la columna de VG-1, el eluato se intercambió con tampón en un tampón PBS a pH 7,4 y se aplicó a una columna de anticuerpo D1 para eliminar cualquier D_2D_3, dando un eluato D1D2D3 puro. Este tampón se intercambió en PBS a pH 7,4 y la concentración se determinó usando el kit de ELISA suPARnostic.

Generación del fragmento D2D3 suPAR puro

Cuando se prepara un eluato que consiste en D2D3, el procedimiento requirió etapas adicionales. Antes de la purificación primaria de suPAR, y un intercambio de tampón en PBS, se empleó una digestión enzimática con quimotripsina como se ha descrito anteriormente, dando los fragmentos D_1, D2D3 y posiblemente todavía algunos D1D2D3. Con el fin de purificar D2D3 de los fragmentos suPAR restantes, la columna de la anticuerpo anti-D1 se utilizó para la selección negativa, con lo cual se recogió el flujo que contenía D2D3 y quimotripsina. Este ensayo se realizó a través de la columna de VG-1 una vez más. Finalmente, el eluato se intercambió en tampón en PBS a pH 7,4 y se determinó la concentración. La pureza de los fragmentos D1D2D3 y D2D3 obtenidos se visualizaron usando tinción con plata (Figura 22) y se validó como moléculas de suPAR utilizando transferencia de tipo Western (Figura 20) y se demostró que se habían preparado compuestos puros correctos.

Con el fin de comparar y normalizar los efectos de la adición de suPAR a la sangre, la muestra simulada (control negativo) se preparó mediante la adición de tampón de elución de citrato a la columna sin cargar antes la muestra que contenía suPAR y, después, el intercambio de tampón del eluato (sin suPAR) en PBS, pH 7,4, para imitar el tampón de las muestras de suPAR. Si la elución produjera la rotura de algún enlace, interno en el anticuerpo o entre el anticuerpo y las perlas de sefarosa, y contaminara los eluidos de suPAR, las muestras simuladas contendrían el mismo fondo que los eluatos de suPAR.

Exposición de D1D2D3 and D2D3$_{(88 - 277)}$ a sangre entera

Se usó una mujer sana de 27 años de edad como donante de sangre y no ingirió comida durante 2 horas antes de la

extracción de sangre en ninguno de los ensayos. La sangre se obtuvo mediante venopunción en siete tubos de 10 ml estériles y revestidos con heparina-litio (tubos Venoject Li-Heparin, Terumo Nº cat. VT-100SHL)), que iban a usarse para el experimento y dos tubos de 4 ml con EDTA que se enviaron inmediatamente para el análisis de datos de la sangre al Departamento de Bioquímica Clínica, Unidad 339, Hospital Hvidovre. La concentración de las respectivas células de la sangre respectivos se determinó por citometría óptica enzimática (empleando dispersión de luz) utilizando un analizador de Bayer Advia® 120 Hematology Analyzer y la distinción linfocitos T CD4 y CD8 mediante citometría de flujo con anticuerpos marcados con fluorescencia (Los CDC recomiendan un procedimiento de 4 colores apartando los linfocitos CD45 +. La concentración de neutrófilos fue en el 1^{er}, 2^{o} y 3^{er} experimentos 4,0, 4,3 y 3,1 * 10^9células/l, respectivamente, eosinófilos 0,02, 0,05 y 0,07.* 10^9células/l, monocitos 0,3, 0,5 y 0,4 * 10^9células/l y linfocitos (sin especificar) 1,5, 1,7 y 1,9 * 10^9células/l. La concentración de basófilos fue de 0,01 * 10^9células/l en todos los experimentos. La concentración total de los leucocitos varió de 5.5, 6.6 a 5.8 * 10^9células/l.

Análisis del perfil de citocinas por Luminex múltiplex

El plasma se descongeló, se mantuvo en hielo y se analizó siguiendo las instrucciones del fabricante para el Kit Cytokine 10-plex AB Bead Kit, hu ™, Invitrogen, Nº cat. LHC0001) o un kit 10-plex Cytokine UltraSensitive™ AB Bead (BioSource ™, Invitrogen Nº cat. LHC6004) en el sistema Luminex ® MAP (Luminex Corporation) utilizando el software Starstation 2.0 (Applied Cytometry Systems). Si la variación dentro del ensayo era superior al 20 % se volvió a medir la muestra. Sobre la base de la variación en el ensayo, un aumento de un marcador se consideró biológicamente significativo si el análisis en cuestión superó el control (simulado) en más de un 50 %

Resultados

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes en los que las muestras de sangre entera se estimularon 5 min, 3 h, 6 h o 24 h con 100 ng/ml de $D1D2D3_{(1-277)}$, $D2D3_{(88-277)}$ o con que el efluente simulado. Las muestras de cada uno de los experimentos se midieron en los duplicados.

GM-CSF, IL-2, IL-4 e IL-5 no fueron inducidos de manera significativa por D1D2D3 o por D2D3. En relación con GM-CSF e IL-5, los resultados obtenidos estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación. La Tabla 27 muestra los resultados representativos de tres experimentos independientes.

Tabla 27: Concentraciones de citocinas (pg/ml) de muestras de sangre entera estimuladas 5 min, 3 h, 6 h o 24 h con 100 ng/ml de $D1D2D3_{(1 - 277)}$, $D2D3_{(88 - 277)}$ o con el eluido simular.

GM- CSF	**Resultados del ensayo**			
	5 min	**3 h**	**6 h**	**24 h**
Simulado (1)	0,59	0,59	0,59	0,59
100 ng/ml de D1D2D3	0,59	0,59	0,59	0,59
100 ng/ml de $D2D3_{(88 - 277)}$	0,59	0,59	0,59	0,59
IL -2	**Resultados del ensayo**			
	5 min	**3 h**	**6 h**	**24 h**
Simulado (1)	0,59	0,59	0,92	3,27
100 ng/ml de D1D2D3	0,59	0,59	0,92	3,89
100 ng/ml de $D2D3_{(88 - 277)}$	0,59	0,59	1,61	3,13
IL -4	**Resultados del ensayo**			
	5 min	**3 h**	**6 h**	**24 h**
Simulado (1)	1,23	1,87	4,26	8,08
100 ng/ml de D1D2D3	1,07	2,62	4,79	12,95
100 ng/ml de $D2D3_{(88 - 277)}$	1,26	2,40	3,09	7,35
IL -5	**Resultados del ensayo**			
	5 min	**3 h**	**6 h**	**24 h**
Simulado (1)	0,60	0,60	0,60	0,60
100 ng/ml de D1D2D3	0,60	0,60	0,60	0,60
100 ng/ml de $D2D3_{(88 - 277)}$	0,60	0,60	0,60	0,60

Por el contrario, las citocinas proinflamatorias, INF-gamma, IL-1 beta, IL-6, IL-8 y TNF-alfa se regularon por aumento mediante $DID2D3_{(1-277)}$ mientras que D2D3 tuvo menos efecto aunque se observó regulación por incremento de-TNF-alfa (figura 23).

Conclusiones

Este ejemplo mostró que suPAR de longitud completa es un inductor de ciertas citocinas, así como la quimiocina IL-8. Como puede verse en la Tabla 28 a continuación, la inducción en la fase temprana (hasta 6 horas después de la estimulación) se observó con respecto a la IL-1 beta, IL-6, IL-8 y TNF-alfa, mientras que no se observó regulación positiva significativa de las otras 6 citocinas investigadas. Las citocinas tempranas reguladas por incremento son todas ellas marcadores proinflamatorios. Como ve a menudo cuando se añade un marcador proinflamatorio, el efecto inducido es contrarrestado por la inducción tardía (después de 24 horas) de IL-10, que fue también el caso en lo que respecta a la estimulación de 24 horas con D1D2D3.

Sobre la base de estos resultados, se concluye que suPAR de longitud completa es un inductor activo de las vías inflamatorias

Tabla 28: Presentación esquemática de las citocinas y quimiocinas medidas (IL-8), las células fuente y diana y la función de las citocinas sobre las células diana.

	Función	**Pro o anti-inflamatoria**	**D2D3 temprana**	**D2D3 tardía**	**D1D2D3 temprana**	**D1D2D3 tardía**
GM-CSF	Inhibe la apoptosis de las células diana, la proliferación y la diferenciación en líneas granulocíticas y de macrófagos, activación funcional de una amplia gama de células	Ninguno	Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos
IFN-γ	Regula por aumento la expresión de MHC de clase I y II en los macrófagos. Activa los macrófagos, células NK y T. Cambio de clase de Ig a IgG2a de los linfocitos B activadas. Inhibe la replicación viral, bacteriana y parasitaria.		Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos	Regulado por aumento
Célula IL-1β	Inducción de otras citocinas Coestimula la activación de los linfocitos T con IL-2. Activa las células NK. Maduración y la proliferación de linfocitos B. Proliferación de fibroblastos Aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. Mediador de la respuesta de fase aguda. Pirogénica. Induce inflamación. Estimula los hepatocitos para producir proteínas de fase aguda.	Pro-: participar en la respuesta de fase aguda y en sinergia para mediar en la inflamación, fiebre, shock y muerte.	Sin efectos	Sin efectos	Regulado por aumento	Regulado por aumento

IL -2	Activación, maduración y proliferación de linfocitos T, B, células NK, monocitos y macrófagos. Estimula la actividad citolítica de los linfocitos T activados, linfocitos grandes granulares y monocitos. Estimula la motilidad de los linfocitos T.		Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos	Efectos
IL -4	Proliferación y diferenciación de linfocitos B. Activación de la IgG1 y la síntesis de IgE. Activación de los monocitos. Regulación por aumento de MHC de clase II en macrófagos. Expansión de la subpoblación Th_2. Desarrollo y proliferación de mastocitos	Anti-: reduce el TNF inducido por endotoxinas y la producción de IL-I.	Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos
IL -5	Activación de eosinófilos, la diferenciación, la proliferación y la quimiotaxis. Activación de basófilos. Proliferación y diferenciación de linfocitos B. síntesis de IgA de linfocitos B.		Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos	Sin efectos
IL -6	Proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Producción de anticuerpos de las células plasmáticas. Diferenciación de los linfocitos T en linfocitos T citotóxicos. Estimula la producción de las proteínas de respuesta de fase aguda del hígado. Participa y regula las respuestas inflamatorias.	Pro participar en la respuesta de fase aguda y en sinergia para mediar en la inflamación, shock y muerte. Anti-: inhibe la producción de TNF.	Sin efectos	Sin efectos	Regulado por aumento	Regulado por aumento
IL-8	Quimiotáctico para neutrófilos y macrófagos	Pro es una de las primeras citocinas que se liberarán en la inflamación	Sin efectos	Sin efectos	Regulado por aumento	Regulado por aumento

IL -10	Inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por monocitos, macrófagos y mastocitos. Inhibe la IL-2 de producción de linfocitos T. Inhibe la activación específica de antígeno de linfocitos T y la producción de citocinas. Factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B. Inhibe el MHC de clase II de monocitos y macrófagos y la expresión de la molécula coestimuladora y la producción de NO	Anti-: suprime las funciones de los linfocitos y regula la producción de citocinas proinflamatorias	Sin efectos	Regulado por aumento	Sin efectos	Regulado por aumento
TNF-α	Participa en la respuesta del huésped a las bacterias Gramnegativas y a otros agentes infecciosos. Muerte de las células tumorales. CAM y expresión de citocinas de macrófagos. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. induce inflamación.	Pro participar en la respuesta de fase aguda y en sinergia para mediar en la inflamación, shock y muerte.	Sin efectos	Línea más amplia regulada por aumento	Regulado por aumento	Regulado por aumento

Abreviaturas: CD: células dendríticas; NK: Asesinas naturales

Sumario de aspectos de la divulgación

1. Un procedimiento para diagnosticar inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico en un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano, que comprende:

(a) realizar una medición *in vitro* del nivel de un marcador en la forma de receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), en una o más muestras que comprenden un fluido biológico que proviene de dicho sujeto, y
(b) usar el uno o más valor de medida obtenido como un factor en el diagnóstico de enfermedad relacionada con inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico.

2. Un procedimiento para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o una enfermedad relacionada con inflamación de grado bajo y/o cáncer y/o el riesgo de mortalidad en diez años en un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano que comprende:

(a) realizar una medición *in vitro* del nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), (ii) y/o productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras que comprenden un fluido biológico que proviene de dicho sujeto, y
(b) usar los valores de medida obtenidos como un factor para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo y/o cáncer y/o el riesgo de mortalidad en diez años.

3. Un procedimiento para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o una enfermedad relacionada con una inflamación de grado bajo de acuerdo con el aspecto 2, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, eczema, obesidad, enfermedad autoinmunitaria, cáncer y diabetes de tipo 2.

4. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en donde dicho fluido biológico es sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo u orina.

5. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1, en donde dicho sujeto es humano infectado por el virus de la inmunodeficiencia y que recibe tratamiento antirretroviral altamente activo.

6. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en donde dicho sujeto es aparentemente sano.

7. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en donde más de una dicha muestra que comprende un fluido biológico proviene de dicho sujeto en más de un punto en el tiempo.

8. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 7, que comprende adicionalmente comparar el riesgo predicho a uno o más puntos temporales para evaluar la eficacia de un curso profiláctico de acción y/o de un tratamiento.

9. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 7, en donde dicho curso profiláctico de acción comprende ejercicio físico.

10. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en donde dicha medición *in vitro* es un ensayo ELISA.

11. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1 o 2 que comprende adicionalmente en la etapa b) dicho uno o más valores de medida se comparan con un valor de referencia para la predicción de los resultados clínicos.

12. Un procedimiento de acuerdo con el aspecto 1, en donde en la etapa b) uno o más de edad, género, etnia, estado de fumador/no fumador y medida de la circunferencia de la cintura se usan adicionalmente para diagnosticar la inflamación de grado bajo.

13. Un procedimiento para detectar el nivel de inflamación de grado bajo y/o el síndrome metabólico en un sujeto mamífero que comprende:

(a) aislar una muestra de un sujeto;
(b) medir el nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en dicha muestra de (a);
(c) comparar la medida obtenida en la etapa (b) con un valor de referencia

en donde un aumento en el nivel de dicho marcador en dicha muestra indica un aumento de la inflamación de grado bajo y/o la presencia de síndrome metabólico.

14. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 12, en donde dicho valor de referencia es un patrón de niveles de un marcador en la forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una población.

15. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 13, en donde dicho valor de referencia se obtiene midiendo el nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR de una muestra de un sujeto sin inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico.

16. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 13, en donde el nivel de dicho marcador está aumentado al menos aproximadamente el 10 % en comparación con dicha muestra de referencia.

17. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 13, en donde dicho procedimiento comprende adicionalmente llevar a cabo un ensayo de tolerancia a la glucosa, un ensayo de TNF-alfa, IL-6, el recuento de leucocitos, glucosa en plasma en ayunas o glucosa en sangre en ayunas, la presión arterial, colesterol, la proteína reactiva con C y/o los niveles de triglicéridos.

18. Un procedimiento para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo y/o cáncer y/o el riesgo de mortalidad en diez años en un sujeto, que comprende:

(a) aislar una muestra de un sujeto;
(b) medir el nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), (ii) y/o productos de escisión de D2D3 de suPAR;
(c) comparar la medida obtenida en la etapa (b) con un valor de referencia, en donde un aumento en los niveles de dicho marcador indica un elevado riesgo de inflamación de grado bajo, síndrome metabólico, cáncer y/o el riesgo de mortalidad en diez años.

19. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 18, en donde el nivel de dicho marcador está aumentado al menos aproximadamente el 10 % y/o 1 ng/ml en dicha muestra en comparación con dicha muestra de referencia.

20. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 18, en donde la enfermedad es diabetes.

21. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 20, en donde la etapa (b) comprende adicionalmente medir los niveles de glucosa.

22. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 18, en donde la enfermedad es enfermedad cardiovascular.

23. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 22, en donde la etapa (b) comprende adicionalmente medir la presión arterial, el colesterol HDL, el colesterol LDL, el colesterol total y/o los triglicéridos.

24. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 18, en donde la enfermedad es cáncer.

25. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 24, en donde el cáncer es cáncer de mama, leucemia, cáncer de próstata o cáncer de pulmón.

26. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 25, en donde la etapa (b) comprende adicionalmente la determinación de la edad y el hábito fumador.

27. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 18, en donde se mide el elevado riesgo de mortalidad en diez años.

28. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 27, en donde la etapa (b) comprende adicionalmente medir las concentraciones de péptido natriurético de tipo cerebral.

29. Un procedimiento para controlar el tratamiento de inflamación de grado bajo y/o el síndrome metabólico en un sujeto mamífero que comprende:

(a) aislar una muestra de un sujeto que se somete a tratamiento para inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico;
(b) medir el nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPar) (ii) y/o productos de escisión de D2D3 de suPAR,

en donde una disminución en el nivel de dicho marcador usado en la etapa (b) es un indicativo de la progresión del tratamiento.

30. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 29, en donde el nivel de dicho marcador está disminuido al menos aproximadamente el 10 % y/o 1 ng/ml.

31. Un procedimiento para tratar la inflamación de grado bajo y/o el síndrome metabólico en un sujeto mamífero que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad de sustancia que disminuya el nivel de suPAR eficaz para tratar dicha inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico.

32. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 31, en donde dicha sustancia es un anticuerpo anti-suPAR.

33. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 32, en donde dicho anticuerpo anti-suPAR es un anticuerpo monoclonal o policlonal.

34. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 31, en donde dicha sustancia es un análogo o derivado de suPAR capaz de unirse a uPA.

35. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 31, en donde dicha sustancia es un producto de escisión de D2D3.

36. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico que comprende una sustancia que disminuye el nivel de suPAR en un sujeto mamífero.

37. Uso de una sustancia para preparar una composición terapéutica para el tratamiento o la prevención de inflamación de grado bajo y/o síndrome metabólico, en donde dicha sustancia disminuye el nivel de suPAR en un sujeto mamífero.

38. Un medio legible por ordenador que tiene lógica informática almacenada en el mismo configurada para producir, cuando se ejecuta en un sistema de procesamiento de datos, que el sistema de procesamiento de datos calcule el riesgo y/o los cambios en el riesgo de una enfermedad relacionada con la inflamación de grado

bajo, una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, cáncer y/o mortalidad en diez años, que comprende:

(a) lógica para recibir una o más mediciones derivadas de un sujeto mamífero en el que al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto;
(b) lógica para análisis de una o más de dichas mediciones de la etapa (a); y
(c) lógica para el cálculo de riesgo y/o el cambio en el riesgo de dicha enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo y/o dicha enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, dicho cáncer y/o dicha mortalidad en diez años basado en el análisis de la etapa (b) de dichas mediciones.

39. El medio legible por ordenador del aspecto 38, en donde la lógica en (a) recibe dos o más mediciones derivadas de un sujeto humano en donde al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) productos de escisión de D2d3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto.

40. El medio legible por ordenador del aspecto 38, en donde el sistema de procesamiento de datos se usa para calcular el riesgo de desarrollar diabetes.

41. El medio legible por ordenador del aspecto 40, en donde la lógica recibe adicionalmente mediciones de niveles de glucosa en sangre de dicho sujeto mamífero.

42. El medio legible por ordenador del aspecto 38, en donde el sistema de procesamiento de datos se usa para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

43. El medio legible por ordenador del aspecto 42, en donde la lógica recibe adicionalmente mediciones de presión arterial, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol total y/o triglicéridos.

44. El medio legible por ordenador del aspecto 38, en donde el sistema de procesamiento de datos se usa para calcular el riesgo de desarrollar cáncer.

45. El medio legible por ordenador del aspecto 44, en donde el cáncer es cáncer de mama, leucemia, cáncer de próstata o cáncer de pulmón.

46. El medio legible por ordenador del aspecto 38, en donde el sistema de procesamiento de datos se usa para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en 1 año, 3 años, 5 años, 10 años, 1 año-10 años, 1-5 años, 5-10 años.

47. El medio legible por ordenador del aspecto 46, en donde la lógica recibe adicionalmente mediciones de concentraciones de péptido natriurético de tipo cerebral.

48. Un producto de programa informático, que comprende el medio legible por ordenador del aspecto 38.

49. Un ordenador para determinar el riesgo y/o el cambio en el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo que comprende

(a) un medio de almacenamiento de datos legibles a ordenador configurado para almacenar un material de almacenamiento de datos codificados con datos legibles por ordenador, en donde dichos datos comprenden mediciones que derivan de una o más muestras de un sujeto mamífero, en donde al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR;
(b) un medio de almacenamiento que tiene almacenado en el mismo instrucciones para procesar dichos datos legibles por ordenador;
(c) una unidad central de procesamiento que responde a dichas instrucciones acopladas a dicho medio de almacenamiento y a dicho medio de almacenamiento de datos legibles por ordenador para el procesamiento de dichos datos legibles por ordenador en la medición del riesgo y los valores de progresión del tratamiento; y
(d) un dispositivo de salida acoplado a dicha unidad central de procesamiento de (c) para la salida de dichos valores de riesgo y/o cambio en los valores de riesgo.

50. El ordenador del aspecto 49, en donde el medio de almacenamiento de datos legibles a ordenador (a) comprende datos que comprenden dos o más mediciones derivadas de un sujeto humano en donde al menos una medición es una medición in vitro del nivel del marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto.

51. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar diabetes.

52. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar diabetes y los datos en el medio de almacenamiento del ordenador comprenden adicionalmente mediciones de los niveles de glucosa en sangre de dicho sujeto mamífero.

53. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

54. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y los datos en el medio de almacenamiento del ordenador comprenden adicionalmente mediciones de presión arterial, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol total, proteína reactiva con C y/o triglicéridos.

55. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, leucemia, cáncer de próstata o cáncer de pulmón).

56. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en 1 año, 3 años, 5 años, 10 años, 1 año-10 años, 1 año-5 años, 5 años-10 años.

57. El ordenador del aspecto 49, en donde el ordenador se usa para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en 10 años y los datos en el medio de almacenamiento del ordenador comprenden adicionalmente mediciones de las concentraciones de péptido natriurético de tipo cerebral.

58. Un ordenador cliente para proporcionar acceso a un sistema de cálculo de riesgo para determinar el riesgo y/o el cambio en el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico y/o enfermedad relacionada con inflamación de grado bajo, comprendiendo el ordenador cliente:

(a) un dispositivo de entrada para recibir una o más mediciones derivadas de un sujeto mamífero en donde al menos una medición es una medición *in vitro* del nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto.
(b) una interfaz de comunicación para comunicar las una o más mediciones recibidas a un ordenador servidor configurado para analizar dicha una o más mediciones de la etapa (a), y calcular un valor de riesgo; y
(c) una interfaz de comunicaciones para recibir, desde el ordenador servidor, un valor de riesgo calculado.

59. El ordenador del aspecto 58, en donde el dispositivo de entrada (a) recibe dos o más mediciones derivadas de un sujeto humano en donde al menos una medición es una medición in vitro del nivel de marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras derivadas de dicho sujeto.

60. El ordenador del aspecto 60, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar diabetes.

61. El ordenador del aspecto 59, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar diabetes y en donde el dispositivo de entrada (a) recibe adicionalmente mediciones de niveles de glucosa en sangre de un sujeto mamífero.

62. El ordenador del aspecto 59, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

63. El ordenador del aspecto 59, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y en donde el dispositivo de entrada (a) recibe adicionalmente medidas de presión arterial, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol total y/o triglicéridos.

64. El ordenador del aspecto 59, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia o cáncer de pulmón).

65. El ordenador del aspecto 59, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia o cáncer de pulmón) y en donde dicho dispositivo de entrada (a) recibe adicionalmente datos relacionados con el hábito fumador y con la edad.

66. El ordenador del aspecto 59, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en 1-10 años.

67. El ordenador del aspecto 60, en donde dicho ordenador se usa para calcular el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en 1-10 años y el dispositivo de entrada (a) puede recibir adicionalmente mediciones de concentraciones de péptido natriurético de tipo cerebral.

68. Un método basado en ordenador para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, una enfermedad relacionada con una inflamación de grado bajo (por ejemplo, cáncer) y/o el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero que comprende

(a) recibir bajo el control del ordenador una medición *in vitro* del nivel de un marcador en forma de (i) receptor soluble del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR), y/o (ii) productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras, que comprenden un fluido biológico derivado de dicho sujeto,
(b) analizar bajo el control del ordenador dicha medición *in vitro* realizada en (a)
(c) calcular bajo el control por ordenador un valor del riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el síndrome metabólico, una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo (por ejemplo, cáncer) y/o el riesgo de mortalidad en un sujeto mamífero en 1 año, 3 años, 5 años, 10 años o entre 1-5 años, 1-10 años o 5-10 años usando mediciones analizadas obtenidas en (b).

68. Un método de reducción del riesgo de un individuo sano de desarrollar enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, eczema, obesidad, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, síndrome metabólico o diabetes de tipo 2 que comprende las etapas de:

(a) determinar el nivel de suPAR en el individuo; y
(b) decidir el tratamiento apropiado para el paciente, al menos parcialmente a la luz de dicho nivel de suPAR.

69. Un método de reducción del riesgo de un individuo sano de desarrollar enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, eczema, obesidad, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, síndrome metabólico o diabetes de tipo 2 que comprende la etapa de reducir el nivel en plasma de suPAR del individuo.

70. Un método de acuerdo con el aspecto 70, en donde el nivel en plasma se reduce a por debajo de 6 ng/ml.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico de inflamación de grado bajo en un sujeto mamífero aparentemente sano, tal como un sujeto humano, que comprende:

(a) realizar una medición *in vitro* del nivel de un marcador en la forma de receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o los productos de escisión de D2D3 de suPAR, en una o más muestras que comprenden un fluido biológico derivado de dicho sujeto, y
(b) usar el uno o más valores de medición obtenidos como un factor en el diagnóstico de inflamación de grado bajo.

2. Un procedimiento para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con la inflamación de grado bajo en un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano, que comprende:

(a) realizar una medición *in vitro* del nivel de un marcador en la forma de (i) receptor soluble de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (suPAR) y/o (ii) los productos de escisión de D2D3 de suPAR en una o más muestras que comprenden un fluido biológico derivado de dicho sujeto, y
(b) usar el valor de medida obtenido como un factor para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con información de grado bajo.

3. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho fluido biológico es suero sanguíneo, plasma sanguíneo u orina.

4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde más de una de dichas muestras que comprenden un fluido biológico derivan de dicho sujeto en más de un punto temporal.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente comparar el nivel del marcador en uno o más puntos temporales para evaluar la eficacia de un curso profiláctico de acción y/o de un tratamiento.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho curso profiláctico de acción comprende ejercicio físico.

7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en donde un descenso en el nivel de dicho marcador de al menos el 10 % y/o 1 ng/ml denota eficacia.

8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha medición *in vitro* es un ensayo ELISA.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho procedimiento comprende adicionalmente llevar a cabo un ensayo de tolerancia a la glucosa o un ensayo de TNF-alfa, IL-6, recuento de leucocitos, glucosa en plasma en ayunas o glucosa en sangre en ayunas, presión arterial, colesterol, proteína reactiva con C y/o niveles de triglicéridos.

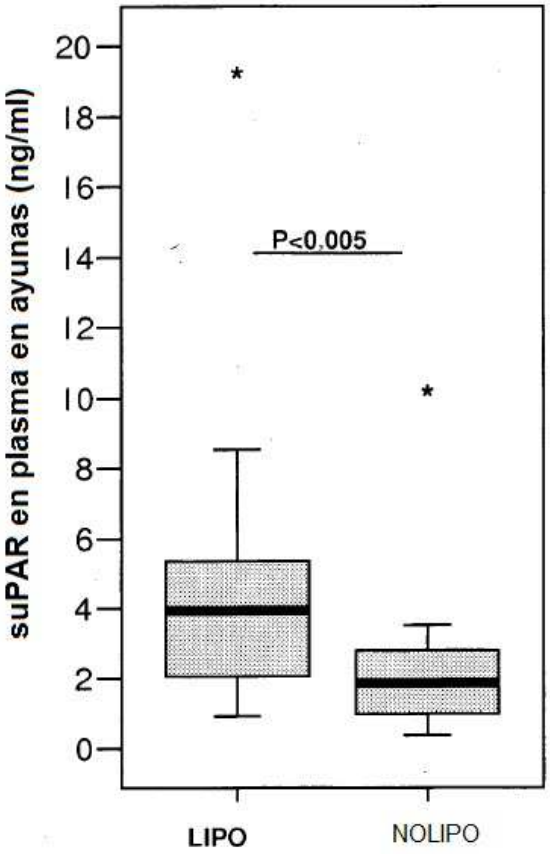

suPAR en plasma en ayunas (ng/ml)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
P<0,005
LIPO
NOLIPO

Figura 2A

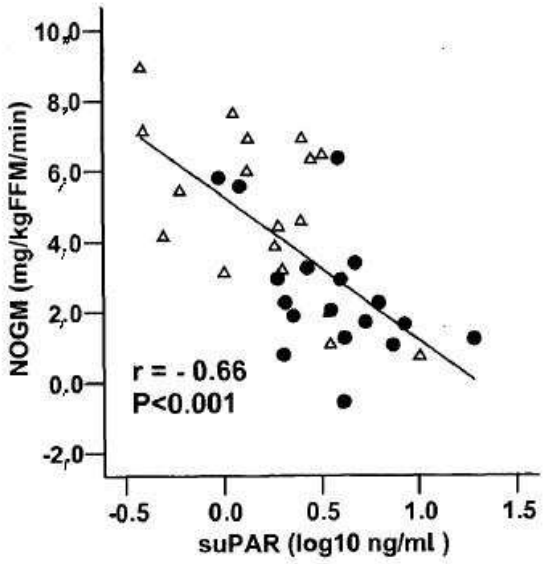


Figura 2B

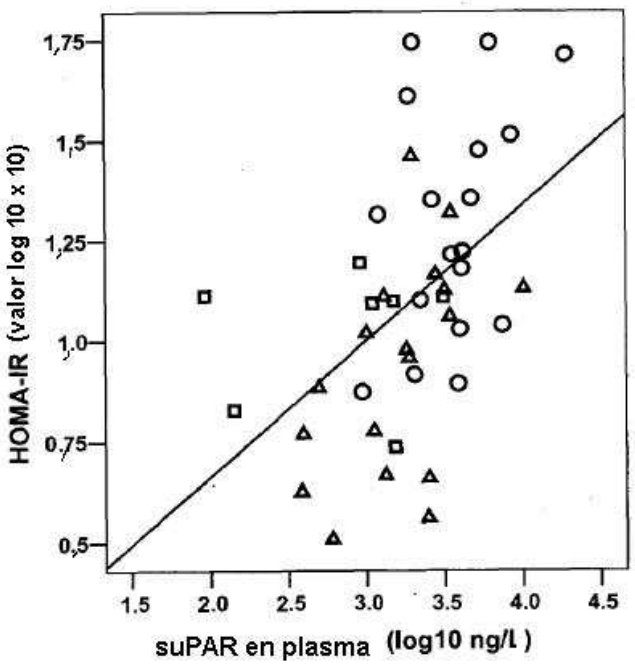


Figura 2 C.

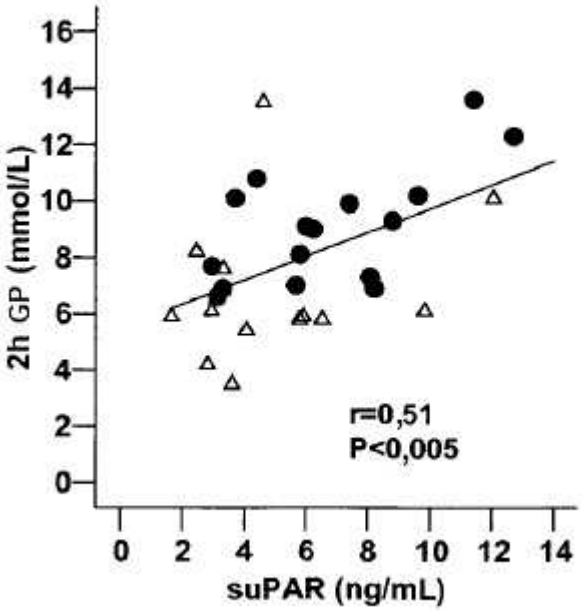


Figura 2 D

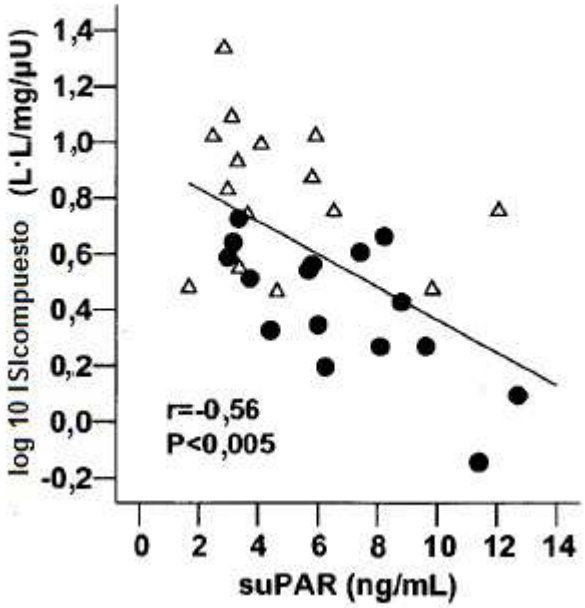
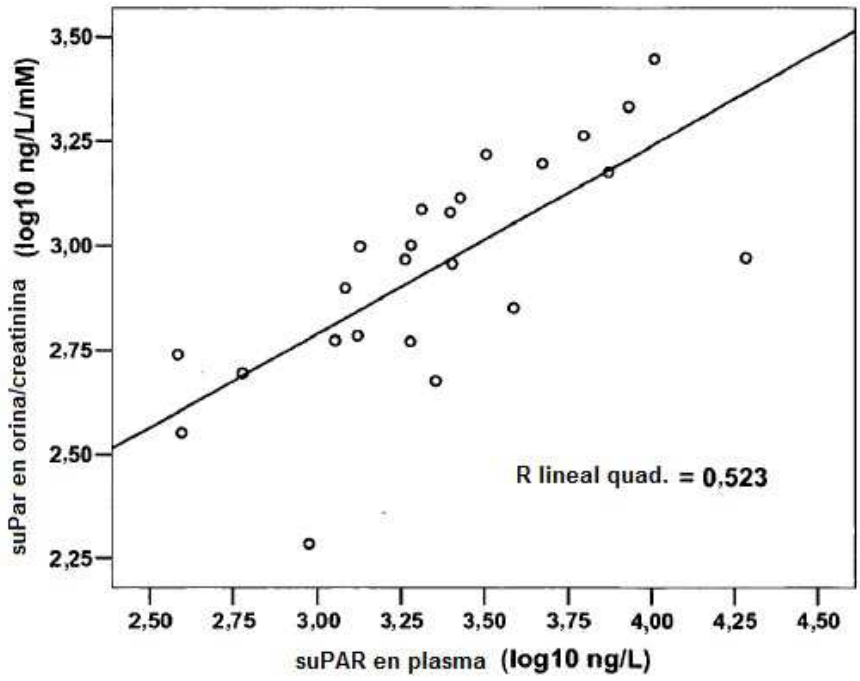


Figura 3


suPar en orina/creatinina (log10 ng/L/mM)
3,50
3,25
3,00
2,75
2,50
2,25
R lineal quad. = 0,523
2,50
2,75
3,00
3,25
3,50
3,75
4,00
4,25
4,50
suPAR en plasma (log10 ng/L)

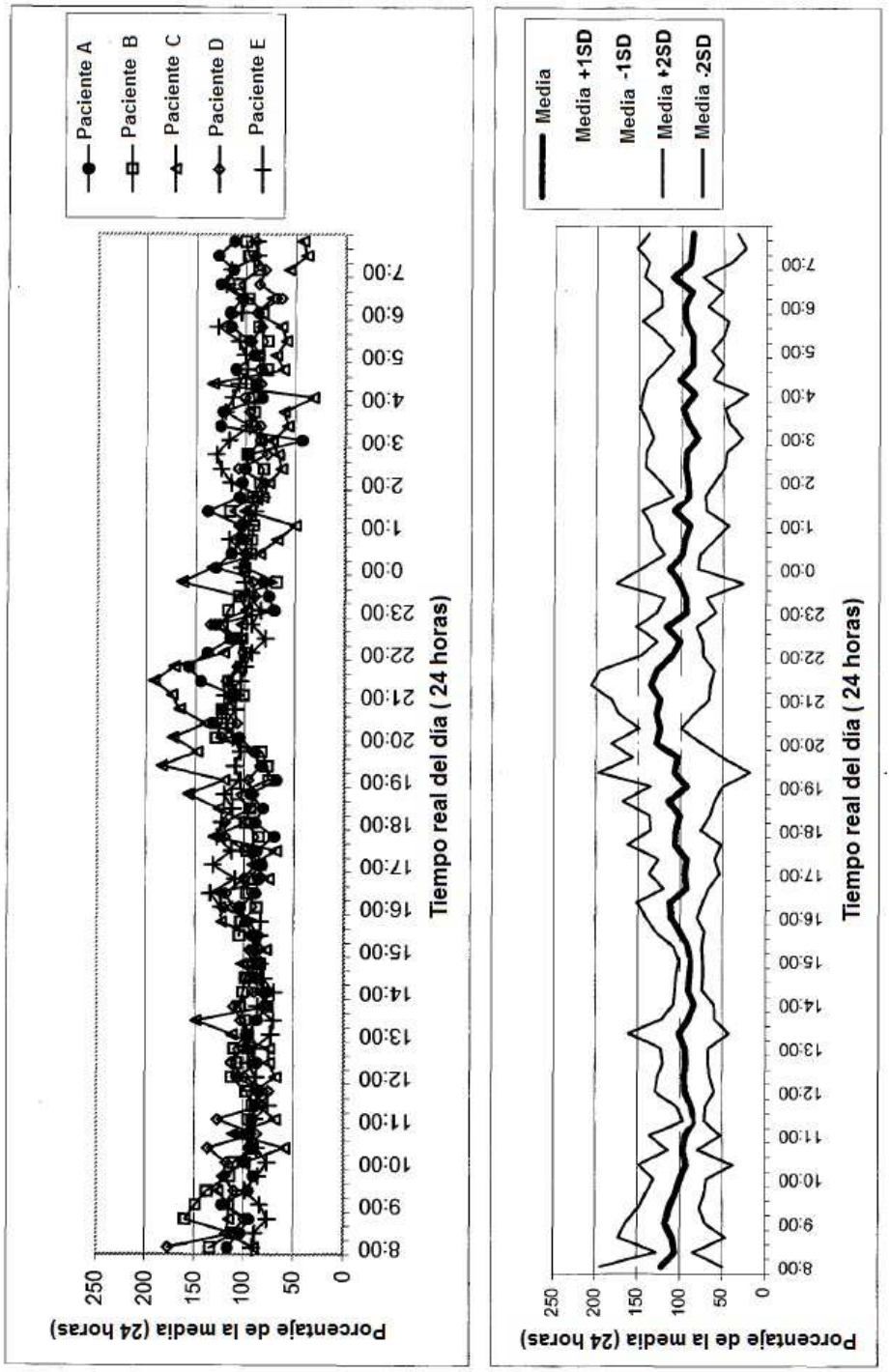


Figura 4 .[gráfico superior y gráfico inferior]

Figura 5A

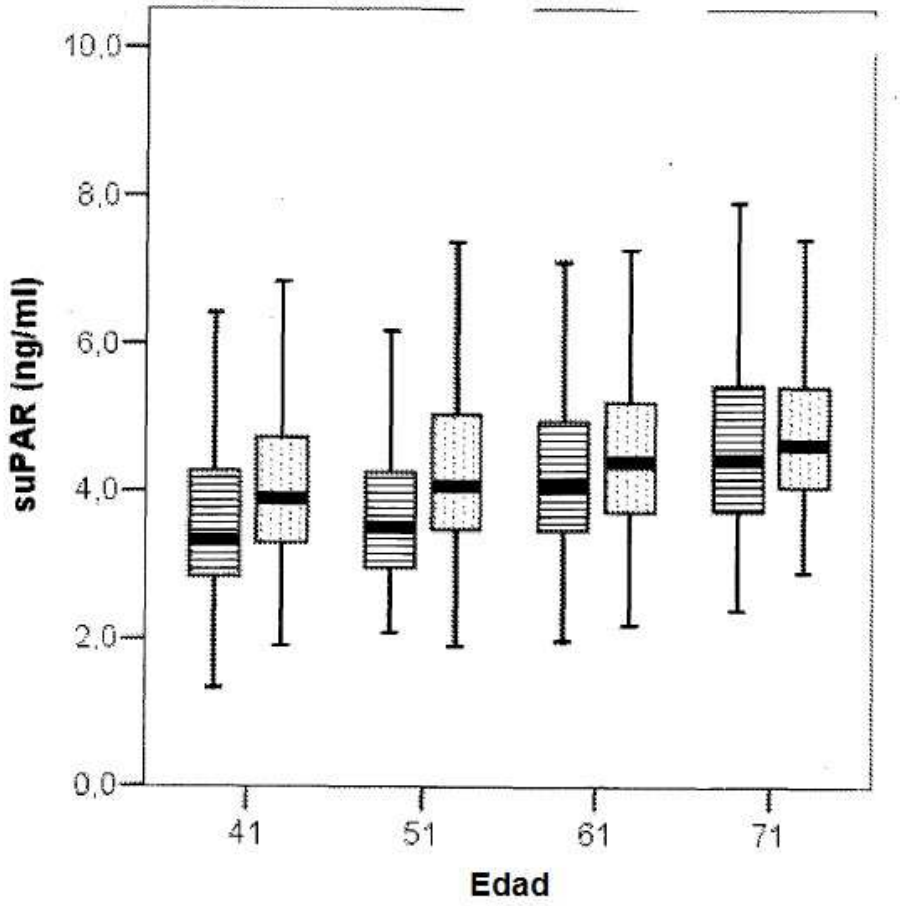


Figura 5B

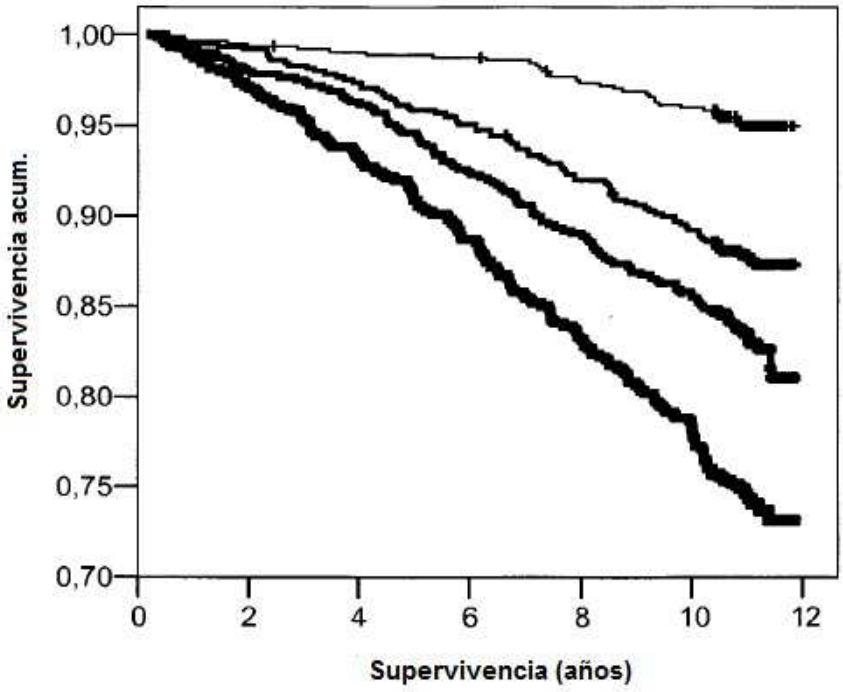

1,00
0,95
0,90
0,85
0,80
0,75
0,70
Supervivencia acum.
0
2
4
6
8
10
12
Supervivencia (años)

Figura 6A

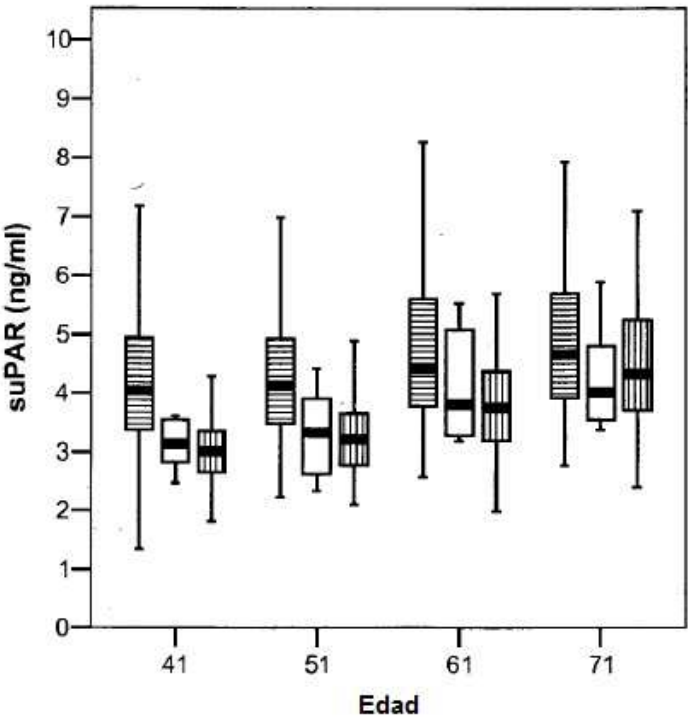


Figura 6B

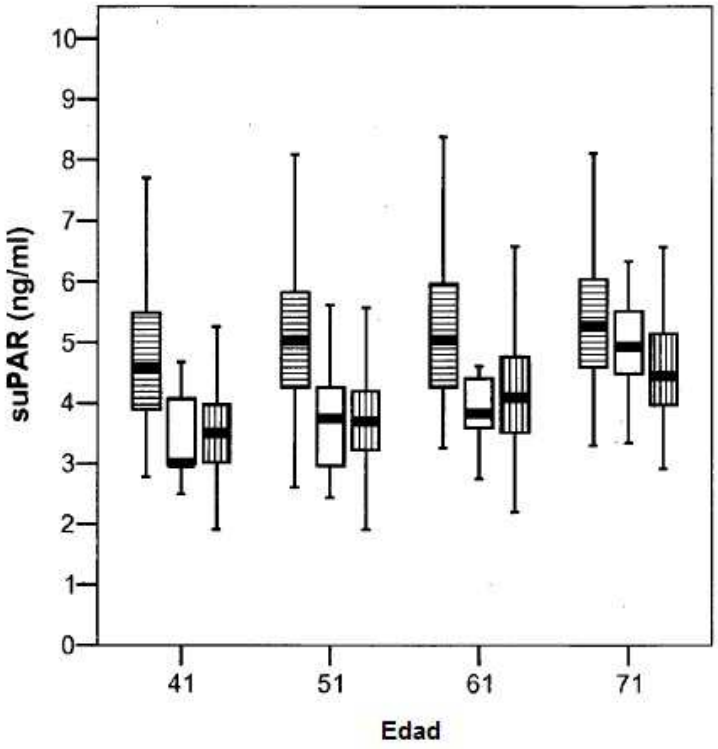


Figura 6C

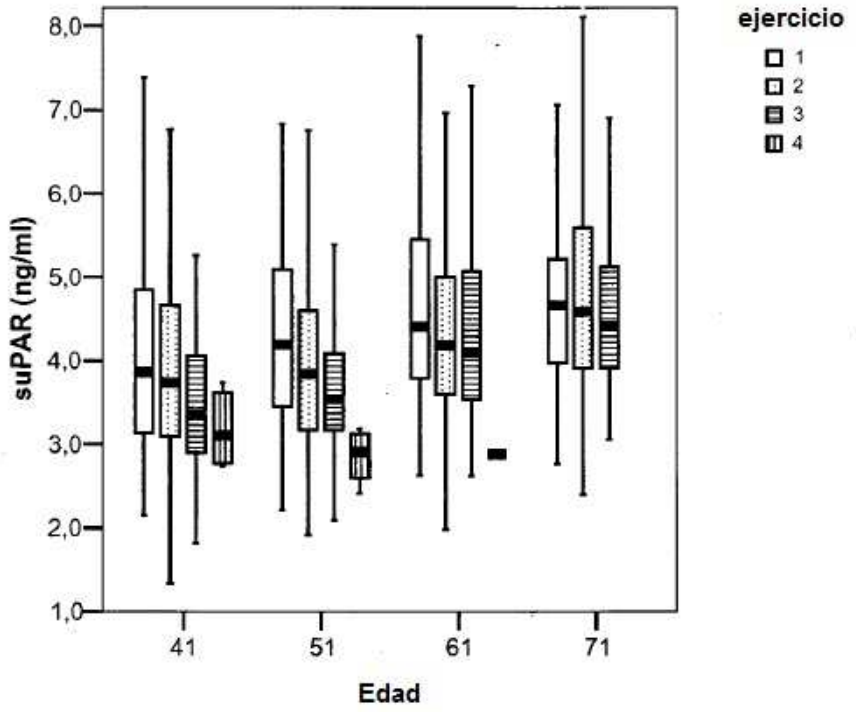

ejercicio
1
2
3
4
suPAR (ng/ml)
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
41
51
61
71
Edad

Figura 7

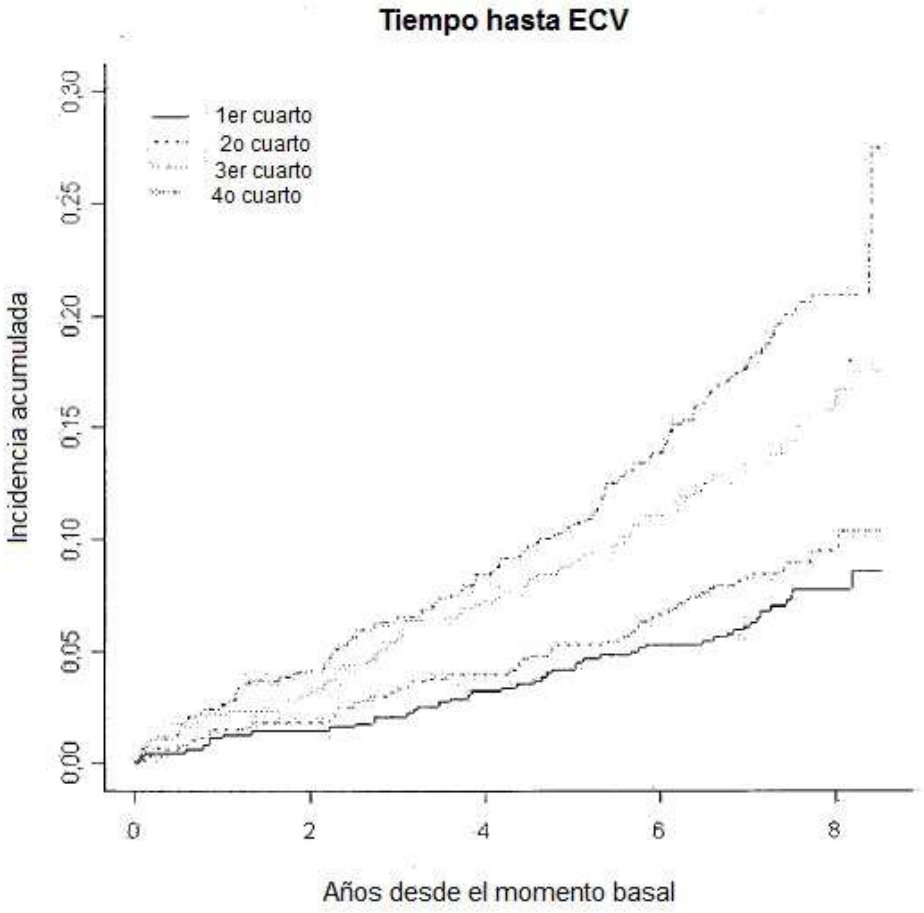

Tiempo hasta ECV
1er cuarto
2o cuarto
3er cuarto
4o cuarto
Incidencia acumulada
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
0,30
0
2
4
6
8
Años desde el momento basal

Figura 8

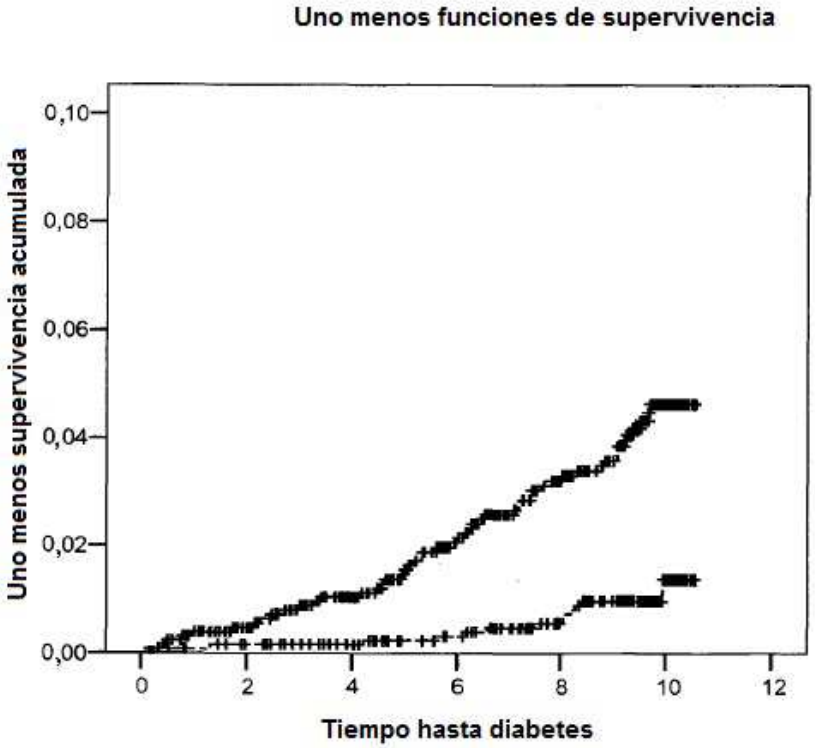

Uno menos funciones de supervivencia
Uno menos supervivencia acumulada
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
0
2
4
6
8
10
12
Tiempo hasta diabetes

Figura 9

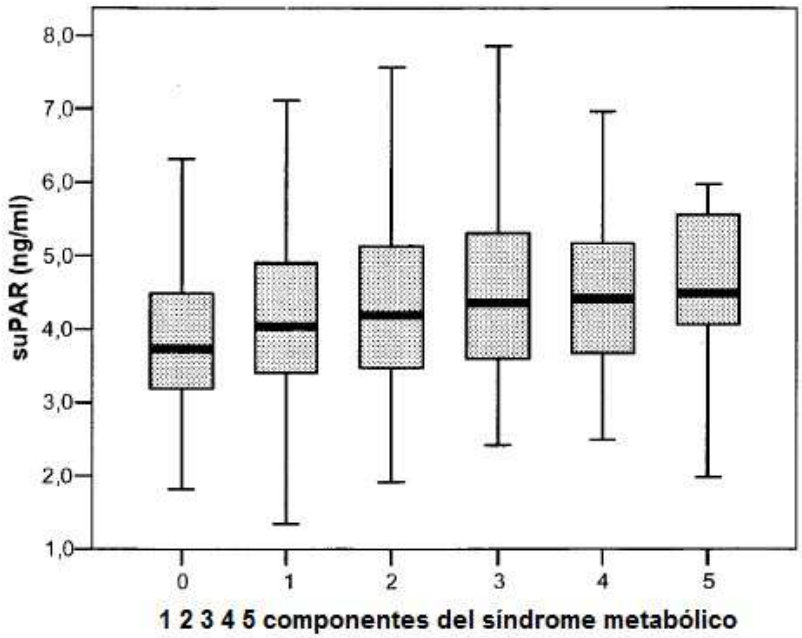

8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
suPAR (ng/ml)
0
1
2
3
4
5
1 2 3 4 5 componentes del síndrome metabólico

Figura 10

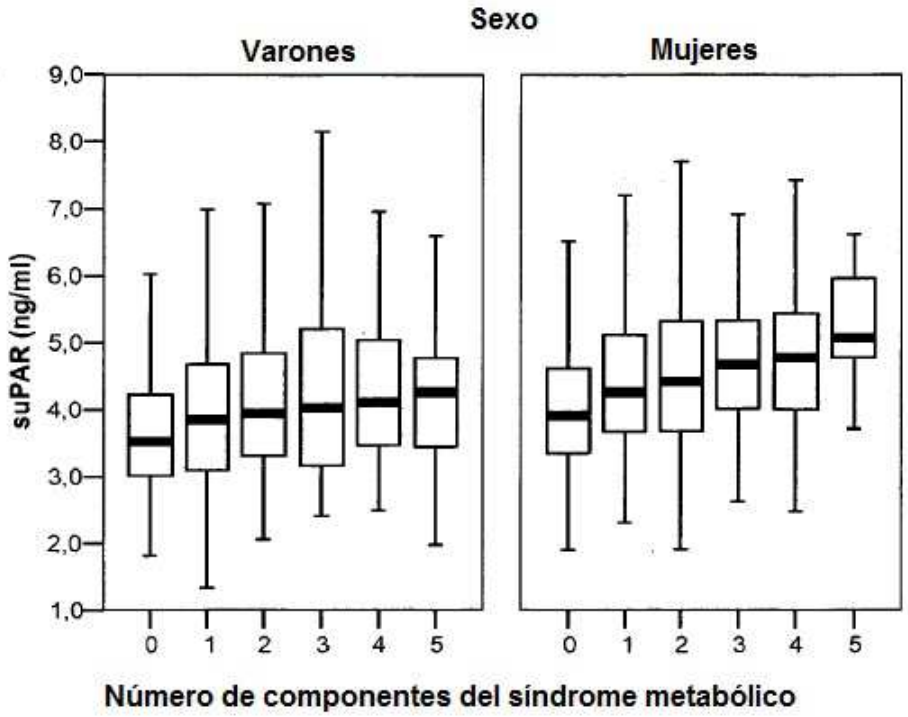

Sexo
Varones
Mujeres
suPAR (ng/ml)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0
1
2
3
4
5
Número de componentes del síndrome metabólico

Figura 11

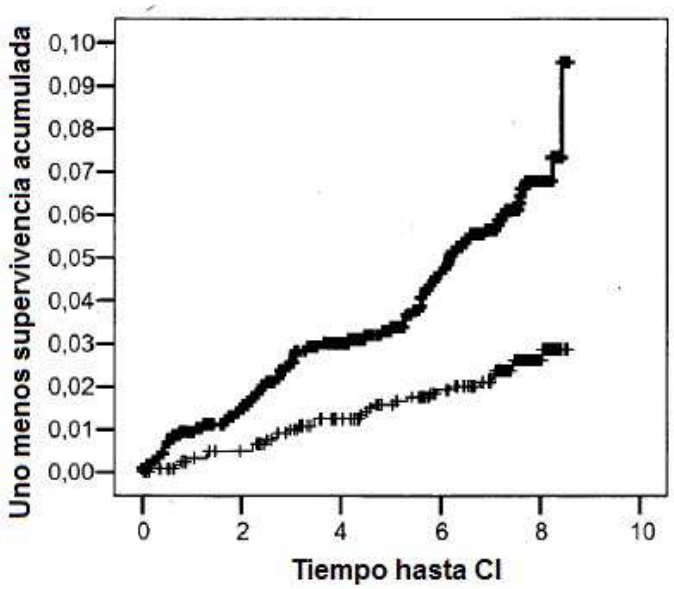

Uno menos supervivencia acumulada
0,10
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
0
2
4
6
8
10
Tiempo hasta CI

Figura 12

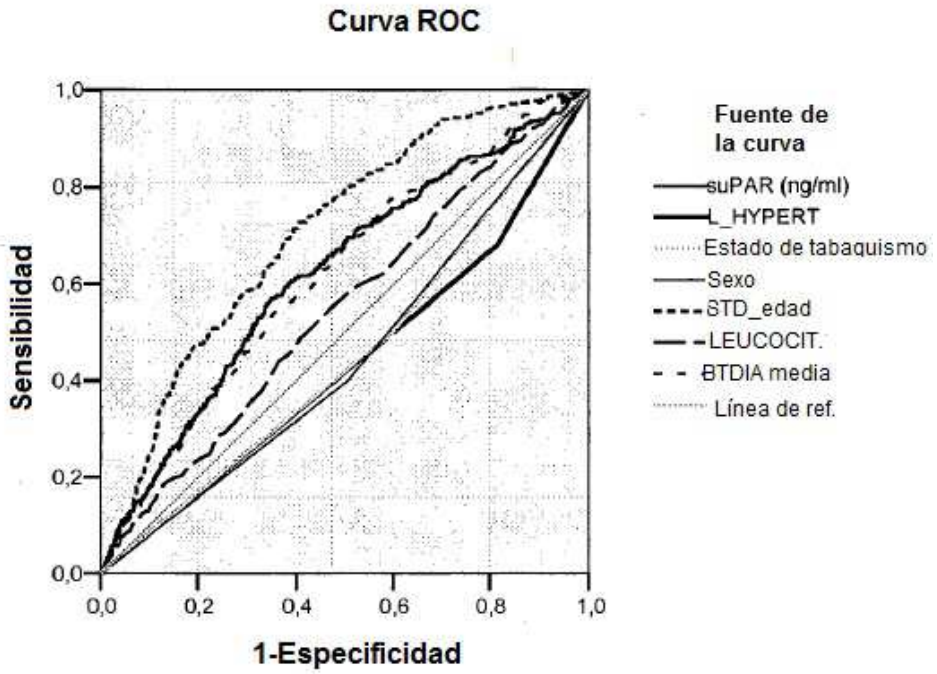

Curva ROC
Sensibilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1-Especificidad
Fuente de la curva
suPAR (ng/ml)
L_HYPERT
Estado de tabaquismo
Sexo
STD_edad
LEUCOCIT.
BTDIA media
Línea de ref.

Figura 13

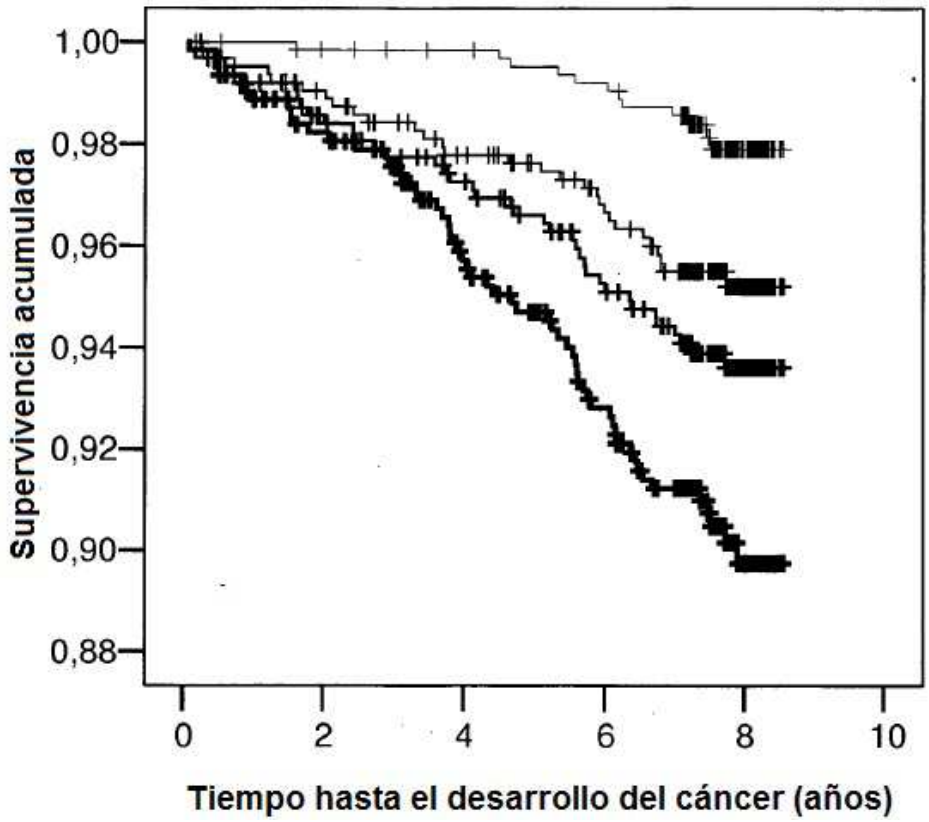

1,00
0,98
0,96
0,94
0,92
0,90
0,88
Supervivencia acumulada
0
2
4
6
8
10
Tiempo hasta el desarrollo del cáncer (años)

Figura 14

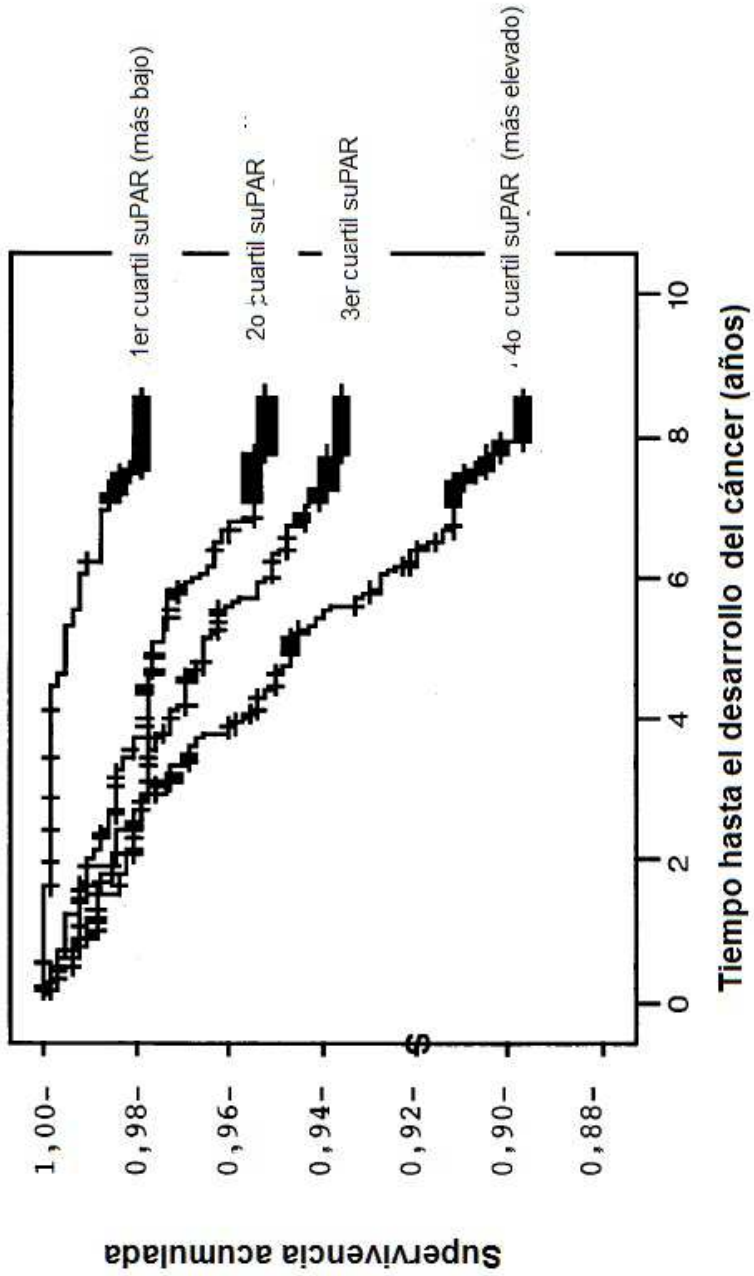

1er cuartil suPAR (más bajo)
2o cuartil suPAR
3er cuartil suPAR
4o cuartil suPAR (más elevado)
1,00
0,98
0,96
0,94
0,92
0,90
0,88
Supervivencia acumulada
0
2
4
6
8
10
Tiempo hasta el desarrollo del cáncer (años)

Figura 15

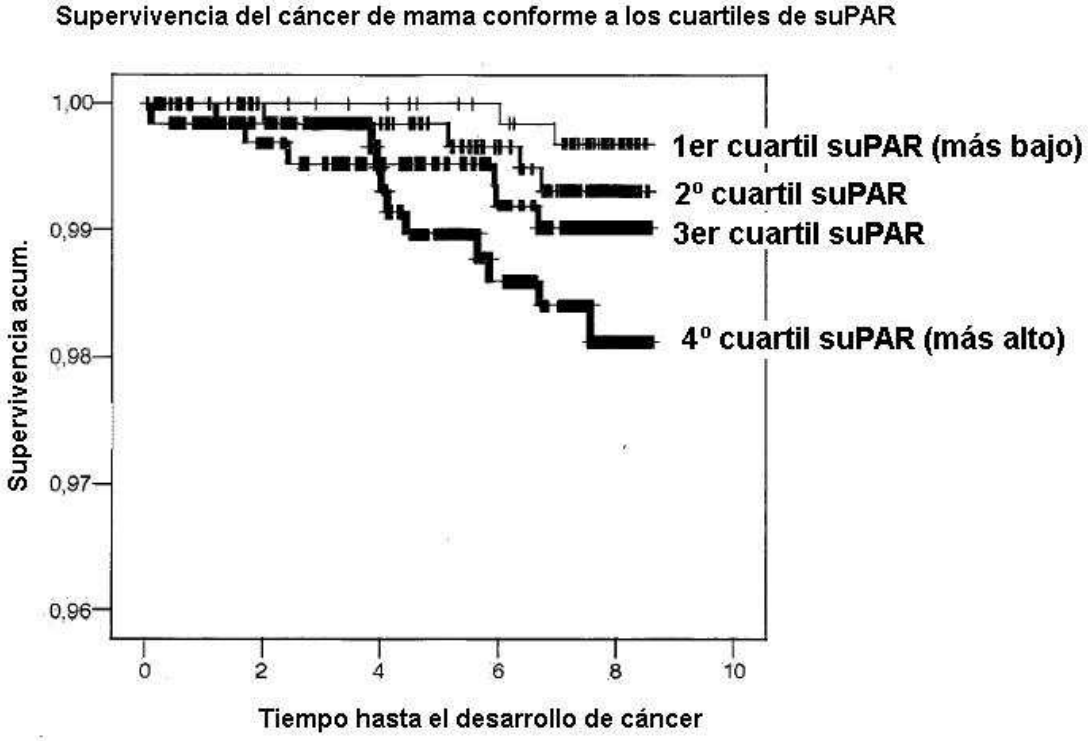

Supervivencia del cáncer de mama conforme a los cuartiles de suPAR
1,00
0,99
0,98
0,97
0,96
Supervivencia acum.
0
2
4
6
8
10
Tiempo hasta el desarrollo de cáncer
1er cuartil suPAR (más bajo)
2º cuartil suPAR
3er cuartil suPAR
4º cuartil suPAR (más alto)

Figura 16

Desarrolo de cáncer de pulmón conforme a los cuartiles de suPAR

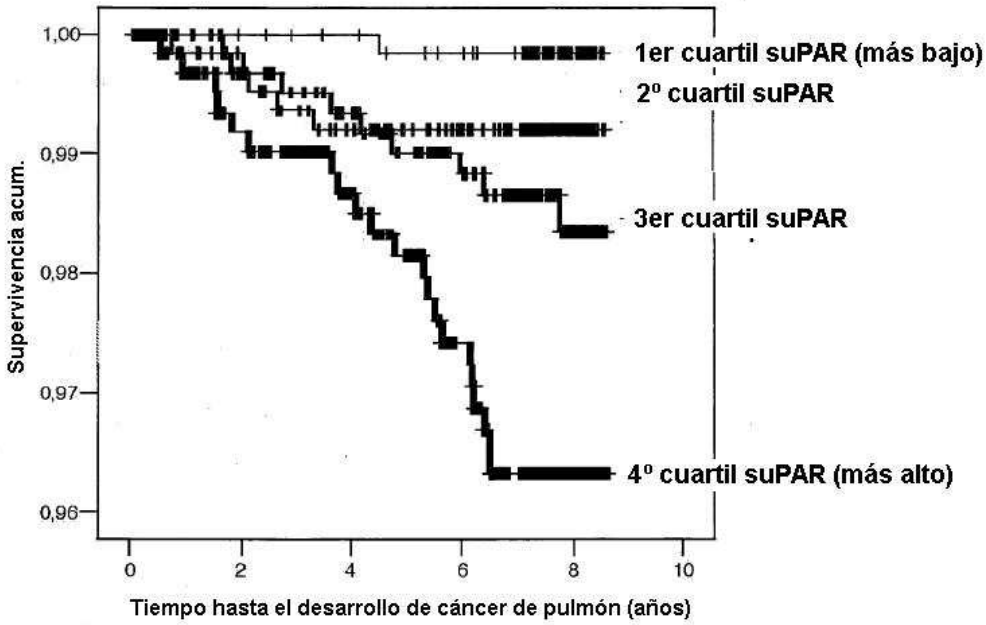
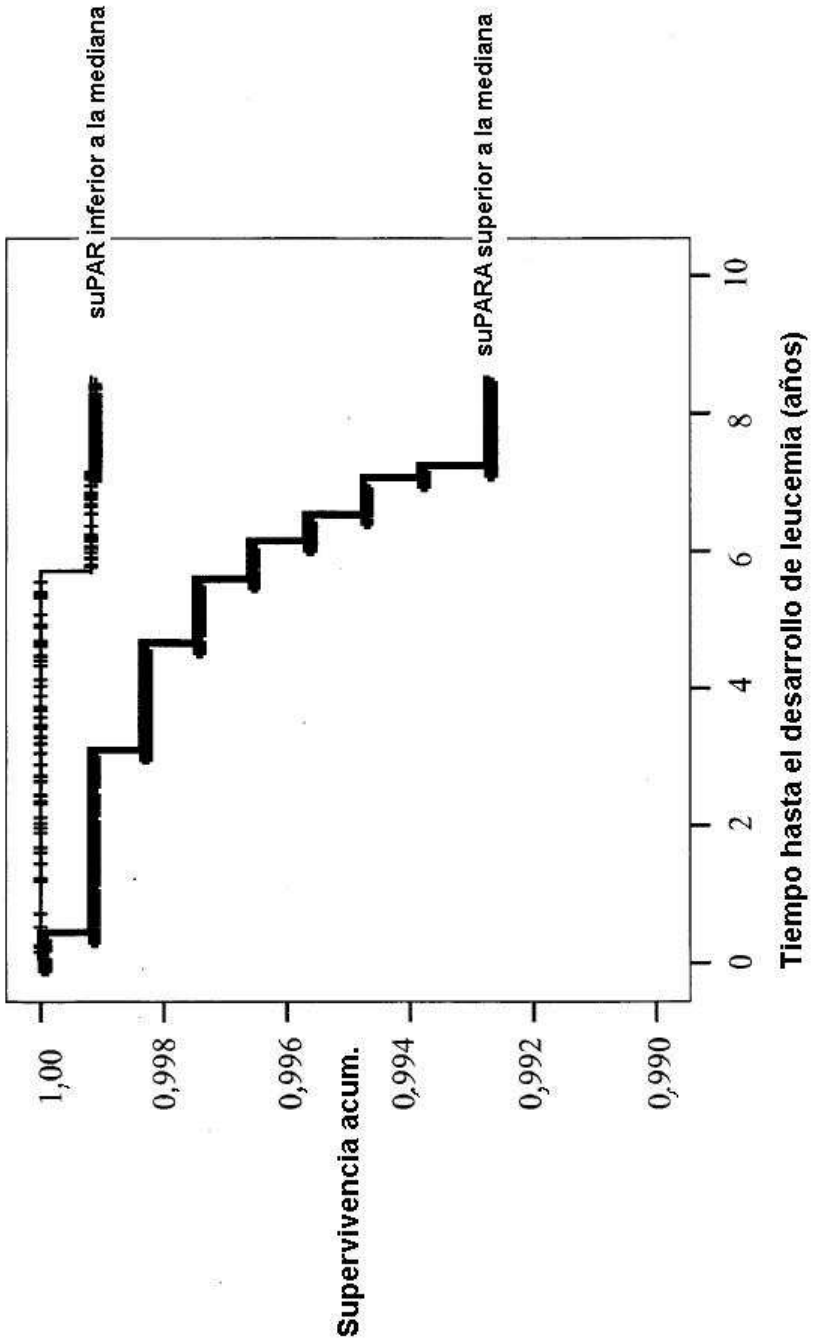


Figura 17


suPAR inferior a la mediana
suPARA superior a la mediana
Supervivencia acum.
1,00
0,998
0,996
0,994
0,992
0,990
0
2
4
6
8
10
Tiempo hasta el desarrollo de leucemia (años)

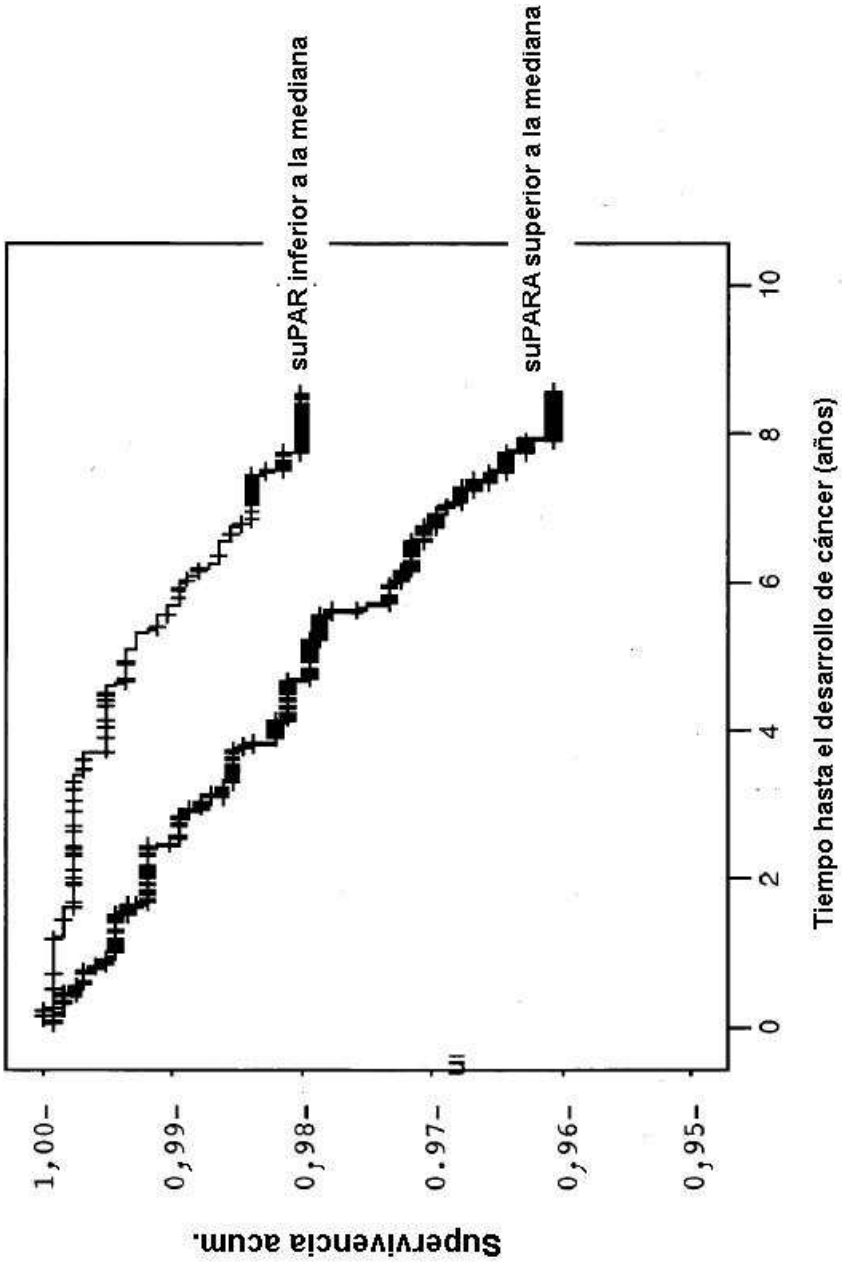
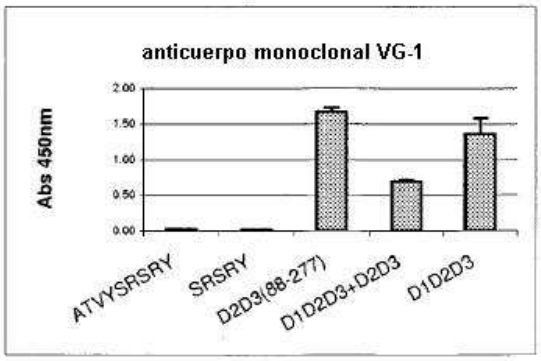
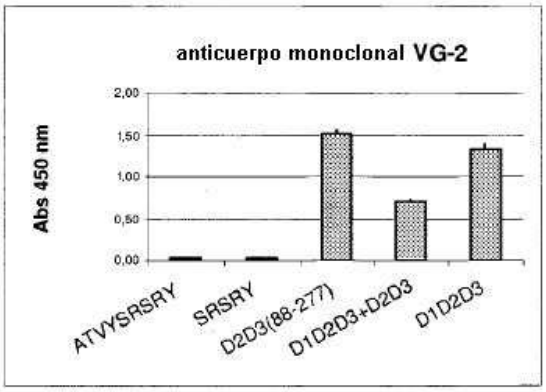
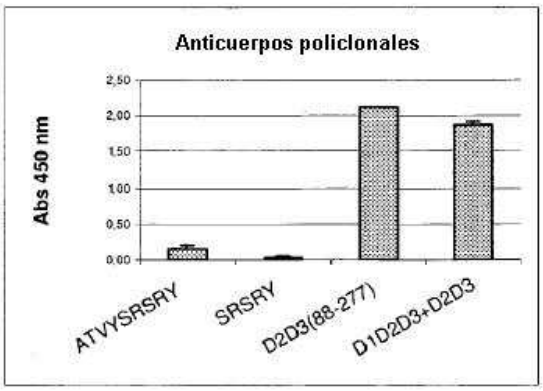

suPAR inferior a la mediana
suPARA superior a la mediana
Supervivencia acum.
1,00
0,99
0,98
0.97
0,96
0,95
0
2
4
6
8
10
Tiempo hasta el desarrollo de cáncer (años)

Figura 18

Figura 19


anticuerpo monoclonal VG-1
Abs 450nm
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
ATVYSRSRY
SRSRY
D2D3(88-277)
D1D2D3+D2D3
D1D2D3


anticuerpo monoclonal VG-2
Abs 450 nm
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
ATVYSRSRY
SRSRY
D2D3(88-277)
D1D2D3+D2D3
D1D2D3


Anticuerpos policlonales
Abs 450 nm
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
ATVYSRSRY
SRSRY
D2D3(88-277)
D1D2D3+D2D3

Anticuerpos policlonales de conejos inunizados con SRS
Abs 450 nm
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
ATVYSRSRY
SRSRY
D2D3(88-277)
D1D2D3+D2D3

Figura 20

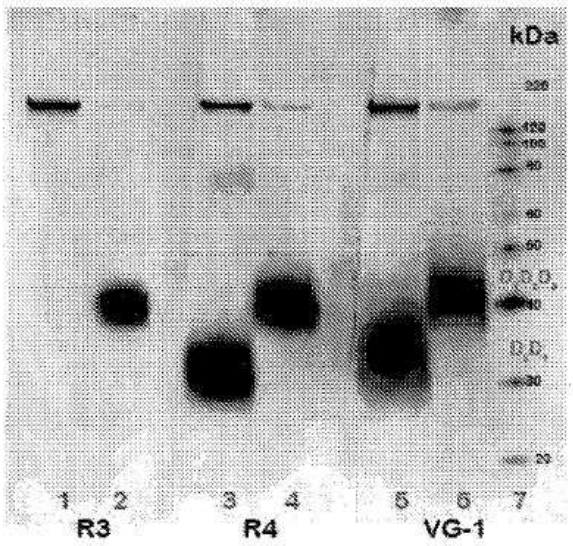


Figura 21

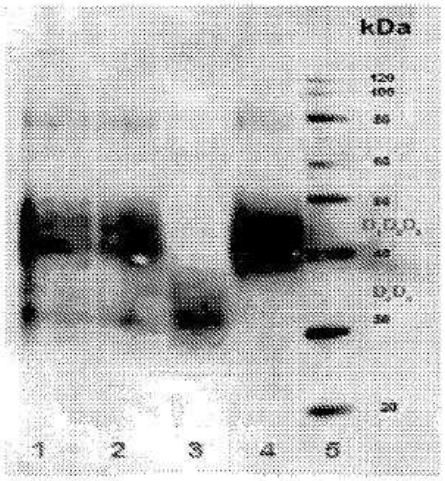


Figura 22

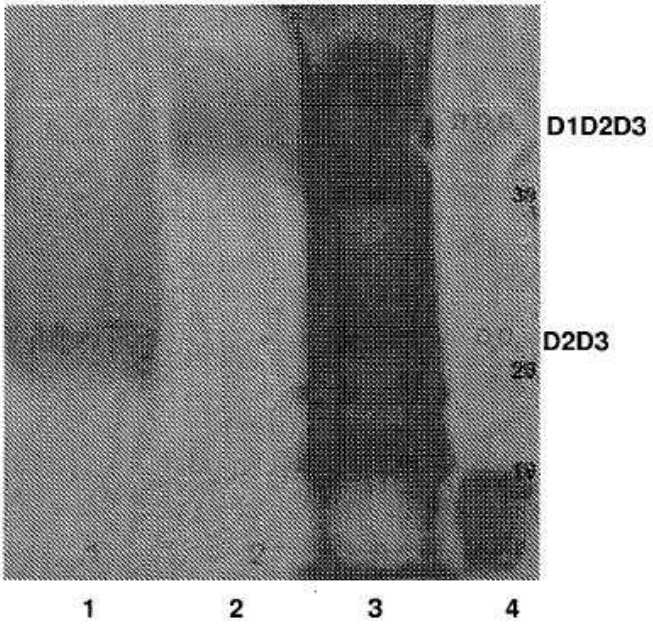


Figura 23
A

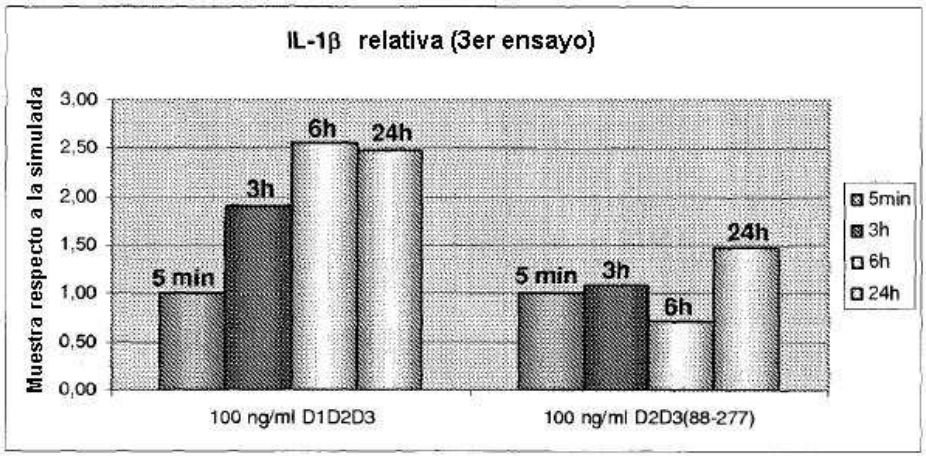


Figura 23
B

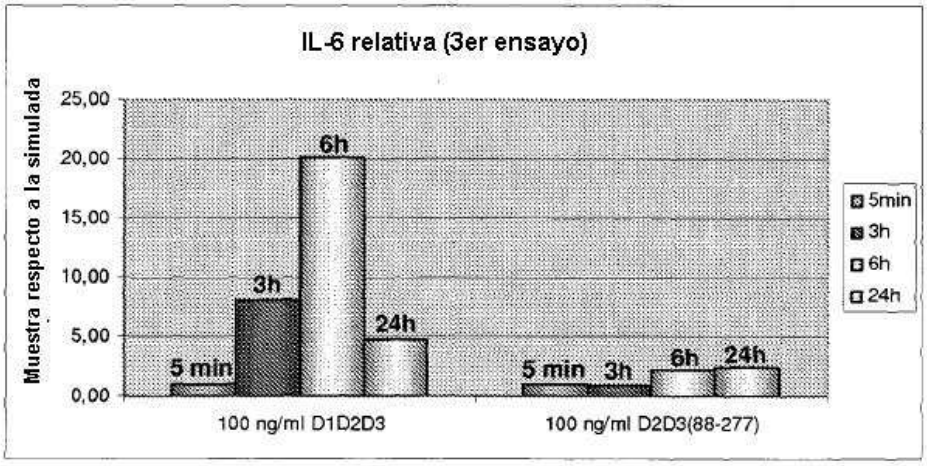


Figura 23
C

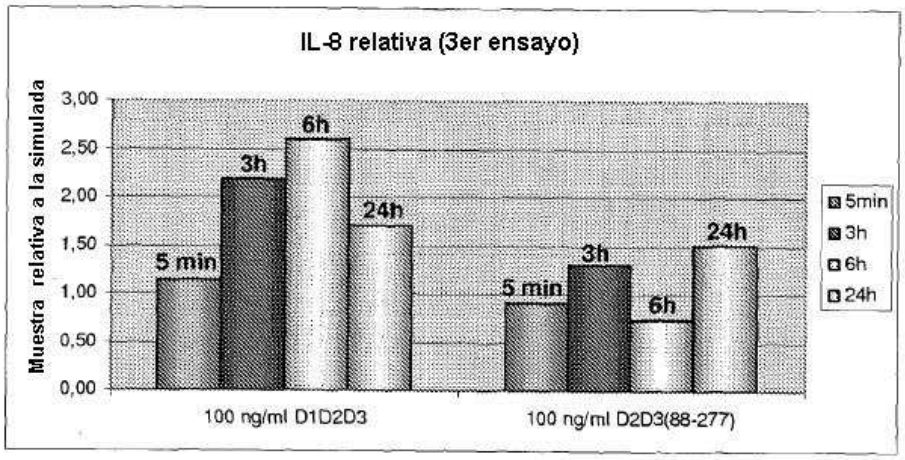


Figura 23
D

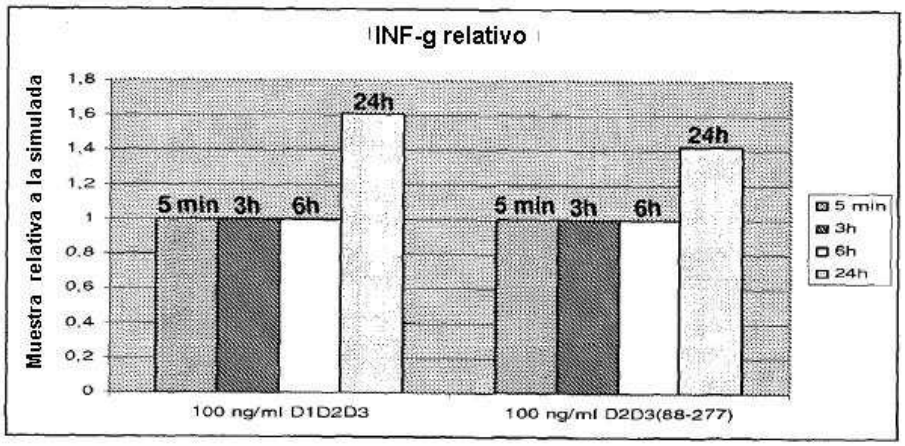


Figura 23

E

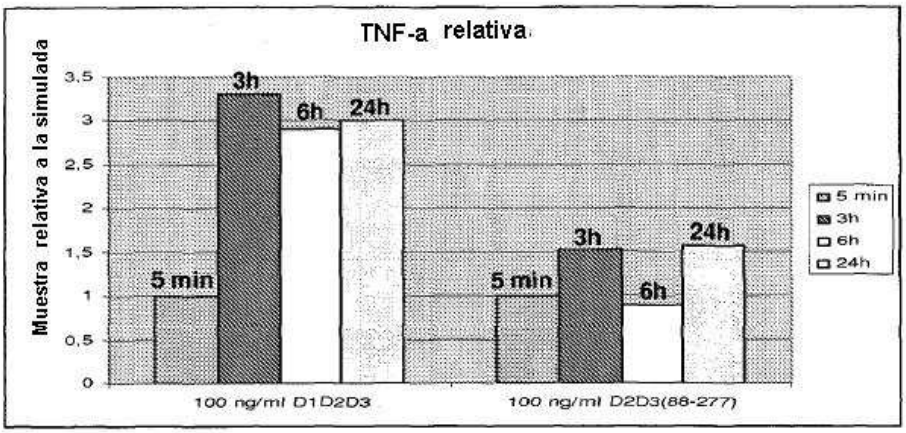
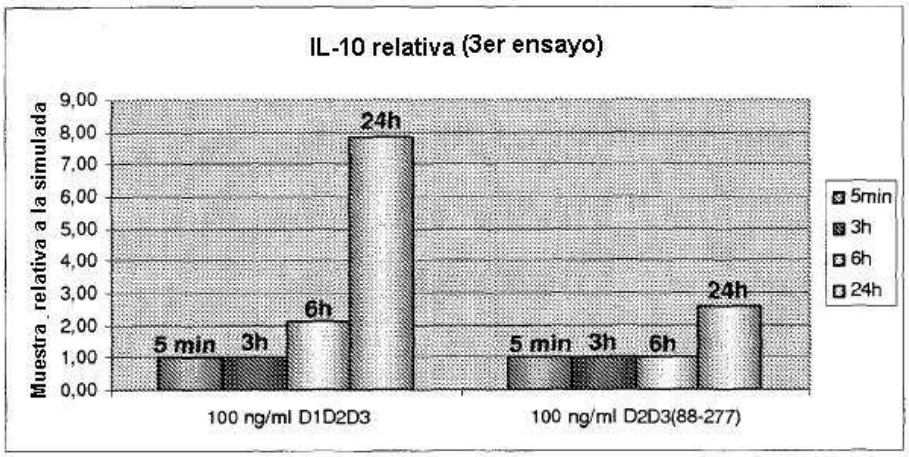


Figura 23

F