

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 120**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011 PCT/EP2011/051208**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11092285**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11700969 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2529235**

54 Título: **Medios y procedimientos para diagnosticar insuficiencia cardíaca en un sujeto**

30 Prioridad:

29.01.2010 US 299360 P
29.01.2010 EP 10000915

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2019

73 Titular/es:

METANOMICS GMBH (50.0%)
Tegeler Weg 33
10589 Berlin, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)

72 Inventor/es:

FUHRMANN, JENS;
RESZKA, REGINA;
KASTLER, JÜRGEN;
BUSCH, KRISTINA;
LEIBOLD, EDGAR;
KATUS, HUGO;
FREY, NORBERT;
WOLF, JOHANNA y
WEIS, TANJA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 728 120 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medios y procedimientos para diagnosticar insuficiencia cardíaca en un sujeto

5 La presente invención se refiere al campo de los procedimientos de diagnóstico. Específicamente, la presente invención contempla un procedimiento para diagnosticar insuficiencia cardíaca en un sujeto, un procedimiento para identificar si un sujeto necesita una terapia de insuficiencia cardíaca o un procedimiento para determinar si una terapia de insuficiencia cardíaca tiene éxito. La invención también se refiere a herramientas para llevar a cabo los procedimientos anteriormente mencionados, tales como dispositivos de diagnóstico.

10 La insuficiencia cardíaca es un problema grave en la medicina moderna. La función deficiente del corazón puede dar lugar a afecciones con peligro para la vida y da como resultado incomodidad para los pacientes que padecen insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca puede afectar al hemicardio derecho o izquierdo, respectivamente, y su potencia puede variar. La Asociación Neoyorquina de Cardiología (NYHA) desarrolló originalmente un sistema de clasificación. Según el sistema de clasificación, los casos leves de insuficiencia cardíaca se clasifican como casos de clase I. Estos pacientes solamente muestran síntomas con ejercicio extremo. Los casos intermedios ya muestran síntomas más pronunciados con menos ejercicio (clases II y III) mientras que la clase IV ya muestra síntomas en reposo (Asociación Neoyorquina de Cardiología. Diseases of the heart and blood vessels. Nomenclature and criteria for diagnosis, 6ª ed. Boston: Little, Brown and co, 1964; 114).

20 La prevalencia de insuficiencia cardíaca aumenta constantemente en la población de los países occidentales desarrollados durante los últimos años. Una razón para dicho aumento puede verse en una esperanza de vida promedio aumentada debido a la medicina moderna. La tasa de mortalidad provocada por insuficiencia cardíaca, sin embargo, podría reducirse adicionalmente mediante enfoques de diagnóstico y terapéuticos mejorados. El denominado estudio de "Framingham" presentó una reducción de la mortalidad a los 5 años de 70 % a 59 % en hombres y de 57 % a 45 % en mujeres cuando se compara una ventana temporal de 1950 a 1969 con de 1990 a 1999. El estudio de "Mayo" muestra una reducción de 65 % a 50 % para hombres para una ventana temporal de 1996 a 2000 en comparación con de 1979 a 1984 y de 51 % a 46 % para mujeres. A pesar de esta reducción de la tasa de mortalidad, la mortalidad global debido a insuficiencia cardíaca aún es una carga importante para la sociedad. La mortalidad en un año para pacientes de clase II a III de NYHA con terapia de IECA aún está entre 9-12 % (RESUELTO) y para clase IV de NYHA sin terapia de IECA 52 % (Consenso).

30 Las técnicas de diagnóstico tales como ecocardiografía dependen de la experiencia del investigador individual y, por tanto, no son siempre fiables. Por otra parte, en ocasiones estas técnicas no pueden diagnosticar la aparición temprana de insuficiencia cardíaca. Los ensayos bioquímicos que se basan en hormonas cardíacas tales como péptidos natriuréticos cerebrales (BNP) también están influidos por otras enfermedades y trastornos tales como insuficiencia renal o dependen de la condición física general del paciente. No obstante, los péptidos natriuréticos cerebrales son el criterio de referencia actual para evaluar bioquímicamente la insuficiencia cardíaca. Según un estudio reciente que compara BNP y pro-BNP N terminal (NT-proBNP) en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca, el BNP es un mejor indicador de la insuficiencia cardíaca y la disfunción sistólica ventricular izquierda que NT-proBNP. En grupos de pacientes sintomáticos, una relación de probabilidad de diagnóstico de 27 para BNP contrasta con una sensibilidad de 85 % y especificidad de 84 % en la detección de la insuficiencia cardíaca (Ewald 2008, Intern Med J 38 (2):101-13.).

40 Sin embargo, un objetivo de la medicina moderna es identificar y tratar de forma fiable pacientes con insuficiencia cardíaca y, en particular, identificarlos en el momento de aparición temprana de la insuficiencia cardíaca, es decir en los estadios I a III de NYHA tempranos y, en particular, en el estadio I de NYHA. En consecuencia, se desean en gran medida medios y procedimientos para diagnosticar de forma fiable la insuficiencia cardíaca pero aún no están disponibles.

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la insuficiencia cardíaca en un sujeto según la reivindicación 1.

50 El procedimiento al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención incluye un procedimiento que consiste esencialmente en las etapas indicadas o un procedimiento que incluye etapas adicionales. Sin embargo, debe entenderse que el procedimiento, en una realización preferida, es un procedimiento llevado a cabo *ex vivo*, es decir no practicado en el cuerpo humano o animal. El procedimiento, preferentemente, puede ser asistido por la automatización.

55 El término "diagnosticar" como se usa en el presente documento se refiere a evaluar si un sujeto padece la insuficiencia cardíaca o no. Como entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación, aunque se prefiere que lo sea, puede habitualmente no ser correcta para el 100 % de los sujetos investigados. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda evaluarse correctamente y, por tanto, diagnosticarse. El experto en la materia puede determinar sin más si una parte es estadísticamente significativa usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, ensayo de t de Student, ensayo de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son

al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,2, 0,1 o 0,05.

El término incluye diagnóstico individual de la insuficiencia cardíaca o sus síntomas así como supervisión continua de un paciente. La supervisión, es decir diagnóstico de la presencia o ausencia de insuficiencia cardíaca o los síntomas que la acompañan en diversos puntos temporales, incluye supervisión de pacientes que se sabe que padece insuficiencia cardíaca así como supervisión de sujetos que se sabe que están en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Asimismo, la supervisión también puede usarse para determinar si un paciente es tratado con éxito o si al menos los síntomas de la insuficiencia cardíaca pueden aliviarse a lo largo del tiempo mediante una terapia determinada. Por otra parte, el término también incluye clasificar un sujeto según las clases de la Asociación Neoyorquina de Cardiología (NYHA) para insuficiencia cardíaca. Según esta clasificación, la insuficiencia cardíaca puede subdividirse en cuatro clases. Los sujetos que presentan clase I no muestran ninguna limitación en las actividades excepto con ejercicio físico fuerte. Los sujetos que presentan clase II muestran limitación leve, ligera, de actividad, mientras que están cómodos en reposo o con ejercicio leve. Los sujetos que presentan clase III muestran limitación notable de cualquier actividad, mientras que están cómodos solamente en reposo. Los sujetos que presentan clase IV muestran incomodidad y síntomas incluso en reposo. Preferentemente, la insuficiencia cardíaca para determinar de acuerdo con la presente invención es insuficiencia cardíaca leve, es decir insuficiencia cardíaca según la clase I de NYHA, o insuficiencia cardíaca intermedia, es decir insuficiencia cardíaca según la clase II y/o III de NYHA. Preferentemente, dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca según la clase I de NYHA y dicho al menos un biomarcador se selecciona de la Tabla 4a a c o 6. Además, preferentemente, dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca según la clase II o III de NYHA y el al menos un biomarcador se selecciona de la Tabla 1a a c o 3.

Otro sistema de estadificación es proporcionado por la Asociación Estadounidense de Cardiología. Se subdividen cuatro estadios de insuficiencia cardíaca: Estadio A: Pacientes con alto riesgo de desarrollar IC en el futuro pero sin trastorno cardíaco funcional o estructural. Estadio B: un trastorno cardíaco estructural pero sin síntomas en ningún estadio. Estadio C: síntomas previos o actuales de insuficiencia cardíaca en el contexto de un problema cardíaco estructural subyacente, pero controlado con tratamiento médico. Estadio D: enfermedad avanzada que requiere apoyo basado en hospital, un trasplante cardíaco o cuidados paliativos. Se entenderá que el procedimiento de la presente invención puede usarse para estadificación de la insuficiencia cardíaca según este sistema, preferentemente, los biomarcadores identificados permitirán diagnosticar la insuficiencia cardíaca según los estadios A a C y diferenciar entre el estadio leve A (Tabla 4a a c o 6) y los estadios más graves B y C (Tabla 1a a c o 3).

La expresión "insuficiencia cardíaca" como se usa en el presente documento se refiere a una función deficiente del corazón. Dicha deficiencia puede ser una disfunción sistólica que da como resultado una fracción de eyección reducida de forma significativa de sangre del corazón y, por tanto, un flujo sanguíneo reducido. Específicamente, la insuficiencia cardíaca sistólica se caracteriza por una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) reducida significativamente, preferentemente, una fracción de eyección de menos de 55 %. Como alternativa, la deficiencia puede ser una disfunción diastólica, es decir una incapacidad del ventrículo para relajarse de forma apropiada. Esto último se ve acompañado habitualmente por una pared ventricular más rígida. La disfunción diastólica provoca llenado inadecuado del ventrículo y, por lo tanto, provoca consecuencias para el flujo sanguíneo, en general. Por tanto, la disfunción diastólica también da como resultado presiones diastólicas finales elevadas y el resultado final es comparable al caso de disfunción sistólica (edema pulmonar en insuficiencia cardíaca izquierda, edema periférico en insuficiencia cardíaca derecha). La insuficiencia cardíaca puede, por tanto, afectar al hemicardio derecho (circulación pulmonar), el hemicardio izquierdo (circulación corporal) o ambos. Se conocen bien en este campo técnicas para medir una función cardíaca deficiente y, por tanto, insuficiencia cardíaca, e incluyen ecocardiografía, electrofisiología, angiografía y la determinación de biomarcadores peptídicos, tales como el péptido natriurético cerebral (BNP) o el fragmento N terminal de su propéptido, en la sangre. Se entenderá que la función deficiente del corazón puede producirse de forma permanente o solamente en determinadas condiciones de tensión o ejercicio. Dependiendo de la fuerza de los síntomas, la insuficiencia cardíaca puede clasificarse como se expone en otra parte del presente documento. Los síntomas típicos de insuficiencia cardíaca incluyen disnea, dolor torácico, mareo, confusión, edema pulmonar y/o periférico. Se entenderá que la aparición de los síntomas así como su gravedad puede depender de la gravedad de la insuficiencia cardíaca y las características y causas de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica o restrictiva, es decir localizada en el hemicardio derecho o izquierdo. Se conocen bien en la técnica síntomas adicionales de insuficiencia cardíaca y se describen en los libros de texto convencionales de medicina, tales como Stedman o Brunwald.

Preferentemente, la insuficiencia cardíaca como se usa en el presente documento se refiere a insuficiencia cardíaca congestiva y, más preferentemente, el sujeto que muestra dicha insuficiencia cardíaca padece una cardiomiopatía dilatativa. Además, más preferentemente, el sujeto de acuerdo con la presente invención padece cardiomiopatía isquémica o cardiomiopatía hipertrófica. En otra realización el sujeto de acuerdo con la presente invención padece cardiomiopatía dilatativa y cardiomiopatía isquémica o cardiomiopatía dilatativa y cardiomiopatía hipertrófica. Sin embargo, la insuficiencia cardíaca a la que se hace referencia de acuerdo con la presente invención también incluye insuficiencia cardíaca isquémica, hipertrofia miocárdica, enfermedad cardíaca valvular, cardiomiopatía restrictiva, trastornos pericárdicos constrictivos y enfermedad hipertensiva.

El término "biomarcador" como se usa en el presente documento se refiere a una especie molecular que actúa como

un indicador para una enfermedad o efecto como se hace referencia en la presente memoria descriptiva. Dicha especie molecular puede ser un metabolito en sí mismo que se encuentra en una muestra de un sujeto. Por otra parte, el biomarcador también puede ser una especie molecular que procede de dicho metabolito. En dicho caso, el metabolito en sí se modificará químicamente en la muestra o durante el procedimiento de determinación y, como resultado de dicha modificación, una especie molecular químicamente diferente, es decir, el analito, será la especie molecular determinada. Debe entenderse que, en dicho caso, el analito representa el metabolito en sí y tiene el mismo potencial como indicador para la afección médica respectiva.

En el procedimiento según la presente invención, debe determinarse al menos la cantidad de lisofosfatidilcolina C18:2. Sin embargo, más preferentemente, se determinará un grupo de biomarcadores para reforzar la especificidad y/o sensibilidad de la evaluación. Dicho grupo, preferentemente, comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o hasta todos los biomarcadores mencionados mostrados en las Tablas. Además de los biomarcadores específicos enumerados en la memoria descriptiva, otros biomarcadores pueden, preferentemente, determinarse también en los procedimientos de la presente invención.

Un metabolito como se usa en el presente documento se refiere a al menos una molécula de un metabolito específico hasta una pluralidad de moléculas de dicho metabolito específico. Debe entenderse además que un grupo de metabolitos significa una pluralidad de moléculas químicamente diferentes en las que para cada metabolito puede estar presente al menos una molécula hasta una pluralidad de moléculas. Un metabolito de acuerdo con la presente invención abarca todas las clases de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos incluyendo los comprendidos por material biológico tales como organismos. Preferentemente, el metabolito de acuerdo con la presente invención es un compuesto de moléculas pequeñas. Más preferentemente, en caso de que se prevea una pluralidad de metabolitos, representando dicha pluralidad de metabolitos un metaboloma, es decir estando la colección de metabolitos comprendida por un organismo, un órgano, un tejido, un fluido corporal o una célula en un momento específico y en condiciones específicas.

Los metabolitos son compuestos de moléculas pequeñas, tales como sustratos para enzimas de rutas metabólicas, intermedios de dichas rutas o los productos obtenidos por una ruta metabólica. Las rutas metabólicas se conocen bien en la técnica y pueden variar entre especies. Preferentemente, dichas rutas incluyen al menos el ciclo del ácido cítrico, cadena respiratoria, glucólisis, gluconeogénesis, ruta de hexosa monofosfato, ruta oxidativa de pentosa fosfato, producción y β -oxidación de ácidos grasos, ciclo de la urea, rutas de biosíntesis de aminoácidos, rutas de degradación de proteínas tales como degradación proteasómica, rutas de degradación de aminoácidos, biosíntesis o degradación de: lípidos, policétidos (incluyendo, por ejemplo, flavonoides e isoflavonoides), isoprenoides (incluyendo, por ejemplo, terpenos, esteroides, esteroides, carotenoides, xantófilas), hidratos de carbono, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, bencenoides, indoles, compuestos de indol-azufre, porfirinas, antocianinas, hormonas, vitaminas, cofactores tales como grupos prostéticos o transportadores de electrones, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y moléculas relacionadas tales como ARNt, microARN (miARN) o ARNm. En consecuencia, los metabolitos de compuestos de moléculas pequeñas están compuestos preferentemente de las siguientes clases de compuestos: alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, compuestos aromáticos, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, amidas, cianuros, aminoácidos, péptidos, tioles, tioésteres, ésteres de fosfato, ésteres de sulfato, tioéteres, sulfóxidos, éteres o combinaciones o derivados de los compuestos anteriormente mencionados. Las moléculas pequeñas entre los metabolitos pueden ser metabolitos primarios que son necesarios para la función celular, función orgánica o crecimiento, desarrollo o salud animal normales. Por otra parte, los metabolitos de moléculas pequeñas comprenden además metabolitos secundarios que tienen función ecológica esencial, por ejemplo metabolitos que permiten que un organismo se adapte a su ambiente. Asimismo, los metabolitos no están limitados a dichos metabolitos primarios y secundarios y abarcan además compuestos de moléculas pequeñas artificiales. Dichos compuestos de moléculas pequeñas artificiales proceden de moléculas pequeñas proporcionadas de forma exógena que se administran o son captadas por un organismo pero no son metabolitos primarios o secundarios como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, los compuestos de moléculas pequeñas artificiales pueden ser productos metabólicos obtenidos de fármacos por rutas metabólicas del animal. Por otra parte, los metabolitos incluyen además péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, tales como ARN o ADN. Más preferentemente, un metabolito tiene un peso molecular de 50 Da (Dalton) a 30.000 Da, lo más preferentemente menos de 30.000 Da, menos de 20.000 Da, menos de 15.000 Da, menos de 10.000 Da, menos de 8.000 Da, menos de 7.000 Da, menos de 6.000 Da, menos de 5.000 Da, menos de 4.000 Da, menos de 3.000 Da, menos de 2.000 Da, menos de 1.000 Da, menos de 500 Da, menos de 300 Da, menos de 200 Da, menos de 100 Da. Preferentemente, un metabolito tiene, sin embargo, un peso molecular de al menos 50 Da. Lo más preferentemente, un metabolito de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de 50 Da hasta 1.500 Da.

El término "muestra" como se utiliza en el presente documento se refiere a muestras de líquidos corporales, preferentemente, sangre, plasma, suero, saliva u orina, o muestras obtenidas, por ejemplo, por biopsia, de células, tejidos u órganos, en particular del corazón. Más preferentemente, la muestra es una muestra de sangre, plasma o suero, lo más preferentemente, una muestra de plasma. Pueden obtenerse muestras biológicas de un sujeto como se especifica en otra parte en el presente documento. Se conocen bien en la materia técnicas para obtener los diferentes tipos de muestras biológicas anteriormente mencionados. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de sangre tomando sangre mientras que las muestras tisulares o de órganos deben obtenerse, por ejemplo, por biopsia.

Las muestras anteriormente mencionadas son, preferentemente, pretratadas antes de usarse para el procedimiento

de la presente invención. Como se describe con mayor detalle a continuación, dicho pretratamiento puede incluir tratamientos necesarios para liberar o separar los compuestos o para retirar el material en exceso o los residuos. Las técnicas adecuadas comprenden centrifugación, extracción, fraccionamiento, ultrafiltración, precipitación de proteínas seguida de filtración y purificación y/o enriquecimiento de compuestos. Por otra parte, se llevan a cabo otros pretratamientos para proporcionar los compuestos en una forma o concentración adecuada para el análisis de compuestos. Por ejemplo, si se usa espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases en el procedimiento de la presente invención, será necesario derivatizar los compuestos antes de dicha cromatografía de gases. Los pretratamientos adecuados y necesarios dependen del medio usado para llevar a cabo el procedimiento de la invención y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las muestras pretratadas como se ha descrito antes también están comprendidas por el término "muestra" como se usa de acuerdo con la presente invención.

El término "sujeto", como se utiliza en el presente documento, se refiere a animales y, preferentemente, a mamíferos. Más preferentemente, el sujeto es un primate y, lo más preferentemente, un ser humano. Preferentemente, se sospecha que el sujeto padece insuficiencia cardíaca, es decir puede mostrar ya algunos o todos de los síntomas asociados con la enfermedad. Más preferentemente, muestra síntomas según una cualquiera o más de las clases I a III de NYHA. Por otra parte, el sujeto mostrará preferentemente también insuficiencia cardíaca sistólica congestiva debido a una disfunción contráctil tal como cardiomiopatía dilatada. Preferentemente, el sujeto, sin embargo, está aparentemente sano, aparte de las enfermedades y trastornos anteriormente mencionados. En particular, preferentemente, no mostrará síntomas según los pacientes de clase IV de NYHA o padecerá ictus, infarto de miocardio en los últimos 4 meses antes de haberse tomado la muestra o enfermedades inflamatorias agudas o crónicas y tumores malignos. Asimismo, el sujeto ha estado, preferentemente, tomando medicamentos de forma estable en las últimas 4 semanas antes de tomarse la muestra.

La expresión "determinar la cantidad" como se utiliza en el presente documento se refiere a determinar al menos un elemento característico de un biomarcador para determinar por el procedimiento de la presente invención en la muestra. Los elementos característicos de acuerdo con la presente invención son elementos que caracterizan las propiedades físicas y/o químicas incluyendo propiedades bioquímicas de un biomarcador. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, peso molecular, viscosidad, densidad, carga eléctrica, espín, actividad óptica, color, fluorescencia, quimioluminiscencia, composición elemental, estructura química, capacidad de reaccionar con otros compuestos, capacidad de inducir una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador) y similares. Los valores para dichas propiedades pueden actuar como elementos característicos y pueden determinarse mediante técnicas bien conocidas en este campo. Por otra parte, el elemento característico puede ser cualquier elemento que proceda de los valores de las propiedades físicas y/o químicas de un biomarcador por operaciones convencionales, por ejemplo, cálculos matemáticos tales como multiplicación, división o cálculo logarítmico. Lo más preferentemente, el al menos un elemento característico permite la determinación y/o identificación química de dicho al menos un biomarcador y su cantidad. En consecuencia, el valor característico, preferentemente, también comprende información relacionada con la abundancia del biomarcador del que procede el valor característico. Por ejemplo, un valor característico de un biomarcador puede ser un máximo en un espectro de masas. Dicho máximo contiene información característica del biomarcador, es decir la información de m/z , así como un valor de intensidad relacionado con la abundancia de dicho biomarcador (es decir, su cantidad) en la muestra.

Como se ha analizado anteriormente, cada biomarcador comprendido por una muestra puede determinarse, preferentemente, de acuerdo con la presente invención de forma cuantitativa o semicuantitativa. Para determinación cuantitativa, se determinará la cantidad absoluta o precisa del biomarcador o se determinará la cantidad relativa del biomarcador basándose en el valor determinado para el elemento o los elementos característicos a los que se ha hecho referencia en el presente documento anteriormente. La cantidad relativa puede determinarse en un caso en el que la cantidad precisa de un biomarcador no pueda determinarse o no se determine. En dicho caso, puede determinarse si la cantidad en la que está presente el biomarcador aumenta o se reduce con respecto a una segunda muestra que comprende dicho biomarcador en una segunda cantidad. En una realización preferida, dicha segunda muestra que comprende dicho biomarcador será una referencia calculada como se especifica en otra parte en el presente documento. El análisis cuantitativo de un biomarcador, por tanto, también incluye lo que se denomina en ocasiones análisis semicuantitativo de un biomarcador.

Por otra parte, la determinación como se usa en el procedimiento de la presente invención, preferentemente, incluye el uso de una etapa de separación de compuestos antes de la etapa de análisis a la que se ha hecho referencia anteriormente. Preferentemente, dicha etapa de separación de compuestos produce una separación resuelta en el tiempo de los metabolitos comprendidos por la muestra. Las técnicas adecuadas para la separación que se van a usar preferentemente de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, incluyen todas las técnicas de separación cromatográfica tales como cromatografía líquida (CL), cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina, exclusión por tamaño o cromatografía de afinidad. Estas técnicas son bien conocidas en la materia y pueden ser aplicadas por los expertos en la materia sin más. Lo más preferentemente, CL y/o CG son técnicas cromatográficas contempladas por el procedimiento de la presente invención. Son bien conocidos en la técnica dispositivos adecuados para dicha determinación de biomarcadores. Preferentemente, se usa espectrometría de masas, en particular espectrometría de masas de cromatografía de gases (CG-EM), espectrometría de masas de cromatografía líquida (CL-EM), espectrometría de masas de infusión directa o espectrometría de masas de resonancia ciclónica iónica de transformada de Fourier (TF-RCI-EM), espectrometría de masas de electroforesis capilar (EC-EM), espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR-EM),

espectrometría de masas de cuadrípulo, cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente, tal como EM-EM o EM-EM-EM, espectrometría de masas de plasma acoplado de forma inductiva (PAI-EM), espectrometría de masas de pirólisis (Py-EM), espectrometría de masas de movilidad iónica o espectrometría de tiempo de vuelo (TDV). Lo más preferentemente, se usan CL-EM y/o CG-EM como se describe en detalle posteriormente. Dichas técnicas se desvelan en, por ejemplo, Nissen 1995, Journal of Chromatography A, 703: 37-57, documentos US 4.540.884 o US 5.397.894. Como alternativa o además de las técnicas de espectrometría de masas, las siguientes técnicas pueden usarse para la determinación de compuestos: resonancia magnética nuclear (RMN), captura de imágenes por resonancia magnética (IRM), análisis de infrarrojos de transformada de Fourier (RF-IR), espectroscopia ultravioleta (UV), índice de refracción (IR), detección fluorescente, detección radioquímica, detección electroquímica, dispersión lumínica (DL), espectroscopia de Raman dispersiva o detección por ionización de llama (DIL). Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia y pueden aplicarse sin más. El procedimiento de la presente invención, preferentemente, estará asistido por automatización. Por ejemplo, el procesamiento de muestras o el pretratamiento pueden automatizarse por robótica. El procesamiento y la comparación de datos, preferentemente, están asistidos por programas informáticos y bases de datos adecuados. La automatización, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, permite usar el procedimiento de la presente invención en enfoques de alto rendimiento.

Por otra parte, el al menos un biomarcador también puede determinarse mediante un ensayo químico o biológico específico. Dicho ensayo comprenderá medios que permiten detectar específicamente el al menos un biomarcador en la muestra. Preferentemente, dichos medios son capaces de reconocer específicamente la estructura química del biomarcador o son capaces de identificar específicamente el biomarcador basándose en su capacidad de reaccionar con otros compuestos o su capacidad de inducir una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador). Los medios que son capaces de reconocer específicamente la estructura química de un biomarcador son, preferentemente, anticuerpos u otras proteínas que interaccionan específicamente con estructuras químicas, tales como receptores o enzimas. Pueden obtenerse anticuerpos específicos, por ejemplo, usando el biomarcador como antígeno por procedimientos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos, como se indican en el presente documento, incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse con el antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos humanizados en los que se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Por otra parte, están abarcados anticuerpos monocatenarios. Las secuencias donantes incluirán habitualmente al menos los restos de aminoácidos de unión a antígeno del donante pero pueden comprender también otros restos de aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Las proteínas adecuadas que son capaces de reconocer específicamente el biomarcador son, preferentemente, enzimas que están implicadas en la conversión metabólica de dicho biomarcador. Dichas enzimas pueden usar el biomarcador como un sustrato o pueden convertir un sustrato en el biomarcador. Por otra parte, dichos anticuerpos pueden usarse como una base para generar oligopéptidos que reconocen específicamente el biomarcador. Estos oligopéptidos comprenderán, por ejemplo, los dominios o bolsillos de unión de la enzima para dicho biomarcador. Los ensayos basados en anticuerpos y/o enzimas adecuados pueden ser RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), ensayos inmunitarios de enzimas de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por disociación (DELFLIA) o inmunoensayos de fase sólida. Por otra parte, el biomarcador también puede determinarse basándose en su capacidad de reaccionar con otros compuestos, es decir por una reacción química específica. Asimismo, el biomarcador puede determinarse en una muestra debido a su capacidad de inducir una respuesta en un sistema de lectura biológica. La respuesta biológica se detectará como lectura que indica la presencia y/o la cantidad del biomarcador comprendido en la muestra. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la inducción de la expresión génica o una respuesta fenotípica de una célula o un organismo. En una realización preferida, la determinación del al menos un biomarcador es un procedimiento cuantitativo, por ejemplo, que permite también la determinación de la cantidad del al menos un biomarcador en la muestra.

Como se ha descrito anteriormente, dicha determinación del al menos un biomarcador puede, preferentemente, comprender espectrometría de masas (EM). La espectrometría de masas como se utiliza en el presente documento, abarca todas las técnicas que permiten la determinación del peso molecular (es decir, la masa) o una variable de masa correspondiente a un compuesto, es decir, un biomarcador, para determinar de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la espectrometría de masas como se utiliza en el presente documento, se refiere a CG-EM, CL-EM, espectrometría de masas de infusión directa, TF-RCI-EM, EC-EM, CLAR-EM, espectrometría de masas de cuadrípulo, cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente tal como EM-EM o EM-EM-EM, PAI-EM, Py-EM, TDV o cualquier enfoque combinado usando las técnicas anteriormente mencionadas. Los expertos en la materia conocen bien cómo aplicar estas técnicas. Por otra parte, los dispositivos adecuados están disponibles en el mercado. Más preferentemente, la espectrometría de masas, como se utiliza en el presente documento, se refiere a CL-EM y/o CG-EM, es decir a espectrometría de masas que está ligada operativamente a una etapa de separación cromatográfica anterior. Más preferentemente, la espectrometría de masas, como se utiliza en el presente documento, abarca EM de cuadrípulo. Lo más preferentemente, dicha EM de cuadrípulo se lleva a cabo de la siguiente manera: a) selección de un cociente de masa/carga (m/z) de un ion creado por ionización en un primer cuadrípulo analítico del espectrómetro de masas, b) fragmentación del ion seleccionado en la etapa a) aplicando una tensión de aceleración en un cuadrípulo posterior adicional que se llena de un gas de colisión y actúa como una cámara de colisión, c) selección de un cociente

de masa/carga de un ion creado por el procedimiento de fragmentación de la etapa b) en un cuadrupolo posterior adicional, de modo que las etapas a) a c) del procedimiento se llevan a cabo al menos una vez y análisis del cociente de masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias como resultado del procedimiento de ionización, por lo que el cuadrupolo se llena con gas de colisión pero no se aplica tensión de aceleración durante el análisis. Pueden encontrarse detalles acerca de dicha espectrometría de masas más preferida para usar de acuerdo con la presente invención en el documento WO 03/073464.

Más preferentemente, dicha espectrometría de masas es EM de cromatografía líquida (CL) y/o EM de cromatografía de gases (CG). La cromatografía líquida, como se utiliza en el presente documento, se refiere a todas las técnicas que permiten la separación de compuestos (es decir, metabolitos) en fase líquida o supercrítica. La cromatografía líquida se caracteriza porque se pasan compuestos en una fase móvil a través de la fase estacionaria. Cuando los compuestos pasan a través de la fase estacionaria a diferentes velocidades se separan a lo largo del tiempo ya que cada compuesto individual tiene su tiempo de retención específico (es decir, el tiempo que necesita el compuesto para pasar a través del sistema). La cromatografía líquida, como se utiliza en el presente documento, también incluye CLAR. Están disponibles en el mercado dispositivos para cromatografía líquida, por ejemplo, de Agilent Technologies, Estados Unidos. La cromatografía de gases, como se aplica de acuerdo con la presente invención, en principio, actúa de forma comparable a la cromatografía líquida. Sin embargo, en lugar de tener los compuestos (es decir, metabolitos) en una fase móvil líquida que se pasa a través de la fase estacionaria, los compuestos estarán presentes en un volumen gaseoso. Los compuestos atraviesan la columna que puede contener materiales de soporte sólido como fase estacionaria o cuyas paredes pueden actuar como o están revestidas con la fase estacionaria. De nuevo, cada compuesto tiene un tiempo específico necesario para atravesar la columna. Por otra parte, en el caso de la cromatografía de gases se prevé preferentemente que los compuestos se derivaticen antes de la cromatografía de gases. Se conocen bien en este campo técnicas adecuadas para la derivatización. Preferentemente, la derivatización de acuerdo con la presente invención se refiere a metoximación y trimetilsililación de, preferentemente, compuestos polares y transmetilación, metoximación y trimetilsililación de, preferentemente, compuestos no polares (es decir, lipófilos).

El término "referencia" se refiere a valores de elementos característicos de cada uno de los biomarcadores que pueden correlacionarse con una afección médica, es decir, la presencia o ausencia de la enfermedad, patologías o un efecto al que se hace referencia en el presente documento. Preferentemente, una referencia es un valor umbral (por ejemplo, una cantidad o relación de cantidades) para un biomarcador por el que los valores hallados en una muestra para investigar que son mayores que o esencialmente idénticos al umbral son indicativos de la presencia de una afección médica mientras que los que son menores son indicativos de la ausencia de la afección médica. Se entenderá que además, preferentemente, una referencia puede ser a un valor umbral para un biomarcador por el que los valores hallados en una muestra para investigar que son menores que o idénticos al umbral son indicativos de la presencia de una afección médica mientras que los que son mayores son indicativos de la ausencia de la afección médica.

De acuerdo con el procedimiento anteriormente mencionado de la presente invención, una referencia es, preferentemente, una referencia obtenida de una muestra de un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que padecen insuficiencia cardíaca. En dicho caso, un valor para el al menos un biomarcador hallado en la muestra de ensayo que es esencialmente idéntico es indicativo de la presencia de la enfermedad. Por otra parte, la referencia, también preferentemente, podría ser de un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que no padecen insuficiencia cardíaca, preferentemente, un sujeto aparentemente sano. En dicho caso, un valor para el al menos un biomarcador hallado en la muestra de ensayo alterado con respecto a la referencia es indicativo de la presencia de la enfermedad. Lo mismo se aplica, haciendo los cambios necesarios, para una referencia calculada, lo más preferentemente el promedio o la mediana, para el valor relativo o absoluto del al menos un biomarcador de una población de individuos que comprende el sujeto para investigar. Los valores absolutos o relativos del al menos un biomarcador de dichos individuos de la población pueden determinarse como se especifica en otra parte del presente documento. Se conoce bien en la técnica cómo calcular un valor de referencia adecuado, preferentemente, el promedio o la media. La población de los sujetos a los que se ha hecho referencia anteriormente comprenderá una pluralidad de sujetos, preferentemente, al menos 5, 10, 50, 100, 1.000 o 10.000 sujetos. Debe entenderse que el sujeto al que se diagnostica por el procedimiento de la presente invención y los sujetos de dicha pluralidad de sujetos son de la misma especie.

El valor para el al menos un biomarcador de la muestra de ensayo y el valor de referencia son esencialmente idénticos, si los valores para los elementos característicos y, en el caso de la determinación cuantitativa, los valores de intensidad son esencialmente idénticos. Esencialmente idénticos significa que la diferencia entre dos valores, preferentemente, no es significativa y se caracterizará porque los valores para la intensidad están al menos dentro del intervalo entre el percentil 1 y 99, el percentil 5 y 95, el percentil 10 y 90, el percentil 20 y 80, el percentil 30 y 70, el percentil 40 y 60 del valor de referencia, preferentemente, el percentil 50, 60, 70, 80, 90 o 95 del valor de referencia. Se conocen bien en la técnica ensayos estadísticos para determinar si dos cantidades son esencialmente idénticas y también se describen en otra parte del presente documento.

Una diferencia observada para dos valores, por otro lado, será estadísticamente significativa. Una diferencia en el valor relativo o absoluto es, preferentemente, significativa fuera del intervalo entre el percentil 45 y 55, el percentil 40 y 60, el percentil 30 y 70, el percentil 20 y 80, el percentil 10 y 90, el percentil 5 y 95, el percentil 1 y 99 del valor de referencia. En las tablas adjuntas así como en los ejemplos se describen cambios y relaciones preferidos de las medianas.

Preferentemente, la referencia, es decir, valores para al menos un elemento característico del al menos un biomarcador o relaciones de los mismos, se almacenará en un medio de almacenamiento de datos adecuados tal como una base de datos y están, por tanto, también disponibles para evaluaciones futuras.

5 El término "comparar" se refiere a determinar si el valor determinado de un biomarcador es esencialmente idéntico a una referencia o difiere de la misma. Preferentemente, se considera que un valor para un biomarcador difiere de una referencia si la diferencia observada es estadísticamente significativa, lo que puede determinarse mediante técnicas estadísticas a las que se hace referencia en otra parte de la presente descripción. Si la diferencia no es estadísticamente significativa, el valor de biomarcador y la referencia son esencialmente idénticos. Basándose en la comparación a la que se ha hecho referencia anteriormente, puede evaluarse si un sujeto padece o no la enfermedad.

10 Para los biomarcadores específicos a los que se ha hecho referencia en la presente memoria descriptiva, los valores preferidos para los cambios en las cantidades o relaciones relativas (es decir, los cambios expresados como las relaciones de las medianas) o el tipo de regulación (es decir, regulación "positiva" o "negativa" que da como resultado una cantidad o relación relativa y/o absoluta mayor o menor) se indican en las tablas y en los ejemplos posteriores. La mediana de las relaciones indica el grado de aumento o reducción, por ejemplo, un valor de 2 significa que la cantidad es el doble de la cantidad del biomarcador comparado con la referencia. Por otra parte, resulta evidente si hay una "regulación positiva" o una "regulación negativa". En el caso de una "regulación positiva", la relación de la mediana superará 1,0 mientras que estará por debajo de 1,0 en el caso de una regulación "negativa". En consecuencia, la dirección de la regulación puede obtenerse también de las tablas.

20 Preferentemente, la composición está asistida por automatización. Por ejemplo, puede usarse un programa informático adecuado que comprende algoritmos para la comparación de dos conjuntos de datos diferentes (por ejemplo, conjuntos de datos que comprenden los valores del elemento o los elementos característicos). Dichos programas informáticos y algoritmos se conocen bien en la técnica. A pesar de lo anterior, también se puede llevar a cabo una comparación manualmente.

25 Provechosamente, se ha descubierto en el estudio subyacente a la presente invención que las cantidades de los biomarcadores específicos a los que se ha hecho referencia anteriormente son indicadores de la insuficiencia cardíaca. En consecuencia, el al menos un biomarcador especificado anteriormente en una muestra puede, en principio, usarse para evaluar si un sujeto padece insuficiencia cardíaca. Esto es particularmente útil para un diagnóstico eficaz de la enfermedad así como para mejorar el tratamiento preclínico y clínico de la insuficiencia cardíaca así como una supervisión eficaz de los pacientes. Por otra parte, los hallazgos subyacentes a la presente invención también
30 facilitarán el desarrollo de terapias basadas en fármacos eficaces u otras intervenciones incluyendo dietas nutricionales contra la insuficiencia cardíaca como se expone en detalles posteriormente.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha muestra del sujeto se ha obtenido en reposo.

35 En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha insuficiencia cardíaca es cardiomiopatía dilatada.

En otra realización preferida más del procedimiento de la presente invención, dicha insuficiencia cardíaca es cardiomiopatía isquémica y/o cardiomiopatía dilatada.

40 Las definiciones y explicaciones de las expresiones realizadas anteriormente se aplican haciendo los cambios necesarios para las siguientes realizaciones de la presente invención excepto cuando se especifique otra cosa posteriormente en el presente documento.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar si un sujeto necesita una terapia de insuficiencia cardíaca o un cambio de terapia que comprende las etapas de los procedimientos de la presente invención y la etapa adicional de identificación de un sujeto que lo necesite si se diagnostica insuficiencia cardíaca.

45 La expresión "necesita una terapia de insuficiencia cardíaca", como se utiliza en el presente documento, significa que la enfermedad en el sujeto está en un estado en el que es necesaria o beneficiosa la intervención terapéutica para aliviar o tratar la insuficiencia cardíaca o los síntomas asociados con la misma. En consecuencia, los hallazgos de los estudios subyacentes a la presente invención no solamente permiten diagnosticar la insuficiencia cardíaca en un sujeto sino que también permiten identificar sujetos que deberían tratarse mediante una terapia de insuficiencia cardíaca o cuya terapia de insuficiencia cardíaca necesita un ajuste. Una vez que se ha identificado el sujeto, el procedimiento
50 puede incluir además una etapa de realizar recomendaciones para una terapia de insuficiencia cardíaca.

Una terapia de insuficiencia cardíaca, como se utiliza de acuerdo con la presente invención, preferentemente, se refiere a una terapia que comprende o consiste en la administración de al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en: inhibidores de ACE (IACE), betabloqueantes, inhibidores de AT1, antagonistas de aldosterona, antagonistas de renina, diuréticos, sensibilizador de Ca, glucósidos de digitalis, polipéptidos de la familia de la proteína S100 (como se desvela en los documentos DE000003922873A1, DE000019815128A1 o DE000019915485A1),
55 péptidos natriuréticos tales como BNP (Nesiritida (péptido natriurético cerebral recombinante humano - BNP)) o ANP.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para determinar si una terapia contra la insuficiencia cardíaca tiene éxito en un sujeto que comprende las etapas de los procedimientos de la presente invención y la etapa adicional de determinar si una terapia tiene éxito si no se diagnostica insuficiencia cardíaca.

5 Debe entenderse que una terapia de insuficiencia cardíaca tendrá éxito si la insuficiencia cardíaca o al menos algunos síntomas de la misma pueden tratarse o aliviarse en comparación con un sujeto sin tratar. Por otra parte, una terapia también tiene éxito como se entiende en el presente documento si la progresión de enfermedad puede prevenirse o al menos ralentizarse en comparación con un sujeto sin tratar.

10 Los procedimientos anteriormente mencionados para la determinación del al menos un biomarcador pueden implementarse en un dispositivo. Un dispositivo, como se utiliza en el presente documento, comprenderá al menos los medios anteriormente mencionados. Por otra parte, el dispositivo, preferentemente, comprende además medios para la comparación y evaluación del elemento o elementos característicos detectados del al menos un biomarcador y, también preferentemente, la intensidad de señal determinada. Los medios del dispositivo están, preferentemente, unidos operativamente entre sí. Cómo ligar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para determinar cualitativa o cuantitativamente de forma automática el biomarcador, los datos obtenidos por dichos medios de acción automática pueden procesarse mediante, por ejemplo, un programa informático para facilitar la evaluación. Preferentemente, los medios están comprendidos por un único dispositivo en dicho caso. Dicho dispositivo puede incluir, en consecuencia, una unidad de análisis para el biomarcador y una unidad informática para procesar los datos resultantes para la evaluación. Son dispositivos preferidos los que pueden aplicarse sin el conocimiento particular de un especialista clínico, por ejemplo, dispositivos electrónicos que requieren únicamente carga con una muestra.

20 Como alternativa, los procedimientos para la determinación del al menos un biomarcador pueden implementarse en un sistema que comprende varios dispositivos que están, preferentemente, unidos operativamente entre sí. Específicamente, los medios deben ligarse de manera que permitan llevar a cabo el procedimiento de la presente invención como se ha descrito en detalle anteriormente. Por lo tanto, unido operativamente, como se utiliza en el presente documento, preferentemente, significa unido funcionalmente. Dependiendo del medio para usar para el sistema, dichos medios pueden ligarse funcionalmente conectando cada medio con el otro por medios que permiten el transporte de datos entre dichas medias, por ejemplo, cables de fibra de vidrio y otros cables para transporte de datos de alto rendimiento. No obstante, también se contempla la transferencia inalámbrica de datos entre los medios, por ejemplo, vía LAN (LAN inalámbrica, W-LAN). Un sistema preferido comprende medios para determinar biomarcadores. Los medios para determinar biomarcadores, como se utilizan en el presente documento, abarcan medios para separar biomarcadores, tales como dispositivos cromatográficos y medios para la determinación de metabolitos, tales como dispositivos de espectrometría de masas. Se han descrito dispositivos adecuados en detalle anteriormente. Los medios preferidos para separación de compuestos para usar en el sistema incluyen dispositivos cromatográficos, más preferentemente dispositivos para cromatografía líquida, CLAR y/o cromatografía de gases. Los dispositivos preferidos para la determinación de compuestos comprenden dispositivos de espectrometría de masas, más preferentemente, CG-EM, CL-EM, espectrometría de masas de infusión directa, TF-RCI-EM, EC-EM, CLAR-EM, espectrometría de masas de cuádrupolo, espectrometría de masas acoplada secuencialmente (incluyendo EM-EM o EM-EM-EM), PAI-EM, Py-EM o TDV. Los medios de separación y determinación están, preferentemente, acoplados entre sí. Lo más preferentemente, CL-EM y/o CG-EM se usan en el sistema como se describe en detalle en otra parte de la presente memoria descriptiva. Estarán comprendidos además medios para comparar y/o analizar los resultados obtenidos de los medios para la determinación de biomarcadores. Los medios para comparar y/o analizar los resultados pueden comprender al menos una base de datos y un programa informático implementado para la comparación de los resultados. También se describen en detalle posteriormente divulgaciones adicionales de los sistemas y dispositivos anteriormente mencionados.

45 Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a un dispositivo de diagnóstico que comprende:

- a) una unidad de análisis que comprende un detector para al menos un biomarcador como se enumera en una cualquiera de las Tablas 1a a c, 3, 4a a c o 6, en el que dicha unidad de análisis está adaptada para determinar la cantidad de dicho biomarcador detectada por el detector y, unida operativamente al mismo;
- 50 b) una unidad de evaluación que comprende un ordenador que comprende integrado de forma tangible un código de programa informático para llevar a cabo una comparación de la cantidad determinada del al menos un biomarcador y una cantidad de referencia y una base de datos que comprende dicha cantidad de referencia como para dicho biomarcador por lo que se diagnosticará si un sujeto padece insuficiencia cardíaca, necesita una terapia de insuficiencia cardíaca o se ha sometido a una terapia exitosa de insuficiencia cardíaca si el resultado de la comparación para el al menos un biomarcador es esencialmente idéntico al tipo de regulación y/o factor de regulación indicado para el al menos un biomarcador respectivo en una cualquiera de las Tablas 1a a c, 3, 4a a c o 6.

60 En una divulgación adicional, el dispositivo comprende una base de datos adicional que comprende el tipo de regulación y/o valores de factor de regulación indicados para el al menos un biomarcador respectivo en una cualquiera de las Tablas 1a a c, 3, 4a a c o 6 y un código de programa informático integrado de forma tangible adicional para llevar a cabo una comparación entre el tipo de regulación y/o los valores de factor de regulación determinados y los comprendidos en la base de datos.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere también a un dispositivo de diagnóstico que comprende:

- a) una unidad de análisis que comprende un detector para al menos un biomarcador como se enumera en una cualquiera de las Tablas 2 o 5, en el que dicha unidad de análisis está adaptada para determinar la cantidad de dicho biomarcador detectada por el detector y, unida operativamente al mismo;
- 5 b) una unidad de evaluación que comprende un ordenador que comprende integrado de forma tangible un código de programa informático para (i) calcular una relación del al menos un biomarcador de una segunda y una primera muestra y (ii) llevar a cabo una comparación de la relación determinada del al menos un biomarcador y una relación de referencia y una base de datos que comprende dicha relación de referencia para dicho biomarcador por lo que se diagnosticará si un sujeto padece insuficiencia cardíaca, necesita una terapia de insuficiencia cardíaca o se ha sometido a una terapia exitosa de insuficiencia cardíaca si el resultado de la comparación para el al menos un biomarcador es esencialmente idéntico al tipo de regulación y/o factor de regulación indicado para el al menos un biomarcador respectivo en una cualquiera de las Tablas 2 o 5.

En una divulgación preferida, el dispositivo comprende una base de datos adicional que comprende el tipo de regulación y/o valores de factor de regulación indicados para el al menos un biomarcador respectivo en una cualquiera de las Tablas 2 o 5 y un código de programa informático integrado de forma tangible adicional para llevar a cabo una comparación entre el tipo de regulación y/o los valores de factor de regulación determinados y los comprendidos en la base de datos.

Asimismo, la presente divulgación se refiere a una colección de datos que comprende valores característicos de al menos un biomarcador que son indicativos de una afección médica o efecto como se ha expuesto anteriormente (es decir, diagnosticar insuficiencia cardíaca en un sujeto, identificar si un sujeto necesita una terapia de insuficiencia cardíaca o determinar si una terapia de insuficiencia cardíaca tiene éxito).

La expresión "colección de datos" se refiere a una colección de datos que pueden estar agrupados entre sí física y/o lógicamente. En consecuencia, la colección de datos puede implementarse en un único medio de almacenamiento de datos o en medios de almacenamientos de datos separados físicamente que están unidos operativamente entre sí. Preferentemente, la colección de datos se implementa por medio de una base de datos. Por tanto, una base de datos, como se utiliza en el presente documento, comprende la colección de datos en un medio de almacenamiento adecuado. Por otra parte, la base de datos, preferentemente, comprende además un sistema de administración de base de datos. El sistema de administración de base de datos es, preferentemente, un sistema de administración de base de datos basado en red, jerárquico u orientado a objetos. Asimismo, la base de datos puede ser una base de datos federal o integrada. Más preferentemente, la base de datos se implementará como un sistema distribuido (federal), por ejemplo, como un sistema de cliente-servidor. Más preferentemente, la base de datos se estructura para permitir que un algoritmo de búsqueda compare un conjunto de datos de ensayo con los conjuntos de datos comprendidos en la colección de datos. Específicamente, usando dicho algoritmo, puede buscarse en la base de datos conjuntos de datos similares o idénticos que sean indicativos de una afección médica o un efecto como se ha expuesto anteriormente (por ejemplo, una búsqueda de consulta). Por tanto, si puede identificarse un conjunto de datos idéntico o similar en la colección de datos, el conjunto de datos de ensayo se asociará con la afección médica o el efecto. En consecuencia, puede usarse la información obtenida de la colección de datos, por ejemplo, como una referencia para los procedimientos de la presente invención descritos anteriormente. Más preferentemente, la colección de datos comprende valores característicos de todos los biomarcadores comprendidos en uno cualquiera de los grupos enumerados anteriormente.

A la vista de lo anterior, la presente divulgación abarca un medio de almacenamiento de datos que comprende la colección de datos anteriormente mencionada.

La expresión "medio de almacenamiento de datos", como se utiliza en el presente documento, abarca medios de almacenamiento de datos que están basados en entidades físicas individuales tales como un CD, un CD-ROM, un disco duro, medios de almacenamiento óptico o un disquete. Por otra parte, la expresión incluye además medios de almacenamiento de datos que consisten en entidades físicamente separadas que están unidas operativamente entre sí de tal manera que proporcionen la colección de datos anteriormente mencionada, preferentemente, de una manera adecuada para una búsqueda de consulta.

La presente divulgación se refiere también a un sistema que comprende:

- 50 (a) medios para comparar valores característicos del al menos un biomarcador de una muestra unido operativamente con
- (b) un medio de almacenamiento de datos como se ha descrito anteriormente.

El término "sistema", como se utiliza en el presente documento, se refiere a diferentes medios que están unidos operativamente entre sí. Dichos medios pueden implementarse en un único dispositivo o pueden ser dispositivos separados físicamente que están unidos operativamente entre sí. Los medios para comparar valores característicos de biomarcadores, preferentemente, se basan en un algoritmo para comparación como se ha mencionado anteriormente. El medio de almacenamiento de datos, preferentemente, comprende la colección de datos o base de datos anteriormente mencionada, en la que cada uno de los conjuntos de datos almacenados son indicativos de una

afección médica o un efecto a los que se ha hecho referencia anteriormente. Por tanto, el sistema permite identificar si un conjunto de datos de ensayo está comprendido en la colección de datos almacenada en el medio de almacenamiento de datos. En consecuencia, los procedimientos de la presente invención pueden ser implementados por el sistema.

5 En una divulgación preferida del sistema, están comprendidos medios para determinar los valores característicos de biomarcadores de una muestra. La expresión "medios para determinar los valores característicos de biomarcadores" se refiere preferentemente a los dispositivos anteriormente mencionados para la determinación de metabolitos tales como dispositivos de espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los biomarcadores.

10 Por otra parte, la presente divulgación se refiere a un medio de diagnóstico que comprende medios para la determinación de al menos un biomarcador seleccionado de uno cualquiera de los grupos a los que se ha hecho referencia anteriormente.

La expresión "medio de diagnóstico", preferentemente, se refiere a un dispositivo, sistema o ensayo biológico o químico de diagnóstico como se especifica en otra parte de la descripción en detalle.

15 La expresión "medios para la determinación de al menos un biomarcador" se refiere a dispositivos o agentes que son capaces de reconocer específicamente el biomarcador. Los dispositivos adecuados pueden ser dispositivos espectrométricos tales como espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los biomarcadores. Los agentes adecuados pueden ser compuestos que detectan específicamente los biomarcadores. La detección, como se utiliza en el presente documento, puede ser un
20 procedimiento de dos etapas, es decir, el compuesto puede unirse en primer lugar de forma específica con el biomarcador para detectar y generar posteriormente una señal detectable, por ejemplo, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales radiactivas y similares. Para la generación de la señal detectable, pueden ser necesarios compuestos adicionales que están todos comprendidos en la expresión "medios para la determinación del al menos un biomarcador". Se describen compuestos que se unen específicamente con el biomarcador en otra parte de la
25 memoria descriptiva en detalle y estos incluyen, preferentemente, enzimas, anticuerpos, ligandos, receptores u otras moléculas biológicas o productos químicos que se unen específicamente con los biomarcadores.

Asimismo, la presente divulgación se refiere a una composición de diagnóstico que comprende al menos un biomarcador seleccionado de uno cualquiera de los grupos a los que se ha hecho referencia anteriormente.

30 El al menos un biomarcador seleccionado de cualquiera de los grupos anteriormente mencionados actuará como un biomarcador, es decir, una molécula indicadora de una afección médica o un efecto en el sujeto como se expone en otra parte del presente documento. Por tanto, las moléculas biomarcadoras en sí mismas pueden actuar como composiciones de diagnóstico, preferentemente, tras la visualización o detección por los medios a los que se ha hecho referencia en el presente documento. Por tanto, una composición de diagnóstico que indica la presencia de un
35 biomarcador también puede comprender dicho biomarcador físicamente, por ejemplo, un complejo de un anticuerpo y el biomarcador para detectar puede actuar como la composición de diagnóstico. En consecuencia, la composición de diagnóstico puede comprender además medios para la detección de los metabolitos como se especifica en otra parte de la presente descripción. Como alternativa, si se usan medios de detección tales como técnicas basadas en EM o RMN, la especie molecular que actúa como un indicador de la condición de riesgo será el al menos un biomarcador comprendido en la muestra de ensayo para investigar. Por tanto, el al menos un biomarcador al que se hace referencia
40 de acuerdo con la presente invención actuará en sí mismo como una composición de diagnóstico debido a su identificación como un biomarcador.

En general, la presente divulgación contempla el uso de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores en una cualquiera de las Tablas 1a a c, 3, 4a a c o 6 en una muestra de un sujeto para diagnosticar insuficiencia
45 cardíaca y, preferentemente, el uso de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores en una cualquiera de las Tablas 4a a c o 6 en una muestra de un sujeto para diagnosticar insuficiencia cardíaca según la clase I de NYHA y el uso de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores en una cualquiera de las Tablas 1a a c o 3 en una muestra de un sujeto para diagnosticar insuficiencia cardíaca según la clase I, II y/o III de NYHA. En el caso de los biomarcadores enumerados en las Tablas 3 o 6, la muestra se habrá obtenido del sujeto con ejercicio. La presente divulgación contempla también el uso de al menos un biomarcador seleccionado de una cualquiera de las
50 Tablas 1a a 4a en una muestra de un sujeto para diagnosticar cardiomiopatía dilatada, el uso de al menos un biomarcador seleccionado de una cualquiera de las Tablas 1b o 4b en una muestra de un sujeto para diagnosticar cardiomiopatía isquémica y/o cardiomiopatía dilatada y el uso de al menos un biomarcador seleccionado de una cualquiera de las Tablas 1c o 4c en una muestra de un sujeto para diagnosticar cardiomiopatía hipertrófica y/o cardiomiopatía dilatada.

55 Por otra parte, la presente divulgación se refiere al uso, en general, de una relación de al menos un biomarcador seleccionado de una cualquiera de las Tablas 2 o 5 calculada a partir de una primera y una segunda muestra de un sujeto para diagnosticar la insuficiencia cardíaca. Preferentemente, insuficiencia cardíaca según la clase I de NYHA puede diagnosticarse mediante los biomarcadores de la Tabla 5, mientras que la insuficiencia cardíaca según la clase I, II y/o III de NYHA puede diagnosticarse mediante los biomarcadores de la Tabla 2. Se entenderá que la relación de

al menos un biomarcador se habrá calculado a partir de una primera y una segunda muestra obtenidas del sujeto en reposo y con ejercicio.

Ejemplos

5 La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos que no se pretende que restrinjan o limiten el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Diseño del estudio para CMD (cardiomiopatía dilatada) y preparación de muestras

10 Se incluyeron en el estudio 22 pacientes masculinos que padecían cardiomiopatía dilatada y 19 controles masculinos sanos. Las puntuaciones de la NYHA (Asociación Neoyorquina de Cardiología) de los pacientes variaron de 1 a 3 y la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) de 10 a 55 %. Los pacientes y controles se clasificaron por edad e IMC. Para todos los pacientes y controles, se extrajo una muestra de sangre antes (t0) o inmediatamente después (t1) del ensayo con ejercicio de ergoespirometría. Se obtuvo una tercera muestra de sangre una hora después del ensayo de ejercicio (t2). Se preparó plasma a partir de todas las muestras por centrifugación y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta que se realizaron mediciones. Se realizó ergoespirometría de la siguiente manera: Al principio, se aplicó una carga de 15 vatios que aumentó cada 2 minutos para 15 vatios adicionales. Para todos los pacientes, se determinó el volumen de respiración por minuto (VE), captación de oxígeno (VO₂), emisión de dióxido de carbono (VCO₂) así como la frecuencia de respiración. Una relación de respiración se calculó de la siguiente manera: $RQ = VCO_2 / VO_2$. Los equivalentes de respiración se calcularon para O₂ ($A\ddot{A}O_2 = VE / VO_2$), para CO₂ ($= VE / VCO_2$). También se calculó el volumen por respiración (AZV = VE/AF). Se abortó la ergoespirometría si el paciente estaba agotado, si se produjo arritmia cardíaca (por ejemplo, aleteo auricular, bloqueo de rutas de orden superior, aumento de extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular permanente), si pudieron determinarse señales de isquemia miocárdica clínicamente o por electrocardiografía o después de la aplicación de una carga de 285 vatios. La duración del ensayo de ergoespirometría varió entre 2 y 38 minutos.

15 Los pacientes con cardiomiopatía dilatada aparente se incluyeron si mostraban una FEVI de < 55 % y síntomas según NYHA I a III. Se excluyeron los pacientes de NYHA IV así como pacientes que padecían apoplejía, pacientes que habían tenido de miocardio en los últimos 4 meses antes del ensayo, pacientes con medicamentos alterados en las últimas 4 semanas antes del ensayo así como pacientes que padecieron enfermedades inflamatorias agudas o crónicas y tumores malignos.

Ejemplo 2: Diseño de estudio para la diferenciación de subtipos de ICC CMD (cardiomiopatía dilatada), CMI (cardiomiopatía isquémica) y CMH (cardiomiopatía hipertrófica) de controles sanos

20 El estudio comprendía 81 pacientes hombres y mujeres con CMD, 81 hombres y mujeres con CMI y 80 hombres y mujeres con CMH y además se incluyeron 83 controles sanos hombres y mujeres en un intervalo de edad de 35-75 y un intervalo de IMC de 20-35 kg/m². Las puntuaciones de NYHA (Asociación Neoyorquina de Cardiología) de los pacientes variaron de 1 a 3. Los pacientes y controles se clasificaron por edad, sexo e IMC. Para todos los pacientes y controles, se recogió una muestra de sangre. Se preparó plasma por centrifugación y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta que se realizaron mediciones.

25 Se definieron tres subgrupos de ICC (CMD, CMI y CMH) basándose en los criterios de ecocardiografía y hemodinámica:

- 30 a) Subgrupo CMD: se define hemodinámicamente como una insuficiencia de bombeo sistólico con cardiomegalia (aumento ecocardiográfico del diámetro telediastólico ventricular izquierdo >55 y una fracción de eyección ventricular izquierda restringida - FEVI de <50 %).
- 35 b) Subgrupo CMI: se define hemodinámicamente como una insuficiencia de bombeo sistólico debido a una insuficiencia coronaria (>50 % de estenosis coronaria y una insuficiencia de movimiento del endocardio inducible por tensión así como una FEVI de <50 %)
- 40 c) Subgrupo CMH: hipertrofia cardíaca concéntrica (ecocardiografía - septo >11 mm, pared miocárdica posterior >11 mm) y con una ICC diastólica (función de bombeo no alterada o levemente alterada con FEVI ≥50 %).

45 Se excluyeron los pacientes de NYHA IV así como pacientes que padecían apoplejía, pacientes que habían tenido de miocardio en los últimos 4 meses antes del ensayo, pacientes con medicamentos alterados en las últimas 4 semanas antes del ensayo así como pacientes que padecieron enfermedades inflamatorias agudas o crónicas y tumores malignos.

50 **Ejemplo 3:** Determinación de metabolitos

Se prepararon muestras de plasma humano y se sometieron a análisis de CL-EM/EM y CG-EM o EFS-CL-EM/EM (hormonas) como se describe a continuación:

Las proteínas se separaron por precipitación de plasma sanguíneo. Después de la adición de agua y una mezcla de etanol y diclorometano, la muestra restante se fraccionó en una fase polar, acuosa y una fase lipófila, orgánica.

55 Para la transmetanolisis de los extractos lipídicos se añadió una mezcla de 140 µl de cloroformo, 37 µl de ácido

clorhídrico (37 % en peso de HCl en agua), 320 µl de metanol y 20 µl de tolueno al extracto evaporado. El vaso se precintó estrechamente y se calentó durante 2 horas a 100 °C, con agitación. La solución se evaporó posteriormente hasta su sequedad. El residuo se secó completamente.

5 La metoximación de los grupos carbonilo se llevó a cabo mediante reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 100 µl durante 1,5 horas a 60 °C) en un vaso precintado estrechamente. Se añadieron 20 µl de ácidos grasos impares, de cadena sencilla (solución de 0,3 mg/ml cada uno de ácidos grasos de 7 a 25 átomos de carbono y 0,6 mg/ml cada uno de ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) piridina/tolueno) como patrones temporales. Por último, la derivatización con 100 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) se llevó a cabo durante 30 minutos a 60 °C, de nuevo en el vaso precintado estrechamente. El volumen final antes de la inyección en la CG fue de 220 µl.

15 Para la fase polar la derivatización se realizó de la siguiente manera: La metoximación de los grupos carbonilo se llevó a cabo mediante reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 50 µl durante 1,5 horas a 60 °C) en un vaso precintado estrechamente. Se añadieron 10 µl de ácidos grasos impares, de cadena sencilla (solución de 0,3 mg/ml cada uno de ácidos grasos de 7 a 25 átomos de carbono y 0,6 mg/ml cada uno de ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) piridina/tolueno) como patrones temporales. Por último, la derivatización con 50 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) se llevó a cabo durante 30 minutos a 60 °C, de nuevo en el vaso precintado estrechamente. El volumen final antes de la inyección en la CG fue de 110 µl.

Los sistemas de CG-EM consisten en una CG Agilent 6890 acoplada a un Agilent 5973 MSD. Los inyectores automáticos son CompiPal o GCPal de CTC.

20 Para el análisis se usaron columnas de separación capilar comerciales habituales (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) con diferentes fases estacionarias de poli-metil-siloxano que contenían de 0 % hasta 35 % de restos aromáticos, dependiendo de los materiales de muestra analizados y fracciones de la etapa de separación de fases (por ejemplo: DB-1ms, HP-5ms, DB-XLB, DB-35ms, Agilent Technologies). Se inyectó hasta 1 µl del volumen final sin división y el programa de temperatura del horno se inició a 70 °C y terminó a 340 °C con diferentes velocidades de calentamiento dependiendo del material de muestra y la fracción de la etapa de separación de fases para conseguir una separación cromatográfica y un número de exploraciones en cada máximo de analito suficientes. Asimismo, se usó RTL (Retention Time Locking, Agilent Technologies) para el análisis y condiciones convencionales de CG-EM habituales, por ejemplo flujo constante con 1 a 1,7 ml/min nominal y helio como el gas de fase móvil, se realizó ionización por impacto electrónico con 70 eV, exploración en un intervalo de m/z de 15 a 600 con velocidades de exploración de 2,5 a 3 exploraciones/s y condiciones de ajuste convencionales.

35 Los sistemas de CLAR-EM consistieron en un sistema de CL Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado con un espectrómetro de masas API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Canadá). Se realizó análisis de CLAR en columnas de separación de fase invertida disponibles en el mercado con fases estacionarias C18 (por ejemplo: GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18). Se inyectaron hasta 10 µl del volumen de muestra final de fase polar y lipófila evaporada y reconstituida y se realizó separación con elución en gradiente usando gradientes de metanol/agua/ácido fórmico o acetonitrilo/agua/ácido fórmico a un caudal de 200 µl/min.

Se llevó a cabo espectrometría de masas mediante ionización por electropulverización en modo positivo para la fracción polar y en modo negativo para la fracción polar usando el modo de supervisión de reacción múltiple (MRM) y exploración completa de 100 - 1000 uma.

40 Se midieron esteroides y sus metabolitos mediante EFS-CL-EM (extracción de fase sólida-CL-EM) en línea. Se midieron catecolaminas y sus metabolitos mediante EFS-CL-EM en línea como se describe en Yamada y col. (J. Anal.Toxicol. (26), 2002, 17-22). Tanto para catecolaminas y metabolitos relacionados como para esteroides y metabolitos relacionados, se realizó cuantificación por medio de patrones marcados con isótopos estables y se calcularon las concentraciones absolutas.

45 Análisis de lípidos complejos en muestras de plasma:

Se extrajeron lípidos totales del plasma mediante extracción de líquido/líquido usando cloroformo/metanol.

Los extractos lipídicos se fraccionaron posteriormente mediante cromatografía líquida de fase normal (CLFN) en once grupos lipídicos diferentes según Christie (Journal of Lipid Research (26), 1985, 507-512).

50 Las fracciones se analizaron mediante CL-EM/EM usando ionización por electropulverización (IEP) e ionización química por presión atmosférica (IQPA) con detección de transiciones específicas de supervisión de reacción múltiple (SRM) para ésteres de colesterol (EC), esfingomielinas (EM) y ceramidas (CER) respectivamente. Se analizaron esfingosinas y esfingosina-1-fosfatos (EF) mediante CE-EM/EM usando ionización por electropulverización (IEP) con detección de transiciones específicas de supervisión de reacción múltiple (SRM) como se describe en Schmidt H y col., Prostaglandins & other Lipid Mediators 81(2006), 162-170. Los metabolitos en las tablas 1a, 1b, 1c, 4a, 4b y 4c, procedentes de una de estas fracciones incluyen la abreviatura respectiva en su nombre.

Se midieron eicosanoides y relacionados de plasma mediante EFS-CL-EM/EM (extracción de fase sólida-CL-EM/EM)

en línea y fuera de línea (Masoodi M y Nicolaou A: Rapid Commun Mass Spectrom. 2006; 20(20): 3023-3029. Se realizó cuantificación absoluta por medio de patrones marcados con isótopos estables.

Ejemplo 4: Análisis de datos y evaluación estadística

5 Se analizaron muestras de plasma en un diseño de secuencia analítica aleatorio con muestras agrupadas (denominadas "grupo") generadas a partir de alícuotas de cada muestra. Después de etapas de validación analítica exhaustivas, los datos máximos sin tratar para cada analito se normalizaron con respecto a la mediana del grupo por cada secuencia analítica para compensar la variabilidad del procedimiento (denominado "relaciones normalizadas con respecto a grupo"). Si estaban disponibles, las concentraciones absolutas de metabolitos se usaron para análisis estadístico. En todos los otros casos, se usaron relaciones normalizadas con respecto a grupo. Todos los datos se transformaron con log10 para conseguir una distribución normal.

15 Para el estudio descrito en el Ejemplo 1, se diseñó un modelo de efectos mixtos que contenía los factores edad (numérico), IMC (numérico), diagnóstico (ICC, control - referencia: control), punto temporal (categórico - t0, t1, t2 - referencia: t0, antes del ejercicio) y punto temporal de interacción: diagnóstico. Todos los factores excepto para el diagnóstico fueron opcionales, incluyéndose solamente si contribuían de forma positiva a la calidad del modelo. El probando (cada paciente o control sano) se trató como un factor aleatorio. La significación estadística se leyó a partir de los valores de p de estadísticos t. Se obtuvieron la dirección y fuerza de regulación mediante el cálculo de relaciones de valores de mediana para los grupos para comparar. El tipo de regulación se determinó para cada metabolito como "positiva" para aumento (relaciones >1) en el grupo respectivo (ICC) frente a la referencia (controles sanos) y "negativa" para reducción (relaciones <1) frente a la referencia.

20 Para identificar biomarcadores de la insuficiencia cardíaca, se consideró la lectura para el diagnóstico en el punto temporal t0 antes del ejercicio (tabla 1). Para leer los efectos de diagnóstico en los puntos temporales t1 y t2, se calcularon modelos adicionales con la referencia para el factor punto temporal ajustada a t1 o t2, respectivamente. Para encontrar biomarcadores de insuficiencia cardíaca en pacientes que se someten a ensayo de ejercicio, se analizaron dos lecturas diferentes del modelo de efectos mixtos. En primer lugar, se filtraron listas de metabolitos según la significación del factor diagnóstico en t1 pero no en t0 (véase tabla 3). Como alternativa, los valores de p para la interacción punto temporal:diagnóstico se leyeron en el punto temporal t1 (punto temporal de referencia t0) (véase tabla 2).

30 Se calcularon modelos de efectos mixtos adicionales para identificar metabolitos indicativos de insuficiencia cardíaca leve (puntuación de NYHA I). Para este fin, los modelos mencionados anteriormente se modificaron para contener una puntuación de NYHA de factor fijo (categórico, control sano de referencia) en lugar de diagnóstico (ICC, control - referencia: control). Como indicadores de significación, los valores de p del estadístico t para la puntuación de NYHA se leyeron en el nivel de NYHA 1 (tablas 4a a c). Para encontrar biomarcadores de insuficiencia cardíaca leve (puntuación 1 de NYHA) en pacientes que se sometieron a ensayo de ejercicio, se analizaron dos lecturas diferentes del modelo de efectos mixtos. En primer lugar, las listas de metabolitos se filtraron según la significación del factor puntuación de NYHA en el nivel de NYHA 1, en t1 pero no en t0 (véase tabla 6). En segundo lugar, los valores de p para la interacción de punto temporal:puntuación de NYHA se leyeron en el nivel de puntuación de NYHA 1, punto temporal t1 (punto temporal de referencia t0) (véase tabla 5).

40 El estudio descrito en el Ejemplo 2 se analizó mediante un modelo de ANOVA que comprendía los factores edad, IMC, sexo (incluyendo todas las interacciones binarias), grupo de diagnóstico y tiempo de almacenamiento (opcional). Los niveles para el factor grupo de diagnóstico fueron subtipo de ICC (CMD, CMI, CMH, control - referencia: control). Para identificar un perfil metabólico de CMD de estadio temprano, el análisis se restringió a pacientes de NYHA I (tablas de resultado 4a a c). En este caso, los niveles para el factor de grupo de diagnóstico fueron CMD NYHA I, CMD NYHA II-IN, CMI NYHA I, CMI NYHA II-III, CMH NYHA I, CMH NYHA II-III y control (establecido como referencia).

45 En las tablas 1-6, la relación de mediana indica fuerza y dirección de regulación. La relación de mediana se calculó dividiendo la mediana del nivel de metabolito en el grupo de ICC por la mediana del nivel de metabolito en el grupo de control sano. Para las tablas 2 y 5, los datos normalizados con respecto a t0 (nivel de metabolitos en el punto temporal t1 dividido por el nivel de metabolitos en el punto temporal t0) se usaron para el cálculo.

50 Los resultados de los análisis se resumen en las siguientes tablas, a continuación. Los biomarcadores para determinar de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación se enumeran en las siguientes tablas. Se caracterizan adicionalmente biomarcadores no definidos con precisión por su nombre en la tabla 7.

Tabla 1a: Metabolitos con una diferencia significativa (valor de p < 0,05) entre pacientes con ICC (cardiomiopatía dilatada) y controles sanos

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Lisofosfatidilcolina (C18:2)	0,656	negativa	0,000002
Manosa	1,949	positiva	0,000000
Hipoxantina	2,136	positiva	0,000006

ES 2 728 120 T3

Fitoesfingosina	0,779	negativa	0,000010
Ácido lignocérico (C24:0)	0,654	negativa	0,000029
Glutamato	2,027	positiva	0,000037
2-Hidroxi butirato	1,724	positiva	0,000132
Lisofosfatidilcolina (C18:0)	0,820	negativa	0,000213
Ácido behénico (C22:0)	0,744	negativa	0,000224
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,708	negativa	0,000237
Fosfatidilcolina (C18:0, C18:2)	1,028	positiva	0,000248
Ácido linoleico (C18:cis[9,12]2)	0,733	negativa	0,000270
Pseudouridina	1,299	positiva	0,000321
Fosfato, fracción lipídica	0,817	negativa	0,000333
Lisofosfatidilcolina (C18:1)	0,874	negativa	0,000432
Lisofosfatidilcolina (C17:0)	0,770	negativa	0,000612
eritro-esfingosina (*1)	0,823	negativa	0,000620
Glicerol fosfato, fracción lipídica	0,768	negativa	0,000628
5-O-Metilesfingosina (*1)	0,802	negativa	0,000766
Galactosa, fracción lipídica	0,775	negativa	0,000846
Colesterol	0,855	negativa	0,000921
alfa-cetoglutarato	1,235	positiva	0,000944
Histidina	0,790	negativa	0,000945
Ácido eicosanoico (C20:0)	0,835	negativa	0,001148
3-O-Metilesfingosina (*1)	0,769	negativa	0,001248
eritro-C16-esfingosina	0,827	negativa	0,001492
Ácido úrico	1,429	positiva	0,001696
Colesterol N.º 02	0,821	negativa	0,004244
Urea	1,243	positiva	0,005073
Adrenalina (Epinefrina)	1,926	positiva	0,006118
Aspartato	1,120	positiva	0,006265
Normetanefrina	1,262	positiva	0,006469
Pentadecanol	0,583	negativa	0,006875
mio-inositol, fracción lipídica	0,775	negativa	0,007379
Sulfato de deshidroepiandrosterona	0,594	negativa	0,007754
Fosfatidilcolina (C16:1, C18:2)	0,883	negativa	0,008776
Esfingomielina (d18:1, C24:0)	0,943	negativa	0,011533
Treonina	0,855	negativa	0,012287
mio-inositol-2-fosfato, fracción lipídica (fosfolípidos de mio-inositol)	0,635	negativa	0,012637
Ácido mirístico (C14:0)	0,572	negativa	0,015030
Ácido homovainílico (HVA)	1,292	positiva	0,015937
Arginina	0,844	negativa	0,016192
Glutamina	0,850	negativa	0,016336
Ácido eláidico (C18:trans[9]1)	1,267	positiva	0,017410
4-Hidroxi-3-metoxifenilglicol (HMPG)	1,128	positiva	0,019069
Cistina	1,105	positiva	0,020208
Ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico	1,179	positiva	0,020480
Zeaxantina	0,699	negativa	0,021888
Glucosa	1,215	positiva	0,023219
Ácido esteárico (C18:0)	0,918	negativa	0,023703
Cortisol	1,345	positiva	0,025615
3-Metoxitirosina	1,209	positiva	0,026958
Ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA)	1,255	positiva	0,027467
Lisofosfatidilcolina (C20:4)	0,944	negativa	0,029167

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Creatinina	1,208	positiva	0,031253
Ácido heptadecanoico (C17:0)	0,828	negativa	0,032349
Prolina	0,818	negativa	0,033617
Eritrol	1,224	positiva	0,035087
Ácido nervónico (C24:cis[15]1)	0,879	negativa	0,035240
Coenzima Q10	1,060	positiva	0,036613
Coenzima Q9	0,774	negativa	0,040228

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Fosfatidilcolina (C18:0, C18:1)	0,966	negativa	0,044253
Criptoxantina	0,464	negativa	0,047617
1,5-Anhidrosorbitol	0,808	negativa	0,047807
SM_ esfingomielina (d17:1,C24:0)	0,7142	negativa	2,8E-13
SM_ esfingomielina (d17:1,C22:0)	0,7423	negativa	9,8E-12
SM_ esfingomielina (d17:1,C23:0)	0,6392	negativa	1,4E-11
CE_Colesteriléster C15:0	0,6745	negativa	8,8E-11
Colesteriléster C18:2	0,7013	negativa	2,1E-10
SM_ esfingomielina (d16:1,C23:0)	0,7103	negativa	2,7E-10
Isocitrato	1,2983	positiva	4,6E-10
1-Hidroxi-2-amino-(cis,trans)-3,5-octadecadieno (de esfingolípidos)	0,738	negativa	1,2E-09
Noradrenalina (Norepinefrina)	1,5067	positiva	4,9E-09
SM_ esfingomielina (d16:1,C22:0)	0,7499	negativa	8,7E-09
SM_ esfingomielina (d16:1,C24:0)	0,6773	negativa	1,1E-08
Maltosa	1,8136	positiva	1,9E-08
SM_ esfingomielina (d18:2,C23:0)	0,8134	negativa	2,7E-08
SM_ esfingomielina (d17:1,C20:0)	0,7884	negativa	3E-08
SM_ esfingomielina (d17:1,C16:0)	0,8169	negativa	1,6E-07
SM_ esfingomielina (d18:1,C14:0)	0,8274	negativa	2,5E-07
CE_Colesteriléster C14:0	0,7641	negativa	5,2E-07
Esfingomielina (d18:1,C23:0)	0,8793	negativa	6,2E-07
CER_Ceramida (d17:1,C24:0)	0,7452	negativa	1,7E-06
SM_ esfingomielina (d18:2,C24:0)	0,834	negativa	2,3E-06
Uridina	0,7617	negativa	3,4E-06
CER_Ceramida (d18:2,C14:0)	0,7732	negativa	6,9E-06
CER_Ceramida (d17:1,C23:0)	0,7443	negativa	9E-06
SM_ esfingomielina (d16:1,C20:0)	0,8091	negativa	1E-05
SM_ esfingomielina (d17:1,C24:1)	0,8482	negativa	2,2E-05
SM_ esfingomielina (d17:1,C18:0)	0,8393	negativa	3E-05
CE_Colesteriléster C22:6	0,7561	negativa	3,3E-05
SM_ esfingomielina (d16:1,C22:1)	0,8034	negativa	3,6E-05
mio-inositol	1,16	positiva	4,6E-05
CER_Ceramida (d16:1,C24:0)	0,762	negativa	6,7E-05
beta-Caroteno	0,7066	negativa	8,1E-05
SM_ esfingomielina (d16:1,C24:1)	0,8446	negativa	0,00011
Ornitina	1,1516	positiva	0,00012
SM_ esfingomielina (d18:2,C22:0)	0,8501	negativa	0,00013
Colesta-2,4,6-trieno	0,8494	negativa	0,00016
TAG (C16:0,C18:2)	1,3317	positiva	0,00017
CE_Colesteriléster C16:2	0,7746	negativa	0,00017
CE_Colesteriléster C20:5	0,7085	negativa	0,00018
Sorbitol	1,5523	positiva	0,00019
SM_ esfingomielina (d18:2,C23:1)	0,8561	negativa	0,00021
Ácido isopalmitico (C16:0)	0,7684	negativa	0,00022
Sarcosina	1,1039	positiva	0,00024
Fosfatidilcolina (C18:2,C20:4)	0,9367	negativa	0,00025
CER_Ceramida (d18:1,C14:0)	0,8316	negativa	0,00026
SM_ esfingomielina (d16:1,C18:1)	0,8335	negativa	0,00031
Esfingosina-1-fosfato (d17:1)	0,8268	negativa	0,00032
TAG (C16:0,C18:1,C18:2)	1,4134	positiva	0,00034
SM_ esfingomielina (d16:1,C21:0)	0,8077	negativa	0,00038
CER_Ceramida (d16:1,C23:0)	0,7763	negativa	0,00038
Ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	0,7778	negativa	0,00044
TAG (C18:1,C18:2)	1,3426	positiva	0,00053
Tirosina	1,1292	positiva	0,00057
Testosterona	0,7956	negativa	0,00059
treo-esfingosina (*1)	0,8766	negativa	0,00078
Fenilalanina	1,0929	positiva	0,00081

ES 2 728 120 T3

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
CE_Colesteriléster C14:1	0,68	negativa	0,00082
Colesta-2,4-dieno	0,8533	negativa	0,00096
SM_esfingomielina (d16:1,C16:0)	0,8766	negativa	0,00114
Malato	1,1907	positiva	0,00116
SM_esfingomielina (d18:1,C22:0)	0,8379	negativa	0,00119
CE_Colesteriléster C16:3	0,7918	negativa	0,00122
5-Oxoprolina	1,0814	positiva	0,00123
CE_Colesteriléster C22:5	0,8603	negativa	0,00125
SM_esfingomielina (d18:1,C23:1)	0,8878	negativa	0,00132
Ácido docosapentaenoico (C22:cis[7,10,13,16,19]5)	0,8085	negativa	0,00165
CER_Ceramida (d17:1,C16:0)	0,8577	negativa	0,00176
Taurina	1,1928	positiva	0,00178
Fosfatidilcolina (C16:0,C20:5)	0,9159	negativa	0,00195
SM_esfingomielina (d18:2,C14:0)	0,871	negativa	0,00207
Colesteriléster C18:1	0,8256	negativa	0,00219
CER_Ceramida (d17:1,C22:0)	0,8324	negativa	0,00247
CE_Colesteriléster C18:3	0,7933	negativa	0,00311
CER_Ceramida (d18:1,C18:0)	1,1562	positiva	0,00456
SM_esfingomielina (d18:2,C21:0)	0,8893	negativa	0,00466
CE_Colesteriléster C18:4	0,7197	negativa	0,00569
SM_esfingomielina (d16:1,C18:0)	0,8762	negativa	0,0057
Glicerol-3-fosfato, fracción polar	1,159	positiva	0,00613
Colesteriléster C16:0	0,8225	negativa	0,00685
Ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5)	0,7853	negativa	0,00809
CE_Colesteriléster C12:0	0,7224	negativa	0,00887
trans-4-Hidroxiprolina	1,2178	positiva	0,0089
SM_esfingomielina (d18:1,C21:0)	0,9157	negativa	0,00945
CER_Ceramida (d18:2,C23:0)	0,869	negativa	0,00948
TAG (C16:0,C16:1)	1,2811	positiva	0,01131
Glicerol, fracción lipídica	1,2809	positiva	0,01216
CER_Ceramida (d16:1,C16:0)	0,8776	negativa	0,0122
Cisteína	1,0714	positiva	0,01409
Fosfatidilcolina (C16:0,C20:4)	0,991	negativa	0,01571
Ácido 8-hidroxi-eicosatetraenoico (C20:trans[5]cis[9,11,14]4) (8-HETE)	1,2207	positiva	0,01617
Ácido hipúrico	0,7043	negativa	0,01627
Esfingosina (d18:1)	1,264	positiva	0,01632
SM_esfingomielina (d18:2,C18:1)	0,9068	negativa	0,01633
Hexadecanol	1,1092	positiva	0,01765
Ácido 14-metilhexadecanoico	0,8393	negativa	0,01844
CER_Ceramida (d16:1,C22:0)	0,8608	negativa	0,02052
CER_Ceramida (d18:2,C24:0)	0,8903	negativa	0,02079
SM_esfingomielina (d18:2,C24:2)	0,9157	negativa	0,02116
Creatina	1,1628	positiva	0,02211
Ácido eicosenoico (C20:cis[11]1)	1,1674	positiva	0,02337
Ácido 14,15-dihidroxi-eicosatrienoico (C20:cis[5,8,11]3)	1,1603	positiva	0,0238
Esfinganina (d18:0)	1,2016	positiva	0,02412
CER_Ceramida (d18:1,C23:0)	0,8973	negativa	0,02646
CER_Ceramida (d17:1,C20:0)	0,876	negativa	0,02705
CER_Ceramida (d18:1,C24:0)	0,8982	negativa	0,02746
Fumarato	1,051	positiva	0,03023
SM_esfingomielina (d18:2,C20:0)	0,9289	negativa	0,03273
Ácido linoleico conjugado (C18:trans[9,11]2)	0,8624	negativa	0,03361
Ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE) (C18:cis[9]trans[11]2)	1,1549	positiva	0,03371
Campesterol	0,8211	negativa	0,03589
3,4-Dihidroxi-fenilalanina (DOPA)	1,0983	positiva	0,03675
TAG (C18:2,C18:2)	1,2038	positiva	0,03696
Fosfatidilcolina N.º 02	0,9467	negativa	0,03922

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Glucosa-1-fosfato	1,089	positiva	0,03978
CER_Ceramida (d17:1,C24:1)	0,8986	negativa	0,04172
Lactaldehído	1,0876	positiva	0,04225
Metionina	1,0698	positiva	0,04311
Lisofosfatidiletanolamina (C22:5)	0,9229	negativa	0,04472
scillo-inositol	1,1685	positiva	0,04903
CER_Ceramida (d16:1,C21:0)	0,8656	negativa	0,04997
(*1): libre y de esfingolípidos			

Tabla 1b: Metabolitos de la tabla 1a que mostraron adicionalmente una diferencia significativa (valor de p < 0.1) entre pacientes con CMI y controles sanos

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Colesteriléster C18:2	0,6066	negativa	3,17E-17
SM_esfingomielina (d18:1,C14:0)	0,7751	negativa	3,88E-11
SM_esfingomielina (d18:2,C23:0)	0,7837	negativa	3,14E-10
SM_esfingomielina (d17:1,C23:0)	0,661	negativa	1,21E-09
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,7527	negativa	2,78E-09
CE_Colesteriléster C15:0	0,6948	negativa	5,44E-09
SM_esfingomielina (d17:1,C24:0)	0,7656	negativa	1,24E-08
1-Hidroxi-2-amino-(cis,trans)-3,5-octadecadieno (de esfingolípidos)	0,7463	negativa	1,33E-08
Sorbitol	1,9715	positiva	3,76E-08
SM_esfingomielina (d17:1,C16:0)	0,8059	negativa	6,53E-08
SM_esfingomielina (d16:1,C23:0)	0,7416	negativa	7,29E-08
beta-Caroteno	0,6178	negativa	1,71E-07
Glutamato	1,4858	positiva	2,7E-07
CE_Colesteriléster C14:0	0,7622	negativa	2,73E-07
SM_esfingomielina (d18:2,C23:1)	0,8017	negativa	4,36E-07
Colesteriléster C18:1	0,7308	negativa	4,92E-07
SM_esfingomielina (d18:2,C24:0)	0,82	negativa	6,35E-07
SM_esfingomielina (d17:1,C22:0)	0,8018	negativa	6,9E-07
SM_esfingomielina (d18:2,C24:2)	0,82	negativa	7,56E-07
Ácido lignocérico (C24:0)	0,7793	negativa	8,82E-07
TAG (C16:0,C18:2)	1,4494	positiva	9,3E-07
treo-esfingosina (*1)	0,8271	negativa	1,11E-06
SM_esfingomielina (d16:1,C24:0)	0,7192	negativa	2,4E-06
Esfingomielina (d18:1,C23:0)	0,8821	negativa	2,52E-06
Fosfatidilcolina (C16:0,C20:4)	0,9828	negativa	2,97E-06
Lisofosfatidilcolina (C17:0)	0,8091	negativa	3,34E-06
Colesterol, total	0,8639	negativa	3,68E-06
SP_Esfingosina-1-fosfato (d17:1)	0,7871	negativa	4,86E-06
TAG (C16:0,C18:1,C18:2)	1,5361	positiva	7,11E-06
Glucosa	1,1273	positiva	8,77E-06
SM_esfingomielina (d17:1,C24:1)	0,8464	negativa	1,25E-05
TAG (C18:1,C18:2)	1,439	positiva	1,53E-05
Isocitrato	1,2014	positiva	1,7E-05
Fosfatidilcolina (C18:0,C18:2)	1,0183	positiva	2,19E-05
Zeaxantina	0,7372	negativa	2,46E-05
CER_Ceramida (d18:1,C18:0)	1,2527	positiva	2,54E-05
Cisteína	1,1313	positiva	2,62E-05
SM_esfingomielina (d18:1,C23:1)	0,8504	negativa	2,65E-05

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Ácido behénico (C22:0)	0,839	negativa	2,7E-05
Maltosa	1,5712	positiva	2,99E-05
Ácido úrico	1,1916	positiva	2,99E-05
eritro-C16-esfingosina	0,7823	negativa	3,62E-05

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
SM_ esfingomielina (d18:2,C14:0)	0,8257	negativa	4,08E-05
Colesta-2,4-dieno	0,8257	negativa	5,49E-05
Glucosa-1-fosfato	1,1806	positiva	5,61E-05
5-O-Metilesfingosina (*1)	0,827	negativa	6,28E-05
Glicerol, fracción lipídica	1,4758	positiva	7E-05
Pseudouridina	1,1483	positiva	7,79E-05
TAG (C16:0,C16:1)	1,4548	positiva	0,000109
SM_ esfingomielina (d18:2,C22:0)	0,8469	negativa	0,00015
Colesta-2,4,6-trieno	0,8518	negativa	0,000167
SM_ esfingomielina (d16:1,C22:0)	0,8256	negativa	0,00017
SM_ esfingomielina (d16:1,C24:1)	0,845	negativa	0,000187
eritro-esfingosina (*1)	0,8619	negativa	0,000211
Cistina	1,2256	positiva	0,00026
Ácido linoleico (C18:cis[9,12]2)	0,8234	negativa	0,000276
3-O-Metilesfingosina (*1)	0,839	negativa	0,000315
Taurina	1,2195	positiva	0,000362
CER_Ceramida (d18:1,C14:0)	0,8309	negativa	0,000397
Sulfato de deshidroepiandrosterona	0,6197	negativa	0,000427
Lisofosfatidilcolina (C18:2)	0,8578	negativa	0,000485
Ácido 14,15-dihidroxi-eicosatrienoico (C20:cis[5,8,11]3)	1,2659	positiva	0,000573
CER_Ceramida (d17:1,C23:0)	0,7911	negativa	0,000631
TAG (C18:2,C18:2)	1,3485	positiva	0,000677
SM_ esfingomielina (d16:1,C16:0)	0,8677	negativa	0,000709
Eritrol	1,1759	positiva	0,000711
CE_Colesteriléster C12:0	0,6467	negativa	0,000734
SM_ esfingomielina (d16:1,C22:1)	0,8327	negativa	0,000787
Fitoesfingosina, total	0,8621	negativa	0,000895
alfa-cetoglutarato	1,1818	positiva	0,000916
Ácido 8-hidroxi-eicosatetraenoico (C20:trans[5]cis [9,11,14]4) (8-HETE)	1,3254	positiva	0,001168
CER_Ceramida (d17:1,C24:0)	0,8152	negativa	0,001205
Colesteriléster C16:0	0,788	negativa	0,00143
CE_Colesteriléster C14:1	0,7029	negativa	0,001854
SM_ esfingomielina (d18:1,C22:0)	0,8429	negativa	0,002434
SM_ esfingomielina (d18:2,C21:0)	0,8781	negativa	0,002466
Ácido eicosenoico (C20:cis[11]1)	1,2263	positiva	0,002476
Sarcosina	1,0878	positiva	0,002491
Adrenalina (Epinefrina)	1,4435	positiva	0,002549
Galactosa, fracción lipídica	0,8964	negativa	0,002702
SM_ esfingomielina (d17:1,C20:0)	0,8783	negativa	0,002949
Isoleucina	1,1085	positiva	0,00385
Ácido isopalmítico (C16:0)	0,8172	negativa	0,003877
CER_Ceramida (d18:2,C14:0)	0,8446	negativa	0,004044
CE_Colesteriléster C16:2	0,8272	negativa	0,004416
Normetanefrina	1,2896	positiva	0,004728
trans-4-Hidroxi-prolina	1,2407	positiva	0,005701
Ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico	1,6034	positiva	0,005745
Manosa	1,1511	positiva	0,006205
CE_Colesteriléster C22:5	0,8782	negativa	0,006918
5-Oxoprolina	1,0658	positiva	0,007306
mio-inositol	1,1023	positiva	0,009187
CE_Colesteriléster C22:6	0,8366	negativa	0,009822
SM_ esfingomielina (d16:1,C21:0)	0,8596	negativa	0,010056
CER_Ceramida (d16:1,C23:0)	0,8277	negativa	0,010099
Lisofosfatidilcolina (C18:0)	0,9017	negativa	0,011903
Ornitina	1,0943	positiva	0,012027
Noradrenalina (Norepinefrina)	1,194	positiva	0,01265
SM_ esfingomielina (d16:1,C18:1)	0,8798	negativa	0,013795
3-Metoxitirosina	1,1696	positiva	0,016194

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Colesterol N.º 02	0,9013	negativa	0,016563
CE_Colesteriléster C18:3	0,8332	negativa	0,01764
CER_Ceramida (d16:1,C24:0)	0,8487	negativa	0,019382
Esfingomielina (d18:1,C24:0)	0,9423	negativa	0,020541
Testosterona	0,8537	negativa	0,020931
Ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA)	1,1514	positiva	0,021745
CER_Ceramida (d18:2,C23:0)	0,8822	negativa	0,025435
SM_esfingomielina (d18:1,C21:0)	0,925	negativa	0,026263
Ácido nervónico (C24:cis[15]1)	0,9114	negativa	0,026336
Fenilalanina	1,0625	positiva	0,0265
Fosfatidilcolina (C16:1,C18:2)	0,9229	negativa	0,030568
SM_esfingomielina (d18:2,C18:1)	0,9133	negativa	0,0313
CER_Ceramida (d17:1,C16:0)	0,8986	negativa	0,035021
Criptoxantina	0,8091	negativa	0,036128
Fumarato	1,0483	positiva	0,036755
Tirosina	1,0777	positiva	0,038994
CE_Colesteriléster C20:5	0,8236	negativa	0,039914
CE_Colesteriléster C18:4	0,7902	negativa	0,043667
Malato	1,1101	positiva	0,046935
SM_esfingomielina (d16:1,C20:0)	0,9095	negativa	0,053287
CER_Ceramida (d17:1,C22:0)	0,8882	negativa	0,057993
Glicerol-3-fosfato, fracción polar	1,1093	positiva	0,061765
Uridina	0,8946	negativa	0,062565
SM_esfingomielina (d17:1,C18:0)	0,9258	negativa	0,072709
Ácido hipúrico	0,7791	negativa	0,081397
CER_Ceramida (d18:1,C23:0)	0,9177	negativa	0,089112
Fosfato, fracción lipídica	0,9505	negativa	0,097734
(*1): libre y de esfingolípidos			

Tabla 1c: Metabolitos de la Tabla 1a que mostraron adicionalmente una diferencia significativa (valor de $p < 0.1$) entre pacientes con CMH y controles sanos

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Maltosa	2,1427	positiva	5,39E-11
Colesteriléster C18:2	0,7523	negativa	1,99E-06
Colesteriléster C18:1	0,7715	negativa	5,23E-05
Taurina	1,2525	positiva	9,72E-05
TAG (C16:0,C18:2)	1,2934	positiva	0,00091
Ácido úrico	1,1564	positiva	0,000939
TAG (C 18:1,C18:2)	1,3302	positiva	0,00099
Glicerol, fracción lipídica	1,3816	positiva	0,001367
TAG (C16:0,C18:1,C18:2)	1,3509	positiva	0,002192
CE_Colesteriléster C15:0	0,8215	negativa	0,002242
SP_Esfingosina-1-fosfato (d17:1)	0,8497	negativa	0,002442
SP_Esfinganina (d18:0)	1,2867	positiva	0,002474
SP_Esfingosina (d18:1)	1,3486	positiva	0,002704
Sarcosina	1,0901	positiva	0,003105
beta-Caroteno	0,7568	negativa	0,003481
Cisteína	1,0924	positiva	0,003905
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,8682	negativa	0,004041
TAG (C16:0,C16:1)	1,3303	positiva	0,004263
Ácido eicosanoico (C20:cis[11]1)	1,2145	positiva	0,005339
Isoleucina	1,1098	positiva	0,005399
Esfingomielina (d18:1,C23:0)	0,926	negativa	0,005483
SM_esfingomielina (d18:2,C23:0)	0,897	negativa	0,006161

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Noradrenalina (Norepinefrina)	1,2232	positiva	0,006926

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Lisofosfatidilcolina (C17:0)	0,8834	negativa	0,008806
Testosterona	0,8292	negativa	0,009379
TAG (C18:2,C18:2)	1,2656	positiva	0,009482
Isocitrato	1,1189	positiva	0,011414
SM_ esfingomielina (d17:1,C24:0)	0,885	negativa	0,011423
SM_ esfingomielina (d17:1,C23:0)	0,8387	negativa	0,011783
Zeaxantina	0,8283	negativa	0,012366
SM_ esfingomielina (d16:1,C23:0)	0,869	negativa	0,014315
Criptoxantina	0,7778	negativa	0,018169
Eritrol	1,121	positiva	0,023299
CER_Ceramida (d17:1,C23:0)	0,8563	negativa	0,030171
Colesteriléster C16:0	0,8446	negativa	0,030834
SM_ esfingomielina (d17:1,C22:0)	0,9062	negativa	0,032352
SM_ esfingomielina (d18:1,C21:0)	0,9242	negativa	0,032429
SM_ esfingomielina (d16:1,C21:0)	0,8795	negativa	0,034803
Glucosa	1,0597	positiva	0,035437
Glutamato	1,1813	positiva	0,036213
Fumarato	1,0499	positiva	0,03758
SM_ esfingomielina (d17:1,C20:0)	0,9101	negativa	0,039401
CE_Colesteriléster C14:0	0,8974	negativa	0,044159
Cistina	1,1237	positiva	0,044881
Ácido 8-hidroxi-eicosatetraenoico (C20:trans[5]cis [9,11,14]4) (8-HETE)	1,1957	positiva	0,047092
1-Hidroxi-2-amino-(cis,trans)-3,5-octadecadieno (de esfingolípido)	0,9003	negativa	0,047207
Uridina	0,8827	negativa	0,047309
Sorbitol	1,2852	positiva	0,048213
SM_ esfingomielina (d18:1,C14:0)	0,9258	negativa	0,049457
Ácido elaídico (C18:trans[9]1)	1,6069	positiva	0,05134
SM_ esfingomielina (d18:2,C21:0)	0,9165	negativa	0,052457
Aspartato	1,0842	positiva	0,056222
Coenzima Q10	1,1425	positiva	0,068217
CER_Ceramida (d18:1,C18:0)	1,1056	positiva	0,070545
SM_ esfingomielina (d17:1,C16:0)	0,9289	negativa	0,07279
SM_ esfingomielina (d18:2,C23:1)	0,9224	negativa	0,073683
Lactaldehído	1,0822	positiva	0,078804
Pseudouridina	1,0653	positiva	0,082343
Ácido hipúrico	0,7733	negativa	0,083253
SM_ esfingomielina (d18:1,C23:1)	0,9341	negativa	0,088944
CER_Ceramida (d17:1,C24:0)	0,8949	negativa	0,091594
Glucosa-1-fosfato	1,0739	positiva	0,091687
SM_ esfingomielina (d18:2,C24:0)	0,933	negativa	0,092261

Tabla 2: Metabolitos con una diferencia significativa (valor de p < 0,05) en el cambio inducido por ejercicio entre ICC y control

Metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Glutamato	0,724	negativa	0,000274
Hipoxantina	0,448	negativa	0,000276
Adrenalina (Epinefrina)	0,439	negativa	0,001258
Lactato	0,612	negativa	0,005556
Ácido indol-3-láctico	1,198	positiva	0,007027
Ácido treónico	1,160	positiva	0,018026
Colestenol N.º 02	0,906	negativa	0,022576
alfa-Tocotrienol	1,206	positiva	0,028952
Coenzima Q9	1,166	positiva	0,029375
Histidina	1,083	positiva	0,039156
Fosfatidilcolina (C18:0, C20:4)	1,008	positiva	0,039198
Lisofosfatidilcolina (C18:1)	1,027	positiva	0,040233

Tabla 3: Metabolitos con una diferencia significativa (valor de p < 0,05) entre pacientes con ICC y controles sanos en

el máximo de ejercicio (t1) pero no en reposo (t0)

Punto temporal	t0	t0	t0	t1	t1	t1
Metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p	relación de mediana	regulación	valor de p
Lactato	1,149	positiva	0,161549	0,705	negativa	0,015456
Citrato	1,118	positiva	0,256634	1,132	positiva	0,040482

Tabla 4a: Metabolitos con una diferencia significativa (valor de p < 0,05) entre pacientes con ICC (cardiomiopatía dilatada) con puntuación de NYHA 1 y controles sanos

Metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Manosa	2,168	positiva	0,000025
Lisofosfatidilcolina (C18:2)	0,699	negativa	0,000748
Adrenalina (Epinefrina)	2,411	positiva	0,004448
Hipoxantina	1,779	positiva	0,004996
Fosfatidilcolina (C18:0, C18:2)	1,022	positiva	0,012486
Glucosa	1,271	positiva	0,014916
Fosfato (inorgánico y de fosfatos orgánicos)	0,793	negativa	0,015030
Cortisol	1,340	positiva	0,017261
Fosfatidilcolina (C18:0, C22:6)	1,239	positiva	0,017614
2-Hidroxi butirato	1,810	positiva	0,019583
Corticosterona	1,293	positiva	0,019642
Androstenediona	1,785	positiva	0,035365
Glutamato	1,333	positiva	0,039299
Pentadecanol	0,581	negativa	0,044212
Maltosa	1,7858	positiva	8,3846E-06
CE_Colesteriléster C15:0	0,7215	negativa	1,073E-05
Colesteriléster C18:2	0,7456	negativa	1,7406E-05
SM_esfingomielina (d17:1,C24:0)	0,7957	negativa	2,6209E-05
Noradrenalina (Norepinefrina)	1,4153	positiva	5,5355E-05
mio-inositol	1,1987	positiva	6,44E-05
SM_esfingomielina (d17:1,C23:0)	0,731	negativa	8,1995E-05
SM_esfingomielina (d17:1,C22:0)	0,8196	negativa	0,00013927
Sorbitol	1,7458	positiva	0,00014037
Normetanefrina	1,5039	positiva	0,0001699
Isocitrato	1,2084	positiva	0,00019135
SM_esfingomielina (d18:1,C23:0)	0,8716	negativa	0,00026783
Ornitina	1,1704	positiva	0,00037428
Eritrol	1,2249	positiva	0,00040476
Sarcosina	1,1251	positiva	0,00042563
Cistina	1,2636	positiva	0,00044298
Testosterona	0,7586	negativa	0,00086625
CE_Colesteriléster C14:0	0,8093	negativa	0,0008742
Uridina	0,7862	negativa	0,00092815
SM_esfingomielina (d18:1,C14:0)	0,8622	negativa	0,00104019
Ácido lignocérico (C24:0)	0,8223	negativa	0,00134372
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,8376	negativa	0,00139431
1-Hidroxi-2-amino-(cis,trans)-3,5-octadecadieno (de esfingolípidos)	0,8262	negativa	0,00145507
SM_esfingomielina (d16:1,C24:0)	0,7694	negativa	0,00146283
Urea	1,2149	positiva	0,0015119
beta-Caroteno	0,7083	negativa	0,00164813
Tirosina	1,1473	positiva	0,001792
Ácido behénico (C22:0)	0,8547	negativa	0,00192144
alfa-cetoglutarato	1,218	positiva	0,00195906
SM_esfingomielina (d16:1,C23:0)	0,8262	negativa	0,00281307
Taurina	1,2111	positiva	0,00288466
SM_esfingomielina (d18:1,C24:0)	0,8827	negativa	0,0032925
3-Metoxitirosina	1,259	positiva	0,00371589
Lisofosfatidilcolina (C17:0)	0,8552	negativa	0,00392246
SM_esfingomielina (d18:2,C23:0)	0,8797	negativa	0,00428746

(continuación)

Metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
CER_Ceramida (d18:2,C14:0)	0,8188	negativa	0,00445012
SM_esfingomielina (d17:1,C16:0)	0,8763	negativa	0,00489531
Colesta-2,4,6-trieno	0,8657	negativa	0,00545382
SM_esfingomielina (d18:2,C24:0)	0,8781	negativa	0,00576839
Fenilalanina	1,0947	positiva	0,00620035
Cisteína	1,1	positiva	0,00624402
SM_esfingomielina (d16:1,C22:0)	0,8502	negativa	0,00665211
Ácido úrico	1,1441	positiva	0,00696304
CER_Ceramida (d17:1,C24:0)	0,8237	negativa	0,00931215
Glucosa-1-fosfato	1,1388	positiva	0,00940813
CE_Colesteriléster C22:5	0,8609	negativa	0,0095955
CE_Colesteriléster C16:2	0,8095	negativa	0,00966362
Sulfato de deshidroepiandrosterona	0,6524	negativa	0,00995067
Glicerol-3-fosfato, fracción polar	1,1886	positiva	0,00997307
Isoleucina	1,1158	positiva	0,0102759
SM_esfingomielina (d17:1,C20:0)	0,8765	negativa	0,01056663
CER_Ceramida (d18:1,C14:0)	0,852	negativa	0,01059946
Colesterol, total	0,9069	negativa	0,01060847
SM_esfingomielina (d18:1,C22:0)	0,8438	negativa	0,01179659
Ácido linoleico (C18:cis[9,12]2)	0,8487	negativa	0,01208761
treo-esfingosina (*1)	0,8906	negativa	0,01352672
SM_esfingomielina (d17:1,C24:1)	0,9005	negativa	0,01479843
CE_Colesteriléster C16:3	0,8114	negativa	0,01621643
CE_Colesteriléster C14:1	0,7197	negativa	0,01779781
Colesteriléster C18:1	0,837	negativa	0,01841802
scillo-inositol	1,2605	positiva	0,02009089
CE_Colesteriléster C22:6	0,8245	negativa	0,02009893
Pseudouridina	1,0972	positiva	0,02576962
CER_Ceramida (d17:1,C23:0)	0,8359	negativa	0,02705684
eritro-C16-esfingosina	0,8592	negativa	0,02915249
Ácido eicosenoico (C20:cis[11]1)	1,1968	positiva	0,02965701
SP_Esfinganina (d18:0)	1,2368	positiva	0,03058449
Ácido isopalmítico (C16:0)	0,8326	negativa	0,03139525
Colesta-2,4-dieno	0,8837	negativa	0,03222468
Lisofosfatidilcolina (C18:0)	0,8999	negativa	0,03342501
Fosfatidilcolina (C16:1,C18:2)	0,9093	negativa	0,03389605
Colesteriléster C16:0	0,8258	negativa	0,03509819
TAG (C16:0,C18:2)	1,2113	positiva	0,03532712
SM_esfingomielina (d18:2,C22:0)	0,8964	negativa	0,03540009
CER_Ceramida (d17:1,C16:0)	0,8814	negativa	0,03839909
Glicerol, fracción lipídica	1,2796	positiva	0,03879761
CE_Colesteriléster C18:3	0,8253	negativa	0,04166858
5-Oxoprolina	1,0601	positiva	0,04385594
CE_Colesteriléster C22:4	0,8749	negativa	0,04444786
Serina, fracción lipídica	1,2253	positiva	0,046845
5-O-Metilesfingosina (*1)	0,8943	negativa	0,04788647
TAG (C16:0,C18:1,C18:2)	1,2557	positiva	0,04838256
SP_Esfingosina (d18:1)	1,2602	positiva	0,04924965
(*1): libre y de esfingolípidos			

Tabla 4b: Metabolitos de la Tabla 4a que mostraron adicionalmente una diferencia significativa (valor de $p < 0,1$) entre pacientes con CMI con puntuación de NYHA 1 y controles sanos

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Colesteriléster C18:2	0,6118	negativa	1,7191E-12
SM_esfingomielina (d18:1,C14:0)	0,7778	negativa	3,7018E-08
Sorbitol	2,0982	positiva	4,3743E-07
SM_esfingomielina (d18:2,C23:0)	0,8125	negativa	4,0589E-06
SM_esfingomielina (d17:1,C23:0)	0,7067	negativa	1,1938E-05

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
CE_Colesteriléster C15:0	0,7269	negativa	1,472E-05
SM_esfingomielina (d18:1,C23:0)	0,8512	negativa	1,8295E-05
TAG (C16:0,C18:2)	1,453	positiva	1,8737E-05
Colesteriléster C18:1	0,7343	negativa	1,939E-05
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,7919	negativa	2,5541E-05
1-Hidroxi-2-amino-(cis,trans)-3,5-octadecadieno (de esfingolípidos)	0,7813	negativa	3,8025E-05
Colesterol, total	0,8603	negativa	3,8932E-05
TAG (C16:0,C18:1,C18:2)	1,572	positiva	4,2286E-05
SM_esfingomielina (d17:1,C16:0)	0,8268	negativa	5,0421E-05
CE_Colesteriléster C14:0	0,785	negativa	6,3189E-05
beta-Caroteno	0,6577	negativa	0,00012609
treo-esfingosina (*1)	0,8433	negativa	0,00014084
Colesta-2,4-dieno	0,8112	negativa	0,00014837
Lisofosfatidilcolina (C17:0)	0,8168	negativa	0,00018589
Glucosa	1,1224	positiva	0,00021581
Glutamato	1,3974	positiva	0,00024219
SM_esfingomielina (d17:1,C24:0)	0,8216	negativa	0,00026196
Ácido lignocérico (C24:0)	0,8114	negativa	0,00031083
SM_esfingomielina (d16:1,C23:0)	0,7977	negativa	0,00038589
Fosfatidilcolina (C18:0,C18:2)	1,0177	positiva	0,00040589
SM_esfingomielina (d18:2,C24:0)	0,8492	negativa	0,00049962
5-O-Metilesfingosina (*1)	0,8249	negativa	0,0006501
SM_esfingomielina (d17:1,C22:0)	0,8428	negativa	0,00094804
Cistina	1,2438	positiva	0,00096287
Taurina	1,2299	positiva	0,00120903
Glucosa-1-fosfato	1,1646	positiva	0,00135235
SM_esfingomielina (d17:1,C24:1)	0,8718	negativa	0,00137508
Glicerol, fracción lipídica	1,4351	positiva	0,00147588
Ácido behénico (C22:0)	0,8594	negativa	0,00159109
SM_esfingomielina (d16:1,C24:0)	0,7739	negativa	0,00173184
Isocitrato	1,1685	positiva	0,00194376
Cisteína	1,1133	positiva	0,0019666
3-Metoxitirosina	1,2542	positiva	0,00284987
CER_Ceramida (d18:1,C14:0)	0,8291	negativa	0,00290481
eritro-C16-esfingosina	0,8147	negativa	0,00311066
Ácido linoleico (C18:cis[9,12]2)	0,8385	negativa	0,00451392
Maltosa	1,4331	positiva	0,00496723
Adrenalina (Epinefrina)	1,5012	positiva	0,00542671
SM_esfingomielina (d18:2,C22:0)	0,8703	negativa	0,00727388
Lisofosfatidilcolina (C18:2)	0,8695	negativa	0,00744797
Normetanefrina	1,3345	positiva	0,00759363
SM_esfingomielina (d18:1,C24:0)	0,8937	negativa	0,0076034
Colesteriléster C16:0	0,7884	negativa	0,00805685
Ácido eicosenoico (C20:cis[11]1)	1,2302	positiva	0,00826261
Colesta-2,4,6-trieno	0,8784	negativa	0,00837711
CE_Colesteriléster C22:5	0,8605	negativa	0,00891577
Sulfato de deshidroepiandrosterona	0,6661	negativa	0,00966052
Pseudouridina	1,1119	positiva	0,01037548
CE_Colesteriléster C22:4	0,8457	negativa	0,01129319
CE_Colesteriléster C14:1	0,7165	negativa	0,01133041
Lisofosfatidilcolina (C18:0)	0,8831	negativa	0,01177707
Ácido úrico	1,1327	positiva	0,01187686
SM_esfingomielina (d18:1,C22:0)	0,8458	negativa	0,01247557
Testosterona	0,8204	negativa	0,01585512
CER_Ceramida (d17:1,C23:0)	0,8278	negativa	0,02004195
SM_esfingomielina (d16:1,C22:0)	0,875	negativa	0,0242648
Noradrenalina (Norepinefrina)	1,2117	positiva	0,02471946
CE_Colesteriléster C16:2	0,8476	negativa	0,03239574
5-Oxoprolina	1,0599	positiva	0,03394216

(continuación)

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
alfa-cetoglutarato	1,1326	positiva	0,03826297
CER_Ceramida (d17:1,C24:0)	0,8583	negativa	0,04035007
Ácido isopalmítico (C16:0)	0,8489	negativa	0,04227044
CE_Colesteriléster C18:3	0,8356	negativa	0,04430951
CE_Colesteriléster C22:6	0,8484	negativa	0,04599329
SM_esfingomielina (d17:1,C20:0)	0,9092	negativa	0,06237979
Isoleucina	1,0817	positiva	0,06356105
Tirosina	1,083	positiva	0,06681343
Ornitina	1,0775	positiva	0,07275574
Fosfatidilcolina (C16:1,C18:2)	0,9234	negativa	0,0730987
Manosa	1,1099	positiva	0,07913279
mio-inositol	1,08	positiva	0,08438868

(*1): libre y de esfingolípidos

Tabla 4c: Metabolitos de la Tabla 4a que mostraron adicionalmente una diferencia significativa (valor de p < 0,1) entre pacientes con CMH con puntuaciones de NYHA 1 y controles sanos

Nombre del metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Maltosa	2,3774	positiva	9,1877E-11
Colesteriléster C18:2	0,7422	negativa	1,5121E-05
Taurina	1,3057	positiva	4,2799E-05
Colesteriléster C18:1	0,7566	negativa	0,00017957
isoleucina	1,1583	positiva	0,00067494
TAG (C16:0,C18:2)	1,3413	positiva	0,00106071
Sarcosina	1,1148	positiva	0,00123586
SP_Esfinganina (d18:0)	1,3661	positiva	0,00126025
SP_Esfingosina (d18:1)	1,4493	positiva	0,00135359
TAG (C16:0,C18:1,C18:2)	1,4301	positiva	0,00163138
CE_Colesteriléster C15:0	0,814	negativa	0,00544571
SM_esfingomielina (d18:1,C23:0)	0,9016	negativa	0,00613976
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,8591	negativa	0,00645307
SM_esfingomielina (d18:2,C23:0)	0,8856	negativa	0,00715908
Glicerol, fracción lipídica	1,3643	positiva	0,00800466
Ácido eicosenoico (C20:cis[11]1)	1,2284	positiva	0,01113831
SM_esfingomielina (d17:1,C23:0)	0,8234	negativa	0,01457624
Ácido úrico	1,1278	positiva	0,01663987
beta-Caroteno	0,7703	negativa	0,01772396
Serina, fracción lipídica	1,2593	positiva	0,02396587
Testosterona	0,8387	negativa	0,03444244
CE_Colesteriléster C22:5	0,8857	negativa	0,03705511
Noradrenalina (Norepinefrina)	1,1939	positiva	0,03929456
CE_Colesteriléster C22:4	0,8728	negativa	0,04240014
1-Hidroxi-2-amino-(cis,trans)-3,5-octadecadieno (de esfingolípidos)	0,8851	negativa	0,04256896
Uridina	0,8639	negativa	0,04452619
Glutamato	1,199	positiva	0,04801547
Lisofosfatidilcolina (C17:0)	0,8984	negativa	0,04926739
SM_esfingomielina (d16:1,C23:0)	0,8842	negativa	0,05494844
Colesteriléster C16:0	0,8449	negativa	0,06302395
SM_esfingomielina (d18:1,C14:0)	0,9196	negativa	0,06434119
SM_esfingomielina (d17:1,C22:0)	0,9084	negativa	0,0655624
SM_esfingomielina (d18:2,C24:0)	0,9168	negativa	0,06627783
Eritrol	1,112	positiva	0,06717477
Isocitrato	1,097	positiva	0,06783798
SM_esfingomielina (d17:1,C20:0)	0,9104	negativa	0,06992485
SM_esfingomielina (d17:1,C24:0)	0,9103	negativa	0,08265925
CER_Ceramida (d18:2,C14:0)	0,8865	negativa	0,08795584

Tabla 5: Metabolitos con una diferencia significativa (valor de $p < 0,05$) en el cambio inducido por ejercicio entre ICC con puntuación de NYHA 1 y control

Metabolito	relación de mediana	regulación	valor de p
Glutamato	0,720	negativa	0,025093
Hipoxantina	0,407	negativa	0,034843
Fosfatidilcolina (C18:0, C20: 4)	1,011	positiva	0,048864

Tabla 6: Metabolitos con una diferencia significativa (valor de $p < 0,05$) entre pacientes con ICC con puntuación de NYHA I en el máximo de ejercicio (t1) pero no en reposo (t0)

Punto temporal	t0	t0	t0	t1	t1	t1
Parámetro	relación de mediana	regulación	valor de p	relación de mediana	regulación	valor de p
Fosfatidilcolina (C18:0, C20:4)	1,035900639	positiva	0,339994	1,054274585	positiva	0,049492

5 Tabla 7: Propiedades químicas/físicas de analitos seleccionados. Estos biomarcadores se caracterizan en el presente documento por propiedades químicas y físicas.

Metabolito	Patrón de fragmentación (CG-EM) y descripción
Glicerol fosfato, fracción lipídica	Glicerol fosfato, la fracción lipídica representa la suma de parámetros de metabolitos que contienen un resto de glicerol-2-fosfato o glicerol-3-fosfato y que están presentes en la fracción lipídica después de la extracción y separación del extracto a una fracción polar y una lipídica.
3-O-Metilesfingosina	La 3-O-Metilesfingosina muestra los siguientes fragmentos iónicos característicos si se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de metanolisis ácida y derivatización con clorhidrato de O-metilhidroxilamina 2 % en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida: EM (IE, 70 eV): m/z (%): 204 (100), 73 (18), 205 (16), 206 (7), 354 (4), 442 (1).
5-O-Metilesfingosina	La 5-O-Metilesfingosina muestra los siguientes fragmentos iónicos característicos si se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de metanolisis ácida y derivatización con clorhidrato de O-metilhidroxilamina 2 % en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida: EM (IE, 70 eV): m/z (%): 250 (100), 73 (34), 251 (19), 354 (14), 355 (4), 442 (1).
Fosfatidilcolina N.º 02	La fosfatidilcolina N.º 02 representa la suma de parámetros de fosfatidilcolinas. Muestra las siguientes especies iónicas características cuando se detectan con CL/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP): relación de masa con respecto a carga (m/z) de la especie iónica con carga positiva es 808,4 (+/- 0,5).
TAG (C16:0,C16:1)	La TAG (C16:0,C16:1) representa la suma de parámetros de triacilglicéridos que contenían la combinación de una unidad de ácidos grasos C16:0 y una unidad de ácidos grasos C16:1. Muestra las siguientes especies iónicas características cuando se detectan con CL/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP): relación de masa con respecto a carga (m/z) de la especie iónica con carga positiva es 549,6 (+/- 0,5).
TAG (C16:0,C18:2)	La TAG (C16:0,C18:2) representa la suma de parámetros de triacilglicéridos que contenían la combinación de una unidad de ácidos grasos C16:0 y una unidad de ácidos grasos C18:2. Muestra las siguientes especies iónicas características cuando se detectan con CL/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP): relación de masa con respecto a carga (m/z) de la especie iónica con carga positiva es 575,6 (+/- 0,5).
TAG (C18:1,C18:2)	La TAG (C18:1,C18:2) representa la suma de parámetros de triacilglicéridos que contenían la combinación de una unidad de ácidos grasos C18:1 y una unidad de ácidos grasos C18:2. Muestra las siguientes especies iónicas características cuando se detectan con CL/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP): relación de masa con respecto a carga (m/z) de la especie iónica con carga positiva es 601,6 (+/- 0,5).
TAG (C18:2,C18:2)	La TAG (C18:2,C18:2) representa la suma de parámetros de triacilglicéridos que contenían la combinación de dos unidades de ácidos grasos C18:2. Muestra las siguientes especies iónicas características cuando se detectan con CL/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP): relación de masa con respecto a carga (m/z) de la especie iónica con carga positiva es 599,6 (+/- 0,5).

ES 2 728 120 T3

(continuación)

Metabolito	Patrón de fragmentación (CG-EM) y descripción
Colesterol N.º 02	<p>El colesterol N.º 02 representa un isómero de colesterol. Muestra los siguientes fragmentos iónicos característicos si se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de metanolisis ácida y derivatización con clorhidrato de O-metilhidroxilamina 2 % en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida:</p> <p>EM (IE, 70 eV): m/z (%): 143 (100), 458 (91), 73 (68), 81 (62), 95 (36), 185 (23), 327 (23), 368 (20), 255 (15), 429 (15).</p>

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar la insuficiencia cardíaca en un sujeto que comprende las etapas de:
 - a) determinar en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece insuficiencia cardíaca la cantidad de al menos el biomarcador Lisofosfatidilcolina C18:2;
 - b) comparar la cantidad de al menos dicho biomarcador con una referencia, por medio de lo cual insuficiencia cardíaca es diagnosticada si la cantidad del biomarcador Lisofosfatidilcolina C18:2 se reduce en comparación con un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que no padecen insuficiencia cardíaca.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca según la clase I de NYHA.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra del sujeto se ha obtenido en reposo.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha referencia procede de un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que no padecen insuficiencia cardíaca o una referencia calculada.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que una diferencia entre la referencia y la cantidad del biomarcador Lisofosfatidilcolina C18:2 es indicativa de insuficiencia cardíaca.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha referencia procede de un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que padecen insuficiencia cardíaca.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que una referencia que es idéntica al biomarcador Lisofosfatidilcolina C18:2 es indicativa de insuficiencia cardíaca.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca congestiva.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho sujeto padece cardiomiopatía dilatada y/o cardiomiopatía isquémica.
10. Un procedimiento para identificar si un sujeto necesita una terapia de insuficiencia cardíaca que comprende las etapas del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y la etapa adicional de identificar a un sujeto que necesita una terapia de insuficiencia cardíaca si se diagnostica insuficiencia cardíaca.
11. Un procedimiento para determinar si una terapia contra la insuficiencia cardíaca tiene éxito en un sujeto que comprende las etapas del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y la etapa adicional de determinar que dicha terapia tiene éxito si no se diagnostica insuficiencia cardíaca.