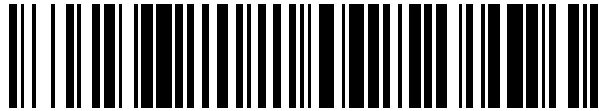


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 804**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013 PCT/EP2013/062231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13189822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013 E 13728209 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2864793**

54 Título: **Métodos para determinar el riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular**

30 Prioridad:

**21.06.2012 EP 12172867**  
**04.04.2013 EP 13162308**

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

**21.01.2021**

73 Titular/es:

**LURIC DATENBANK GBR (100.0%)**  
**Gottlieb Daimler Strasse 25**  
**68165 Mannheim, DE**

72 Inventor/es:

**GOLIASCH, GEORG;**  
**NIESSNER, ALEXANDER;**  
**KLEBER, MARCUS E. y**  
**MÄRZ, WINFRIED**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 802 804 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**

Métodos para determinar el riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular

5 La presente invención se refiere al campo de los diagnósticos de laboratorio. De manera específica, se divulgan métodos para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con enfermedad cardiovascular y para reducir el riesgo de mortalidad del paciente de acuerdo con las reivindicaciones, proporcionando tratamientos de prevención secundaria al paciente.

10 Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizados o individualizados. Estos son regímenes de tratamiento que tienen en cuenta las necesidades o riesgos individuales de un paciente. Los regímenes de tratamiento individualizados ofrecen beneficios para el paciente individual, así como para la sociedad en su conjunto. Para el paciente individual, el tratamiento personalizado evita la terapia excesiva al tiempo que garantiza que se tomen las medidas necesarias. Como cada terapia puede causar efectos secundarios perjudiciales no deseados, el hecho de evitar terapias innecesarias salva al paciente de efectos secundarios potencialmente perjudiciales. Por otro lado, la identificación de pacientes con necesidades especiales asegura que estas personas reciban el tratamiento adecuado. Para el sistema de salud en su conjunto, el hecho de evitar terapias innecesarias permite un uso más económico de los recursos.

15 Los regímenes de tratamiento individualizados requieren herramientas de diagnóstico apropiadas para separar aquellos pacientes que se benefician de determinadas medidas terapéuticas de los pacientes que no. Por lo tanto, el desarrollo de regímenes de tratamiento individualizados depende fundamentalmente del desarrollo de nuevas herramientas y procedimientos de diagnóstico. Debido a que la prevención de enfermedades futuras con frecuencia es más eficaz que la terapia de enfermedades ya existentes, las herramientas y métodos de diagnóstico para la estratificación del riesgo con respecto a enfermedades futuras son especialmente deseables.

20 Las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de muerte en los países industrializados. La mortalidad por enfermedades cardiovasculares disminuyó sustancialmente en los países occidentalizados durante las últimas cinco décadas (Ford, ES et al., 2007, N. Engl. J. Med. 356: 2388-2398). Sin embargo, a pesar de las medidas altamente eficaces para controlar los factores de riesgo convencionales, la incidencia de eventos cardiovasculares sigue siendo alta. Esto resalta la necesidad de identificar factores de riesgo independientes no convencionales para eventos cardiovasculares. Por lo tanto, siempre es necesario mejorar los métodos de predicción de riesgo en medicina cardiovascular.

25 30 35 40 Ix et al. (Circulation 121: 1295-1303, 2010) divulga la asociación de la tasa de excreción de creatinina con la mortalidad en personas con arteriopatía coronaria. Stenvinkel et al. (Clin J Am Soc Nephrol 3: 505-521, 2008) divulgan biomarcadores emergentes para evaluar el riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica. Schnabel et al. (European Heart Journal 31: 3024-3031, 2010 (21)) divulgan un enfoque de marcadores múltiples para la estratificación del riesgo en pacientes con arteriopatía coronaria. Thomas et al. (Diabetes Care 35: 1158-1164, 2012) divulgan que los niveles de vitamina D predicen la mortalidad por todas las causas y enfermedades cardiovasculares en sujetos con síndrome metabólico.

La invención se caracteriza por la materia objeto de las reivindicaciones.

45 Además, se divulga, pero no está comprendido por la presente invención, un método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, que comprende las etapas de

50 a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende al menos las siguientes variables: la edad del paciente, un indicador de rendimiento miocárdico, un indicador de rendimiento renal, la frecuencia cardíaca del paciente, un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre,

55 b) establecer el parámetro biológico en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular.

Además, se divulga, pero no está comprendido por la presente invención, un método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, que comprende las etapas de

60 65 a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende las siguientes variables: el género del paciente, la edad del paciente, al menos un indicador de función miocárdica o rendimiento miocárdico, al menos dos indicadores de función renal o rendimiento renal, la frecuencia cardíaca del paciente, al menos un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre y al menos un indicador del metabolismo de calcio y/o fosfato en la sangre,

b) establecer el parámetro biológico en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular.

5 La expresión "determinar el riesgo de mortalidad" como se usa en el presente documento se refiere a evaluar la probabilidad de acuerdo con la cual un sujeto fallecerá dentro de una ventana temporal determinada, es decir, la ventana predictiva. De conformidad con la presente invención, la ventana predictiva es preferentemente dentro de 3 años, 5 años, 8 años o 10 años o más después de la determinación del riesgo de mortalidad. Sin embargo, como  
10 entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación generalmente no pretende ser correcta para el 100 % de los sujetos a investigar. La expresión, sin embargo, requiere que se pueda hacer una predicción para una parte estadísticamente significativa de los sujetos de manera adecuada y correcta. El experto en la materia puede determinar sin más si una parte es estadísticamente significativa mediante el uso de diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, p. ej., la prueba de Mann-Whitney-U, análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox, correlación de Pearson y estadístico C de Harrell. Los detalles se encuentran, por ejemplo, en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los datos continuos se presentan como mediana y rango intercuartil, los datos discretos como recuentos y porcentajes. Las variables continuas se someten preferentemente a la transformación logarítmica antes de entrar en el análisis. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. Los valores p son, preferentemente, 0,005 o 0,0001. El poder discriminatorio de la puntuación de riesgo diseñada se evalúa utilizando el estadístico C de Harrell. La mejora de la predicción de riesgo individual se examina preferentemente mediante la mejora de la reclasificación neta como lo describe Pencina et al. (13). Preferentemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que la predicción de un riesgo aumentado, normal o disminuido sea correcta para al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % y preferentemente de al menos el 95 % de los sujetos de una  
20 cohorte o población dada. Determinar el riesgo de mortalidad se relaciona, preferentemente, con determinar si existe o no un riesgo de mortalidad aumentado en comparación con el riesgo de mortalidad promedio en una población de sujetos en lugar de dar una probabilidad precisa de dicho riesgo.

El método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular es un método  
30 *in vitro*. Además, puede incluir etapas adicionales a las mencionadas explícitamente. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden referirse a tratamientos previos de las muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el método. Los métodos se pueden llevar a cabo manualmente o asistidos por automatización. Preferentemente, la etapa(a) y/o (b) puede estar total o parcialmente asistida por automatización, p. ej., mediante un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa(a) o una comparación implementada por ordenador en la etapa  
35 (b).

El riesgo de mortalidad a determinar se debe a la mortalidad cardiovascular. La mortalidad cardiovascular se refiere a todos los casos de muerte relacionados con enfermedades cardiovasculares. La expresión "enfermedad cardiovascular" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a una clase de enfermedades que implican el corazón o los vasos sanguíneos. La enfermedad cardiovascular se refiere además a cualquier enfermedad que afecte el sistema cardiovascular (como se describe, por ejemplo, en la décima revisión de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Relacionados (CIE10), CIE-10 Capítulo IX: Diseases of the circulatory system). Las causas de la enfermedad cardiovascular son diversas, pero la aterosclerosis y/o la hipertensión son las más comunes. La muerte por enfermedades cardiovasculares puede comprender infarto de miocardio, muerte por insuficiencia cardíaca congestiva, muerte por accidente cerebrovascular, muerte después de una cirugía de injerto de derivación de arterias coronarias o muerte después de una intervención coronaria percutánea.

El término "paciente" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a un mamífero, preferentemente a un ser humano. El paciente padece una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular es una arteriopatía coronaria estable y puede o no padecer enfermedades que aumentan el riesgo de muerte por causas cardiovasculares. Dichas enfermedades incluyen preferentemente, pero sin limitación, hipertensión arterial, insuficiencia renal, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares tales como, por ejemplo, enfermedad cerebrovascular, accidente cerebrovascular o enfermedad vascular periférica.

La expresión "puntuación de riesgo de mortalidad" como se usa en el presente documento generalmente significa un indicador del riesgo de mortalidad con respecto a un determinado período de tiempo. En particular, la puntuación de riesgo de mortalidad proporciona una estimación de cuánto tiempo se espera que el paciente sobreviva un determinado período de tiempo o como alternativa, de cómo de probable es que el paciente fallezca dentro de esa ventana temporal. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la puntuación de riesgo de mortalidad puede verse como un  
60 indicador de una tasa particular de supervivencia o mortalidad.

La expresión "parámetro biológico" como se usa en el presente documento generalmente incluye todo tipo de productos de expresión génica que se expresan diferencialmente, es decir, regulados positivamente o negativamente en presencia o ausencia de una determinada afección, enfermedad o complicación. Normalmente, un parámetro biológico también se denomina, en el presente documento, biomarcador. De acuerdo con la presente invención, un parámetro biológico también puede referirse a la edad del paciente, el género del paciente y/o la frecuencia cardíaca

del paciente. Igualmente se prefiere que un parámetro biológico pueda estar en forma de un ácido nucleico (incluido el ARNm), una proteína, un péptido o un compuesto de molécula pequeña, preferentemente en forma de su concentración o cantidad. La cantidad de un parámetro biológico adecuado puede indicar la presencia o ausencia de la afección, enfermedad o complicación y así permitir el diagnóstico. Por ejemplo, parámetros biológicos que reflejan inflamación, el metabolismo de los lípidos, la función renal y/o la función cardiovascular son bien conocidos en la técnica, incluido su análisis por medio de sistemas de análisis habituales y anticuerpos disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, Schnabel et al., 2010. Eur Heart J, 31: 3024-3031).

En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, como "indicador de rendimiento miocárdico" y/o "indicador de función miocárdica" se puede usar cualquier parámetro biológico que proporcione información sobre la afección médica del corazón del paciente. Un indicador de la función o rendimiento miocárdico puede significar un parámetro biológico que proporciona información sobre la función cardiovascular. Ejemplos de parámetros biológicos que indican el rendimiento miocárdico del paciente incluyen, pero sin limitación, copeptina, proendotelina-1 C-terminal, región media de proadrenomedulina (MR-proADM), región media del propéptido natriurético auricular (MR-proANP) y fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP). Un indicador del rendimiento miocárdico también puede referirse a la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente, que es una medida del porcentaje de sangre que sale del corazón del paciente cada vez que se contrae. En particular, la expresión "fracción de eyección" se refiere al porcentaje de sangre que se bombea de un ventrículo lleno con cada latido cardíaco. Debido a que el ventrículo izquierdo es la cámara de bombeo principal del corazón, la fracción de eyección generalmente se mide únicamente en el ventrículo izquierdo (VI). Se considera que una fracción de eyección ventricular izquierda normal está en el intervalo del 55 al 70 %. En determinadas circunstancias, en particular en pacientes con enfermedades cardiovasculares, la fracción de eyección puede disminuir.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el indicador de función miocárdica o rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen. Las técnicas para medir la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, ecocardiograma, cateterización cardíaca, obtención de imágenes mediante resonancia magnética (RM), tomografía computarizada (CT) o exploración de medicina nuclear. En el contexto de la presente invención, la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) se clasificó en normal ( $\geq 55$  %), levemente reducida (45-54 %), moderadamente reducida (30-44 %) y considerablemente reducida ( $<30$  %). Una enseñanza de cómo medir y determinar una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) de acuerdo con la invención se ilustra adicionalmente mediante los Ejemplos de la presente solicitud.

En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, como indicador alternativo del rendimiento miocárdico y/o el indicador de la función miocárdica, se puede utilizar la concentración en sangre del paciente de péptidos natriuréticos. La expresión "péptidos natriuréticos" generalmente se refiere a todos los péptidos natriuréticos auriculares (ANP, por sus siglas en inglés) conocidos y péptidos natriuréticos cerebrales (BNP, por sus siglas en inglés) descritos en la técnica (Bonow 1996, Circulation 93, 1946), que incluyen, por ejemplo, pre-proANP, proANP, NT-proANP, ANP y pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que se escinde enzimáticamente liberando el pro péptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El pro péptido se escinde adicionalmente en un pro péptido N-terminal (Nt-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP). Los péptidos natriuréticos pueden ser NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. ANP y BNP son las hormonas activas y tienen una semivida más corta que sus homólogos inactivos correspondientes, NT-proANP y NT-proBNP. BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como una molécula intacta y, como tal, se elimina por vía renal. La semivida in vivo de NT-proBNP es 120 minutos más larga que la de BNP, que es de 20 min (Smith 2000, J Endocrinol 167, 239). Las preanalíticas son más consistentes con NT-proBNP, lo que permite transportar fácilmente la muestra a un laboratorio central (Mueller 2004, Clin Chem Lab Med 42, 942). Las muestras de sangre se pueden almacenar a temperatura ambiente durante varios días o se pueden enviar por correo o enviar sin pérdida de recuperación. En cambio, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4 °C conduce a una pérdida de concentración de al menos el 20 % (Wu 2004, Clin Chem 50, 867). Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o de las propiedades de interés, la medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético puede ser ventajosa. Los péptidos natriuréticos pueden ser NT-proBNP o variantes del mismo. El NT-proBNP humano es un polipéptido que comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud que corresponde al fragmento N-terminal de la molécula NT-proBNP humana. Un péptido natriurético adicional puede ser la región media del propéptido natriurético auricular (MR-proANP). Se han descrito métodos para medir péptidos natriuréticos (Ala-Kopsala 2004, Clin Chem 50, 1576) y la concentración de los péptidos natriuréticos se calcula preferentemente en pg/ml, pero también puede estar indicada por cualquier otro formato de concentración adecuado, tal como, por ejemplo, pmol/dl.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el al menos un indicador de la función miocárdica o del rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen o por la concentración en sangre del paciente del fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP).

En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, como "indicador de rendimiento renal" y/o "indicador de función renal" se puede usar cualquier parámetro biológico que proporcione información sobre la afección médica del riñón o de los riñones del paciente. Un indicador de la función o el rendimiento renal puede ser un parámetro biológico o un biomarcador que proporciona información sobre la función renal. Ejemplos de parámetros biológicos incluyen, pero sin limitación, cistatina C, creatinina sérica y renina (Schnabel et al., 2010. Eur Heart J; 31: 2024-3031).

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el indicador de rendimiento renal está definido por la concentración en sangre del paciente de creatinina sérica. La creatinina sérica es el indicador más comúnmente utilizado de la función renal. La concentración de creatinina sérica se puede medir en una muestra de sangre mediante métodos convencionales, tal como el método habitual de Jaffe. La concentración de creatinina sérica se calcula preferentemente en mg/dl, pero puede estar indicada por cualquier otro formato de concentración adecuado, tal como, por ejemplo, pmol/dl.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los al menos dos indicadores de rendimiento renal o función renal están definidos por la concentración de cistatina C y renina en sangre del paciente. La cistatina C, también conocida como cistatina 3 (y anteriormente conocido como traza gamma, post-gammaglobulina o polipéptido neuroendocrino básico) es una proteína codificada por el gen CST3. La renina es una enzima producida por el riñón. La cistatina C y la renina son biomarcadores utilizados de forma habitual para evaluar la función y/o el rendimiento renal de un paciente. La concentración de cistatina C en suero se puede definir mediante métodos convencionales conocidos en la técnica y se mide, calcula e indica preferentemente en mg/l. Lo mismo se aplica para la concentración de renina en la muestra de sangre de un paciente, cuya concentración se indica preferentemente en pg/ml,  $\mu$ IU/ml o de manera equivalente en mIU/l o U/l.

En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, como "indicador del metabolismo de la glucosa en sangre" se puede usar cualquier parámetro biológico que proporcione información sobre los diversos procesos bioquímicos responsables de la formación, descomposición e interconversión de carbohidratos en un organismo vivo, entre ellos, pero sin limitación, el mantenimiento de niveles constantes de glucosa en el cuerpo. Un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre puede ser un parámetro biológico que proporciona información sobre la concentración promedio de glucosa en plasma durante períodos prolongados de tiempo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, el parámetro biológico de la glucohemoglobina HbA<sub>1c</sub> (también conocida como hemoglobina A<sub>1c</sub>, HbA<sub>1c</sub>, A<sub>1c</sub>, Hb<sub>1c</sub> o HbA<sub>1c</sub>). La concentración de la glucohemoglobina HbA<sub>1c</sub> se mide comúnmente en porcentaje (%) con respecto a la cantidad total de hemoglobina. En general, el intervalo de referencia encontrado en personas sanas es de aproximadamente 20-40 mmol/mol (4 % - 5,9 %). Los Estándares de Atención Médica en Diabetes de la American Diabetes Association de 2010 añadieron la A<sub>1c</sub>  $\geq$  48 mmol/mol ( $\geq$  6,5 %) como criterio para el diagnóstico de diabetes.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el o el al menos un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA<sub>1c</sub> en % de hemoglobina total.

La expresión "muestra de sangre" como se menciona en el presente documento preferentemente se refiere a una muestra de sangre que se ha obtenido del paciente mediante la práctica habitual convencional. En el contexto de la presente invención, sin embargo, también se incluye que el o los parámetros biológicos de interés se determinan mediante el uso de cualquier otra muestra del paciente como material de entrada, tal como, por ejemplo, una muestra de un fluido corporal, una muestra de células separadas o una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Las muestras de tejido o de órganos se pueden obtener de cualquier tejido u órgano mediante, p. ej., biopsia. Las células separadas pueden obtenerse de los fluidos corporales o de los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como la centrifugación o la clasificación celular. Preferentemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de aquellas células, tejidos u órganos que producen el marcador mencionado en el presente documento.

El género del paciente puede ser masculino o femenino.

En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, como "indicador del metabolismo de calcio y/o fosfato en sangre" puede usarse cualquier parámetro biológico que sea indicativo o esté relacionado con la concentración o el nivel de calcio y/o fosfato, preferentemente iones de calcio y/o fosfato, en sangre del paciente, por ejemplo, en el suero sanguíneo del paciente. Ejemplos de un indicador del metabolismo de calcio y/o fosfato en sangre incluyen, pero sin limitación, vitamina D (también conocida como colecalciferol o calciol), por ejemplo, vitamina D<sub>3</sub>, por ejemplo 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>. También se incluyen cualquier tipo de sustancias metabólicas relacionadas con la vía de la vitamina D.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el al menos un indicador del metabolismo del calcio en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de 25(OH) -vitamina D<sub>3</sub>,

Se divulga, pero no está comprendido por la presente invención, un método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, que comprende las etapas de

- 5 a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende al menos las siguientes variables: la edad del paciente, un indicador de rendimiento miocárdico, un indicador de rendimiento renal, la frecuencia cardíaca del paciente, un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre,
- 10 b) establecer el parámetro biológico en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular, en donde
- 15 i) el indicador de rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda del paciente en % de volumen por volumen o por la concentración en sangre del paciente de péptidos natriuréticos,
- ii) el indicador de rendimiento renal está definido por la concentración en sangre del paciente de creatinina sérica o por la concentración en sangre del paciente de cistatina C,
- 20 iii) el indicador del metabolismo de la glucosa en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total.

Se divulga, pero no está comprendido por la presente invención, un método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con enfermedad cardiovascular, que comprende las etapas de

- 25 a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende las siguientes variables: el género del paciente, la edad del paciente, al menos un indicador de función miocárdica o rendimiento miocárdico, al menos dos indicadores de función renal o rendimiento renal, la frecuencia cardíaca del paciente, al menos un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre y al menos un indicador del metabolismo de calcio y/o fosfato en la sangre,
- 30 b) establecer el parámetro biológico en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular, en donde
- 35 i) el al menos un indicador de la función miocárdica o del rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen y/o por la concentración en sangre del paciente de uno o más péptidos natriuréticos, preferentemente por la concentración en sangre del paciente de uno o más péptidos natriuréticos, más preferentemente por la concentración en sangre del paciente del fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP),
- 40 ii) los al menos dos indicadores de la función renal o del rendimiento renal están definidos por la concentración en sangre del paciente de renina y cistatina C,
- 45 iii) el al menos un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total,
- 50 iv) el al menos un indicador del metabolismo del calcio en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de vitamina D<sub>3</sub>, preferentemente por la concentración en sangre del paciente de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>.

En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, la puntuación de riesgo de mortalidad puede ser una puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  y los parámetros biológicos se ponen en correlación por una suma de al menos cinco cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada  $X_1$ ,

- 55 en donde una primera cantidad es igual a 2 si la edad del paciente es igual o superior a 75 años y de lo contrario es igual a 0,
- 60 en donde una segunda cantidad es igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen,
- 65 en donde una tercera cantidad es igual a 1 si la concentración de HbA1c es igual o superior a 6,5 % para pacientes con diabetes conocida y de lo contrario es igual a 0,
- en donde una cuarta cantidad es igual a 1 si la concentración de creatinina sérica es igual o superior a 1,3 mg/dl y de

lo contrario es igual a 0 y

en donde una quinta cantidad es igual a 1 si la frecuencia cardíaca del paciente es igual o superior a 75 latidos por minuto y de lo contrario es igual a 0.

5 La puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  y/o  $X_{1a}$  se ha diseñado para un uso clínico óptimo y su cálculo se ejemplifica con detalle en los Ejemplos de la presente solicitud, en particular por los resultados de la Figura 3. En el contexto de la presente invención, sorprendentemente se ha encontrado que la puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  y/o  $X_{1a}$  tiene un fuerte valor predictivo para la mortalidad a 10 años con un estadístico C de 0,74 en la cohorte de desviación y de 0,7 en la cohorte de validación (ambos  $P < 0,001$  en comparación con la puntuación de riesgo convencional).

10 El conjunto anterior de parámetros biológicos en el método anterior para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con enfermedad cardiovascular, no comprendido por la presente invención, comprende además una variable en forma de un indicador del rendimiento del hígado. Es decir, el método anterior para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular comprende las etapas de

15 a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende al menos las siguientes variables: la edad del paciente, un indicador de rendimiento miocárdico, un indicador de rendimiento renal, la frecuencia cardíaca del paciente, un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre y un indicador del rendimiento del hígado,

20 b) establecer el parámetro biológico en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular.

25 En el método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, como el "indicador del rendimiento del hígado" se puede utilizar cualquier parámetro biológico que proporcione información sobre la función del hígado del paciente. La información del rendimiento del hígado puede, por ejemplo, obtenerse realizando ensayos en sangre de bioquímica clínica de laboratorio diseñados para proporcionar información sobre la función hepática del paciente. Los parámetros biológicos analizados pueden incluir, por ejemplo, PT/INR, aPTT, albúmina, bilirrubina (directa e indirecta) y otros tal como colinesterasa sérica. Estas pruebas están disponibles comercialmente y son una práctica convencional para el experto en la materia.

35 Sin embargo, en el contexto de la presente invención, El indicador de rendimiento hepático está definido por la concentración en sangre del paciente de colinesterasa sérica. Las pruebas para determinar la concentración de colinesterasa sérica en una muestra de sangre son una práctica convencional en la técnica y pueden incluir el análisis de los niveles de acetilcolinesterasa y pseudocolinesterasa. Generalmente, los valores normales de pseudocolinesterasa varían entre 8 y 18 unidades por mililitro (U/ml). Preferentemente, la concentración de colinesterasa sérica de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica se calcula y se indica en Unidades/ml.

40 Sorprendentemente, se ha encontrado que el cálculo de una puntuación de riesgo simplificada con o sin el parámetro biológico de la colinesterasa sérica mostró un valor predictivo similar en las cohortes de derivación y de validación y una discriminación comparable de la mortalidad, como se ejemplifica, por ejemplo, en la Figura 3 de la presente invención. Sin embargo, también se ha encontrado que las bajas concentraciones de colinesterasa sérica tienen un fuerte efecto inverso sobre la mortalidad con una razón de riesgos instantáneos de 0,57 por aumento de 1-DT en la cohorte de derivación y de 0,72 en la cohorte de validación, como se ejemplifica en los Ejemplos que incluyen la Tabla 1 de la presente invención.

50 Por lo tanto, los parámetros biológicos se pueden establecer en correlación mediante una suma de al menos seis cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada  $X_{1a}$ , en donde las cantidades primera a quinta están definidas como anteriormente y una sexta cantidad se establece en 1 si la concentración de colinesterasa sérica es igual o inferior a 4,4 Unidades/ml y, de lo contrario, es igual a 0.

55 Sorprendentemente, se ha encontrado que la combinación de al menos ocho y preferentemente nueve, biomarcadores disponibles de forma habitual que se pueden medir fácilmente con una sola extracción de sangre dieron como resultado una puntuación de biomarcadores aún mejor y, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, logrando un poder discriminatorio significativamente mejorado con un estadístico C de 0,78 y un índice de reclasificación neta (NRI, por sus siglas en inglés) de 14,9 % ( $P < 0,001$ ).

60 Por tanto, en un aspecto alternativo, los parámetros biológicos se ponen en correlación por una suma de al menos ocho cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada  $X_{1\#}$ , en donde una primera cantidad es igual a 2 si la edad del paciente es igual o superior a 75 años y de lo contrario es igual a 0, en donde una segunda cantidad es igual a 1 si la concentración del fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) es igual o superior a 400 ng/l, igual a 2 si la concentración de uno o más péptidos natriuréticos es igual o superior a 2000 ng/l y, de lo contrario, igual a 0,

65

en donde una tercera cantidad es igual a 1 si la concentración de glucohemoglobina HbA1c es igual o superior a 6,5 % para pacientes con diabetes conocida y, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una cuarta cantidad es igual a 1 si la concentración de renina es igual o superior a 50 pg/ml y, de lo contrario, es igual a 0,

5 en donde una quinta cantidad es igual a 1 si la concentración de cistatina C es igual o superior a 1,2 mg/l o, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una sexta cantidad es igual a 1 si la concentración de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> es igual o inferior a 10 ng/l y, de lo contrario, es igual a 0,

10 en donde una séptima cantidad es igual a 1 si la frecuencia cardíaca del paciente es igual o superior a 75 latidos por minuto y, de lo contrario, es igual a 0 y

en donde una octava cantidad es igual a 1 si el género del paciente es masculino y, de lo contrario, es igual a 0.

Preferentemente, el conjunto anterior de ocho parámetros biológicos comprende una variable adicional en forma de un indicador de la función miocárdica o del rendimiento miocárdico, en donde el indicador de función miocárdica o rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen y en donde los parámetros biológicos se ponen en correlación por una suma de al menos nueve cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada  $X_{1a\#}$ .

20 La novena cantidad está definida por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen, en donde la novena cantidad es igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen.

25 Se ha encontrado además que una puntuación de riesgo de mortalidad particular puede correlacionarse con una clase de riesgo de mortalidad particular, es decir, con una clase de riesgo de mortalidad bajo, una clase de riesgo de mortalidad intermedio (o moderado) y una clase de riesgo de mortalidad alto.

30 Esta clasificación es aplicable para todas las puntuaciones de riesgo de mortalidad, en particular para cualquiera de los puntuaciones de riesgo  $X_1$ ,  $X_{1a}$ ,  $X_{1\#}$  y/o  $X_{1a\#}$ , cuya clasificación se ejemplifica adicionalmente por los Ejemplos de la presente invención, en particular por las Figuras 3 y 6.

35 Usando la puntuación de riesgo simplificada  $X_1$ ,  $X_{1a}$ ,  $X_{1\#}$  o  $X_{1a\#}$ , el riesgo de mortalidad se calculó dividiendo el número de pacientes que fallecieron dentro de una ventana temporal determinada, en particular dentro del plazo de 10 años, por el número de pacientes que inicialmente se habían clasificado con esta puntuación de riesgo. De este modo, diferentes puntuaciones de riesgo podrían correlacionarse con diferentes riesgos de mortalidad, en particular con diferentes clases de puntuación de riesgo como se ejemplifica en los Ejemplos de la presente invención.

40 Por lo tanto, una puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  o  $X_{1a}$  igual a 0 indica un riesgo de mortalidad bajo, mientras que una puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  o  $X_{1a}$  igual a 1 o igual a 2 indica un riesgo de mortalidad intermedio y una puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  o  $X_{1a}$  igual o superior a 3 indica un riesgo de mortalidad alto.

45 En este caso, Un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad intermedio significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y el 50 %, preferentemente de aproximadamente el 40 %, mientras que un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 60 %.

50 De acuerdo con otro aspecto preferido, una puntuación de riesgo simplificada  $X_{1\#}$  o  $X_{1a\#}$  igual a 0 o igual a 1 indica un riesgo de mortalidad bajo, mientras que una puntuación de riesgo simplificada  $X_{1\#}$  o  $X_{1a\#}$  igual a 2 o igual a 3 indica un riesgo de mortalidad moderado y una puntuación de riesgo simplificada  $X_{1\#}$  o  $X_{1a\#}$  igual o superior a 4 indica un riesgo de mortalidad alto.

55 Un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad moderado significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y el 40 %, preferentemente por debajo del 40 %, mientras que un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 50 %.

En otra realización preferida de la presente invención, la puntuación de riesgo es una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  y los parámetros biológicos se ponen en correlación usando la siguiente fórmula, proporcionando, de este modo, la puntuación de riesgo ponderada  $X_2$ :

60 
$$X_2 = (\text{variable 1} - 4,14) * 2,33 + (\text{variable 2}) * 0,42 + (\text{variable 3} - 1,73) * -1,05 + (\text{variable 4} - 0,68) * 1,27 + (\text{variable 5} - 4,21) * 1,47 + (\text{variable 6} - 1,85) * 1,79,$$

en donde

65 la variable 1 está definida por el valor logarítmico de la edad del paciente en años,



la variable 2 está definida como igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está

5 definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección del ventrículo izquierdo considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen,

10 la variable 3 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de colinesterasa sérica en Unidades/ml,

la variable 4 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de creatinina sérica en mg/dl,

15 la variable 5 está definida por el valor logarítmico de la frecuencia cardíaca del paciente en latidos por minuto y

la variable 6 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total.

20 En este caso, los "valores numéricos en la fórmula que proporciona la puntuación de riesgo ponderada  $X_2$ " deben entenderse como los siguientes valores numéricos: 4,14, 2,33, 0,42, 1,73, -1,05, 0,68, 1,27, 1,47, 1,85 y 1,79.

Se prefiere, igualmente, que todos los valores numéricos en la fórmula que proporciona la puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  se definan sin ninguna desviación.

25 Además, en el contexto de la presente invención, todos los valores logarítmicos se calculan en la base e.

30 Al igual que con la puntuación de riesgo simplificada  $X_1$  y  $X_{1a}$ , sorprendentemente, se ha encontrado que también la puntuación de riesgo ponderada puede correlacionarse con diferentes clases de riesgo de mortalidad, preferentemente con una clase de riesgo de mortalidad bajo, una clase de riesgo de mortalidad intermedio y una clase de riesgo de mortalidad alto.

35 Por lo tanto, en una realización preferida del método de la presente invención, una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo de inferior o igual a 0 indica un riesgo de mortalidad bajo, una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo de 0 a 1 indica un riesgo de mortalidad intermedio y una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo de mayor o igual a 1 indica un riesgo alto o mortalidad, como se ejemplifica por los ejemplos de la presente invención.

40 En el contexto de la presente invención, debe entenderse que la expresión "igual a" puede comprender una desviación de  $\pm 0,5$ , preferentemente de  $\pm 0,25$ , más preferentemente de  $\pm 0,1$ .

45 Además, debe entenderse que aquellos pacientes con una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo de inferior o igual a 0 están incluidos en el 1<sup>er</sup> tercil de la cohorte o población dada (mínimo a 33<sup>er</sup> percentil), aquellos pacientes con una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo de 0 a 1 están incluidos en el 2<sup>o</sup> tercil de la cohorte (33<sup>er</sup> percentil a 66<sup>o</sup> percentil), mientras que aquellos pacientes con una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo de mayor o igual a 1 están incluidos en el 3<sup>er</sup> tercil de la cohorte (66<sup>o</sup> percentil al máximo).

50 El término "percentil" generalmente significa el valor de una variable por debajo del cual está incluido un determinado porcentaje de observaciones. Por ejemplo, el 33<sup>er</sup> percentil es el valor por debajo del cual se puede encontrar el 33 por ciento de las observaciones. En la presente invención, los valores de corte del 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> tercil se han determinado como se ejemplifica en los ejemplos de la presente invención.

55 En otra realización preferida más, la puntuación de riesgo es una puntuación de riesgo ponderada  $X_{2\#}$  y los parámetros biológicos se ponen en correlación usando la siguiente fórmula, proporcionando, de este modo, la puntuación de riesgo ponderada  $X_{2\#}$ .

$$X_{2\#} = (\text{variable } 1 - 4,151) * 2,69 + (\text{variable } 2 - 1,848) * 1,32 + (\text{variable } 3 - 4,221) * 0,633 + \text{variable } 4 * 0,182 + (\text{variable } 5 - 5,786) * 0,345 + (\text{variable } 6) * -0,495 + (\text{variable } 7 - 3,168) * 0,172 + (\text{variable } 8 - 2,688) * -0,492 + (\text{variable } 9 - 0,019) * 0,593,$$

60 en donde

65 la variable 1 está definida por el valor logarítmico de la edad del paciente en años,  
la variable 2 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total,  
la variable 3 está definida por el valor logarítmico de la frecuencia cardíaca del paciente en latidos por minuto,

la variable 4 está definida como igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen,

la variable 5 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente del fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B en ng/l,

la variable 6 está definida como igual a 1 si el género del paciente es masculino e igual a 0 si el género del paciente es femenino,

la variable 7 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de renina en pg/ml,

la variable 8 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> en ng/l,

la variable 9 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de cistatina C en mg/l.

En este caso, los "valores numéricos en la fórmula que proporciona la puntuación de riesgo ponderada X<sub>2#</sub>" deben entenderse como los siguientes valores numéricos: 4,151, 2,69, 1,848, 1,32, 4,221, 0,633, 0,182, 5,786, 0,345, -0,495, 3,168, 0,172, 2,688, -0,492, 0,019, 0,593.

Igualmente se prefiere que todos los valores numéricos en la fórmula que proporciona la puntuación de riesgo ponderada X<sub>2#</sub> se definan sin ninguna desviación.

Al igual que con la puntuación de riesgo simplificada X<sub>1#</sub> y X<sub>1a#</sub>, se ha encontrado en el contexto de la presente invención que también la puntuación de riesgo ponderada X<sub>2#</sub> puede correlacionarse con diferentes clases de riesgo de mortalidad, preferentemente con una clase de riesgo de mortalidad bajo, una clase de riesgo de mortalidad intermedio (o moderado) y una clase de riesgo de mortalidad alto.

Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, una puntuación de riesgo ponderada X<sub>2#</sub> en el intervalo de inferior o igual a 0 indica un riesgo de mortalidad bajo, una puntuación de riesgo ponderada X<sub>2#</sub> en el intervalo de 0 a 1 indica un riesgo de mortalidad intermedio (o moderado) y una puntuación de riesgo ponderada X<sub>2#</sub> en el intervalo de mayor o igual a 1 indica un riesgo alto o mortalidad.

En el contexto de la presente invención, la enfermedad cardiovascular es una arteriopatía coronaria estable.

La expresión "arteriopatía coronaria" o "CAD, por sus siglas en inglés" se refiere a una afección también conocida como cardiopatía aterosclerótica. Esta afección se caracteriza por la acumulación de placa aterosclerótica en las paredes de las arterias coronarias. Una vez que la acumulación excede un determinado nivel, se deteriora el flujo sanguíneo a través de la arteria. Esta afección causa angina de pecho y puede causar infarto de miocardio, especialmente si la placa se rompe. La intervención común para tratar la CAD comprende la intervención coronaria percutánea (PCI, por sus siglas en inglés) y la cirugía de revascularización coronaria.

En pacientes con "arteriopatía coronaria estable", la aterosclerosis se caracteriza por la proliferación fibrosa en arterias de tamaño mediano y grande, principalmente impulsada por la acumulación de lípidos y dando como resultado, eventualmente, la calcificación de la pared del vaso. En este caso, la aterosclerosis conduce a un estrechamiento luminal gradual durante décadas. Los pacientes con arteriopatía coronaria estable difieren significativamente en su pronóstico a largo plazo en comparación con los pacientes con síndromes coronarios agudos (ACS, por sus siglas en inglés). Es decir, en pacientes con CAD estable, la tasa de eventos cardiovasculares importantes es mucho menor con una tasa anual estimada de 1-2 %, con la consecuencia de que la predicción de riesgo a corto y mediano plazo es menos relevante. La información detallada sobre el cuadro clínico de la arteriopatía coronaria estable, incluida su terapia, se describe, por ejemplo, en las Pautas de atención médica de ICSI, 14a Edición 2011.

Como se encuentra en el contexto de la presente invención, las puntuaciones de riesgo calculadas por los métodos de la presente invención demostraron un excelente poder discriminatorio para determinar la supervivencia a 10 años con un valor de estadístico C de 0,77 (P < 0,001), proporcionando, de este modo, una capacidad discriminatoria para predecir la mortalidad a 10 años, que es significativamente mejor que aquellas puntuaciones de riesgo convencionales conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Marschner et al., 2001, J Am College Cardiol, 38: 56-63).

Por consiguiente, en una realización preferida adicional, la puntuación de riesgo de la presente invención es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos 3 años, preferentemente en los próximos 5 años, más preferentemente en los próximos 10 años.

En otra realización preferida más, la puntuación de riesgo determinada por los métodos de la presente invención es indicativa de un tratamiento de prevención secundaria, en donde dicho tratamiento es en forma de fármacos administrados.

Un tratamiento de prevención secundaria incluye la administración de una dosis terapéuticamente eficaz o un

compuesto farmacéuticamente activo en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo, un fármaco, que impide, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o afección mencionada en la presente memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y toxicidad del compuesto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50.

La pauta posológica la determinará el médico tratante y otros factores clínicos. Como se sabe bien en la técnica médica, la dosis para un paciente cualquiera depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área superficial corporal, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, estado general de salud y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica.

El término "fármaco" generalmente significa cualquier composición formulada en forma sólida, líquida (o gaseosa) que se puede administrar a un paciente. Dicha composición generalmente comprende un compuesto terapéuticamente activo opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados tales como diluyentes o vehículos o ingredientes adicionales. En este contexto, se distingue entre compuestos auxiliares, es decir, compuestos que no contribuyen a los efectos provocados por el compuesto tras la aplicación de la composición para su propósito deseado e ingredientes adicionales, es decir, compuestos que contribuyen a un efecto adicional o modulan el efecto del ingrediente terapéutico eficaz. Los diluyentes y/o vehículos adecuados dependen del propósito para el que se usará la composición y los otros ingredientes. El experto en la materia puede determinar tales diluyentes y/o vehículos adecuados sin más. Ejemplos de vehículos y/o diluyentes adecuados se divulgan en otra parte en el presente documento. Los fármacos adecuados para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tal como cápsulas, obleas, comprimidos o pastillas. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, un elixir o una emulsión.

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz del fármaco administrado es una dosis lo suficientemente grande como para producir el efecto terapéutico deseado para reducir el riesgo de mortalidad. Una cantidad eficaz no es, sin embargo, una dosis tan grande como para causar efectos secundarios adversos. De forma general, una cantidad eficaz puede variar con la edad del paciente, afección, peso corporal y sexo, así como la extensión de la afección a tratar y se puede determinar por un experto en la materia. La dosis puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Preferentemente, estos fármacos son para tratar la hiperlipidemia, para regular la presión arterial, para modificar la frecuencia cardíaca y/o para proporcionar control glucémico en pacientes diabéticos.

El término "hiperlipidemia" también se conoce en la técnica como "hiperlipoproteinemia" y/o "hiperlipidemia" y generalmente significa una enfermedad que implica niveles anormalmente elevados de cualquiera o de la totalidad de los lípidos y/o lipoproteínas en la sangre. Las hiperlipidemias se dividen en subtipos primaria y secundaria. La hiperlipidemia primaria generalmente se debe a causas genéticas (tal como una mutación en una proteína receptora), mientras que la hiperlipidemia secundaria surge debido a otras causas subyacentes tal como la diabetes. Las anomalías de lípidos y lipoproteínas son comunes en la población general y se consideran un factor de riesgo modificable para la enfermedad cardiovascular debido a su influencia en la aterosclerosis.

Preferentemente, tratar la hiperlipidemia significa un tratamiento que da como resultado una reducción de los lípidos y/o lipoproteínas en sangre del paciente, preferentemente en la reducción de la concentración de colesterol.

La expresión "control glucémico" generalmente se refiere a cualquier tratamiento médico que tenga como objetivo controlar los niveles de glucosa en sangre (azúcar en sangre) en una persona con diabetes mellitus. Los niveles de glucosa en sangre se pueden medir por medio de un medidor de glucosa, con el resultado indicado en mg/dl (miligramos por decilitro en EE. UU.) o mmol/l (milimoles por litro en Canadá y Europa) de sangre. El nivel promedio de glucosa de una persona sana es de alrededor de 4,5 a 7,0 mmol/l (80 a 125 mg/dl).

Ventajosamente, de acuerdo con las reivindicaciones, la presente invención proporciona métodos confiables para determinar el riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular. La identificación de pacientes con riesgo alto permite una monitorización más estrecha de este grupo para que los tratamientos preventivos se puedan administrar a aquellos pacientes con mayor necesidad. Esto sugiere medidas preventivas específicas de tratamiento secundario: los pacientes con un determinado riesgo de mortalidad intermedio (o moderado) o alto deben recibir terapias que tienen como objetivo, por ejemplo, reducir la concentración de colesterol en la sangre, reducir la concentración de glucosa en sangre del paciente o reducir la presión arterial del paciente. Por tanto, la presente invención contribuye al desarrollo de regímenes de tratamiento individualizados.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el segundo tratamiento de prevención es en forma de fármacos administrados, en donde los fármacos son para reducir la concentración en sangre del paciente de colesterol, para reducir la presión sanguínea del paciente y/o para reducir la concentración de glucosa en sangre del paciente.

El tratamiento de prevención secundaria se aplica preferentemente a pacientes para quienes los métodos de la presente invención han determinado un riesgo de mortalidad intermedio (o moderado) o un riesgo de mortalidad alto.

5 Por consiguiente, en una realización preferida, la puntuación de riesgo determinada por los métodos de la presente invención es indicativa de un tratamiento de prevención secundaria de pacientes con un riesgo de mortalidad intermedio (o moderado) o de pacientes con un riesgo de mortalidad alto.

10 Más preferentemente, el tratamiento de prevención secundaria se aplica con mayor intensidad en pacientes con un riesgo de mortalidad alto que en pacientes con un riesgo de mortalidad intermedio. En consecuencia, el tratamiento de prevención secundaria puede ser más intenso, cuanto mayor sea el riesgo de mortalidad del paciente que se ha determinado por los métodos de la presente invención.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de programa informático de acuerdo con las reivindicaciones que se puede cargar directamente en la memoria interna de un ordenador digital, que comprende partes del código del programa informático para implementar el cálculo de la puntuación de riesgo de mortalidad de acuerdo con la presente invención cuando dicho producto se ejecuta en un ordenador.

20 De acuerdo con la invención, se proporciona un producto de programa informático de acuerdo con las reivindicaciones para realizar uno de los métodos explicados anteriormente, cuando el producto se ejecuta en un ordenador. Se prefiere que el producto de programa informático se pueda cargar directamente en la memoria interna de un ordenador digital y que comprende partes del código del programa informático para implementar el cálculo de la puntuación de riesgo.

25 El producto de programa informático puede ser un programa de ordenador preferentemente almacenado en un medio de almacenamiento legible por máquina tal como RAM, ROM o en un CD-ROM extraíble, memoria flash, DVD o dispositivo USB. El programa informático se puede proporcionar en un servidor para descargarlo, por ejemplo, a través de una red de datos tal como Internet u otro sistema de transferencia como una línea telefónica o una conexión de transferencia inalámbrica. Además, o como alternativa, el producto de programa informático puede ser una red de programas informáticos implementados en el ordenador, tal como un sistema cliente/servidor o un sistema informático en la nube, un sistema integrado con un programa informático o un dispositivo electrónico tal como un teléfono inteligente o un ordenador personal en el que se almacena, carga, ejecuta, ejercita o desarrolla un programa informático.

35 En una implementación, la información sobre el conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente se introduce en un dispositivo de entrada de un ordenador, un sistema integrado, un dispositivo electrónico o un teléfono inteligente a través de un teclado, una pantalla táctil o una interfaz de voz. En otra implementación, la información sobre el conjunto de parámetros biológicos se mide mediante dispositivos de medición adecuados y se transmite a través de Internet u otro sistema de transferencia tal como una línea telefónica o una conexión de transferencia inalámbrica a una estación remota, tal como un ordenador.

40 En una implementación, la información sobre la puntuación de riesgo calculada se proporciona en un medio de salida, almacenado en un medio de memoria o transferido a una estación remota. En una realización, la información sobre la puntuación de riesgo se muestra en una pantalla o se muestra como medio de salida.

45 Preferentemente, el producto de programa informático comprende partes del código del programa informático para implementar el cálculo de las puntuaciones de riesgo ponderadas como se define en el contexto de la presente invención.

50 En otro aspecto preferido más, el producto de programa informático de la presente invención comprende partes del código del programa informático para implementar el cálculo de las puntuaciones de riesgo simplificadas  $X_1$ ,  $X_{1a}$ ,  $X_{1\#}$  y/o  $X_{1a\#}$  como se define en el contexto de la presente invención.

55 Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los métodos, las medidas y los términos realizados anteriormente se aplican mutatis mutandis para todos los aspectos descritos en la presente memoria descriptiva a continuación, salvo que se indique lo contrario.

Las siguientes Figuras y Ejemplos pretenden ilustrar diversas realizaciones de la presente invención. Como tal, las modificaciones específicas analizadas en los mismos no deben entenderse como limitaciones del alcance de la invención.

60 Figuras

65 **Figura 1:** Selección de variables mediante un procedimiento de remuestreo bootstrap basado en el análisis de regresión de Cox - Las variables seleccionadas en más del 80% de todas las repeticiones (barras negras) se incluyeron en el modelo multivariable final. Los valores de Hbalc de la población completa del estudio se usaron para el procedimiento de remuestreo bootstrap. Se excluyeron la glucosa en ayuno, el colesterol no HDL, el colesterol LDL, la hipertrigliceridemia y los triglicéridos, el hierro, la proteína, ASAT y ALAT, la proteína C-reactiva,

el tiempo de trombina, el volumen medio de plaquetas, el recuento de leucocitos y el recuento relativo de neutrófilos antes de la selección bootstrap debido a la estrecha correlación con otras variables que se introducen en la selección bootstrap. Un análisis post-hoc mostró que el tratamiento farmacológico que incluye aspirina, tienopiridinas, inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona, betabloqueantes y estatinas no calificarían para el modelo final.

Figura 2: Estimaciones de Kaplan-Meier de mortalidad por todas las causas en CAD estable - Estimaciones de Kaplan-Meier de mortalidad por todas las causas de acuerdo con terciles de la puntuación de riesgo VILCAD para CAD estable para la cohorte de derivación (A) y de validación (B, ambos  $P < 0,001$  entre todos los terciles, prueba de rango logarítmico)

Figura 3: predicción de riesgo de la puntuación de riesgo simplificada - Las barras muestran la mortalidad a 10 años estratificada por la puntuación simplificada en la cohorte de derivación (A, B) y de validación (C, D) con (A, C) o sin inclusión de colinesterasa (B, D). Se aplicaron los siguientes valores de corte para la generación de la puntuación simplificada:  
 [edad  $\geq 75$  años (82° percentil)=2] + [FEVI moderado =1, grave=2] + [HbA1c  $\geq 6,5$  % en pacientes con diabetes conocida (66° percentil)=1] + [creatinina  $\geq 1,3$  mg/dl (86° percentil)=1] + [frecuencia cardíaca  $\geq 75$  lpm (70° percentil)=1] + [colinesterasa  $\leq 4,4$  kU/l (10° percentil) =1 para A y C]. Percentiles derivados de la cohorte de derivación.

Figura 4: Selección de variables mediante un procedimiento de remuestreo bootstrap basado en el análisis de regresión de Cox (nivel de corte para la selección: 80 %) - Para evitar la colinealidad, se seleccionaron las siguientes variables para el procedimiento bootstrap debido a su valor predictivo univariado más alto (definido por la razón de riesgos instantáneos para el cambio de 1-DT derivada de la regresión de Cox) de grupos con correlaciones cercanas ( $r > 0,4$ ): Cistatina (NO seleccionada: BUN, creatinina, ADMA, SDMA, eGFRMDRD), ácidos grasos libres, triglicéridos LDL y acetilhidrolasa del factor act. de plaquetas (NO seleccionada: colesterol total, triglicéridos HDL, lipoproteína(a), glicerol libre, apolipoproteína AI, éster de colesterol HDL, fosfolípido HDL, colesterol HDL, éster de colesterol, colesterol LDL, apolipoproteína E, apolipoproteína B LDL, apolipoproteína B, fosfolípido LDL, triglicéridos, colesterol HDL libre, apolipoproteína C-III, a-Tocoferol, fosfolípido, apolipoproteína B VLDL, éster de colesterol VLDL, colesterol VLDL, colesterol LDL libre, colesterol VLDL libre, apolipoproteína A-II), índice de masa corporal (NO seleccionada: relación cintura-cadera), antitrombina III (NO seleccionada: retinol), licopeno (NO seleccionada: alfa\_carotina, beta-carotina, luteína + zeaxantina, todo trans beta-carotina, cis beta-carotina, beta\_criptoxantina), noradrenalina (NO seleccionada: adrenalina, hierro (NO seleccionada: ferritina, transferrina), eritrocitos (NO seleccionada: hematocrito, hemoglobina, MCV, MCH, MCHC), factor VII (NO seleccionada: factor VII activado), LH (NO seleccionada: FSH), IL-6 (NO seleccionada: hsCRP, fibrinógeno, amiloide A en suero, LBP), INR(Quick) (NO seleccionada: potencial de trombina endógena (ETP, por sus siglas en inglés), fragmento de protrombina 1+2, aPTT), 56 glucohemoglobina (NO seleccionada: glucosa en ayuno, glucosa 1 y 2h después de OGTT, insulina en ayunas, insulina 1 y 2h después de OGTT, proinsulina 1 y 2h después de OGTT, péptido C 1 y 2h después de OGTT), colinesterasa (NO seleccionada: gamma GT, ALT, AST, bilirrubina total), beta-crosslaps (NO seleccionada: osteocalcina), antígeno t-PA (NO seleccionada: actividad de t-PA, Actividad de PAI-1, antígeno PAI-1), NT propéptido natriurético cerebral (NO seleccionada: homoarginina), renina (NO seleccionada: aldosterona), T3 libre (NO seleccionada: T4 libre, TSH), vitamina B6 (NO seleccionada: ácido fólico, vitamina B12, vitamina B1), 25-hidroxi vitamina D (NO seleccionada: 1-25-dihidroxi vitamina); tiempo de protrombina quick; BUN, nitrógeno ureico en sangre; HDL, lipoproteína de alta densidad; IMC, índice de masa corporal; LDL, lipoproteína de baja densidad; ALT alanina-aminotransferasa; Se incluyeron variables con una alta razón de riesgos instantáneos univariada (NT pro-BNP, TnT, cistatina C, copeptina, neopterin) en el procedimiento de remuestreo bootstrapping a pesar de los coeficientes de correlación  $> 0,4$ . En caso de correlaciones cercanas, se probó la selección de las variables correspondientes con y sin la variable de correlación.

Figura 5: Estimaciones de mortalidad de Kaplan-Meier: estimaciones de Kaplan-Meier para terciles de puntuación de biomarcadores con (A, C) y sin FEVI (B, D) para mortalidad por todas las causas (A, B) y mortalidad cardiovascular (C, D) (todos  $P < 0,001$  entre todos los terciles, prueba de rango logarítmico).

Figura 6: predicción de riesgo de la puntuación de riesgo simplificada - Las barras muestran la mortalidad a 10 años estratificada por la puntuación de biomarcadores simplificada con (A) y sin FEVI (B). Se aplicaron los siguientes valores de corte para la generación de la puntuación simplificada:  
 [masculino= 1] + [edad  $\geq 75$  años (82° percentil) = 2] + [frecuencia cardíaca  $\geq 75$  lpm (70° percentil) = 1] + [FEVI moderado = 1, grave = 2] + [NT-pro-BNP  $> 400$  ng/l (58° percentil) = 1,  $> 2000$  ng/l (89° percentil) = 2] + [HbA1c  $\geq 6,5$  % en pacientes con diabetes conocida (66° percentil) = 1] + [renina  $> 50$  pg/ml (73<sup>er</sup> percentil) = 1] + [25-OH vitamina D<sub>3</sub>  $< 10$  ng/l (26° percentil) = 1] + [cistatina C  $> 1,2$  mg/l (84° percentil) = 1]. Percentiles derivados de la cohorte de derivación.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

Objetivo: Las puntuaciones anteriores de evaluación de riesgos para pacientes con arteriopatía coronaria (CAD) se han centrado en la prevención primaria y en los pacientes con síndrome coronario agudo. Sin embargo, especialmente en pacientes con CAD estable, mejorar la predicción de riesgo a largo plazo es crucial para aplicar de manera eficaz medidas de prevención secundaria. El objetivo fue crear una puntuación de predicción de mortalidad clínicamente aplicable para pacientes con CAD estable basándose en biomarcadores de laboratorio determinados de forma habitual y determinantes clínicos de prevención secundaria.

Métodos y Resultados: Se incluyeron de manera prospectiva 547 pacientes con CAD estable y una mediana de seguimiento de 11,3 años. Se seleccionaron factores de riesgo independientes utilizando bootstrapping basado en el análisis de regresión de Cox. Se seleccionaron la edad, función ventricular izquierda, colinesterasa sérica, creatinina, frecuencia cardíaca y HbA1c como predictores de mortalidad significativos para el modelo multivariable final. La puntuación de riesgo Vienna and Ludwigshafen Coronary Artery Disease (VILCAD) basándose en las variables anteriormente mencionadas demostró un excelente poder discriminatorio para la supervivencia a 10 años con un estadístico C de 0,77 ( $P < 0,001$ ), que fue significativamente mejor que una puntuación de riesgo establecida basándose en factores de riesgo cardiovascular convencionales (estadístico C = 0,61,  $P < 0,001$ ). La reclasificación neta confirmó una mejora significativa de la predicción de riesgo individual en un 34,8 % (intervalo de confianza del 95 %: 21,7-48,0 %) en comparación con la puntuación de riesgo convencional ( $P < 0,001$ ). La validación externa de la puntuación de riesgo en 1275 participantes en el Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) (mediana de seguimiento de 9,8 años) logró resultados similares (estadístico C = 0,73,  $P < 0,001$ ).

Conclusiones: La puntuación VILCAD basándose en un conjunto de factores de riesgo disponibles de forma habitual, en las medidas de la función cardíaca y en las comorbilidades supera a los algoritmos de predicción de riesgo establecidos y podría mejorar la identificación de pacientes de riesgo alto para un tratamiento más intensivo.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria inmunitaria crónica con presentación clínica estable e inestable (1). En pacientes con arteriopatía coronaria estable (CAD), la aterosclerosis se caracteriza por la proliferación fibrosa en arterias de tamaño mediano y grande, principalmente impulsada por la acumulación de lípidos y dando como resultado, eventualmente, la calcificación de la pared del vaso. En consecuencia, la aterosclerosis conduce a un estrechamiento luminal gradual durante décadas. En cambio, los síndromes coronarios agudos (ACS) están dirigidos por un componente dinámico, principalmente rotura de la placa aterosclerótica seguida de trombosis y oclusión coronaria (2). Aunque, CAD estable y ACS representan dos entidades de la misma enfermedad, difieren claramente en su pronóstico a largo plazo (3). En pacientes con ACS, los eventos cardiovasculares importantes se producen con frecuencia durante los meses siguientes. Por lo tanto, se han desarrollado diversas puntuaciones de evaluación de riesgos, incluyendo la puntuación de riesgo Platelet glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin (PURSUIT), la puntuación de riesgo de Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) o la puntuación de riesgo Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) (3). En pacientes con CAD estable, la tasa de eventos cardiovasculares importantes es mucho menor con una tasa anual estimada de 1 a 2 % (3, 4) y por tanto la predicción de riesgo a corto y medio plazo es menos relevante. En esta población de pacientes, es más importante contar con herramientas de diagnóstico suficientes para la estimación del riesgo acumulativo a largo plazo para garantizar una aplicación eficaz de medidas de prevención secundaria que incluyen la administración de fármacos durante toda la vida, asociada con tasas reducidas de reingreso y mortalidad general (5, 6). Sin embargo, actualmente no existe una puntuación de predicción de mortalidad establecida para pacientes con CAD estable. Hasta la fecha, solo una puntuación publicada por Marschner et al. que inicialmente se ha desarrollado para pacientes con ACS se ha propuesto para la predicción de riesgo en pacientes con CAD estable (3). Este puntuación de riesgo abarca factores de riesgo cardiovascular tal como la edad, género, hábito de fumar, hipertensión, diabetes y antecedentes de eventos cardiovasculares previos, pero no incluye marcadores de laboratorio, excepto los niveles de lipoproteína (7). Si bien estos factores de riesgo cardiovascular establecidos son cruciales para la estimación del riesgo del desarrollo de CAD, pueden ser importantes diferentes variables clínicas o de laboratorio para el resultado a largo plazo en pacientes con CAD manifiesta. De forma notable, la función renal y hepática puede ser relevante, particularmente si estos pacientes reciben un conjunto de fármacos durante décadas (8, 9).

El objetivo del estudio de los presentes inventores fue evaluar el poder predictivo independiente de los factores de riesgo clínicos conocidos y los biomarcadores de laboratorio probados de forma habitual para determinar la mortalidad a largo plazo en pacientes con CAD estable. Además, el objetivo de los presentes inventores era crear una puntuación de predicción de mortalidad clínicamente aplicable para esta población de pacientes específica basándose en un estricto procedimiento de selección estadística.

#### Métodos

##### Cohorte de derivación

Se incluyeron de manera prospectiva 1.152 pacientes con CAD consecutivos remitidos al Departamento de Cardiología del Hospital General de Viena entre noviembre de 1999 y agosto de 2000 (10). De éstos, se seleccionaron para este estudio 547 pacientes con CAD estable. El protocolo de estudio cumple con la Declaración de Helsinki y se aprobó por el Comité de Ética de la Universidad Médica de Viena.

Cohorte de validación

Se utilizó el estudio LUDwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) para la validación externa de la predicción de riesgo. El protocolo de estudio detallado se ha descrito previamente (11). En resumen, entre julio de 1997 y enero de 2000 se inscribieron 3500 pacientes remitidos al Centro del Corazón de Ludwigshafen para una angiografía coronaria. Para el propósito de este estudio, se seleccionaron 1275 pacientes con CAD comprobada que se presentaron en una condición estable.

Definiciones clínicas

La CAD estable se definió como evidencia angiográfica de estenosis de una arteria coronaria epicárdica de  $\geq 60\%$  en la cohorte de derivación y de  $\geq 50\%$  en la cohorte de validación. Se registraron factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, diabetes mellitus, tabaquismo actual y los trastornos de los lípidos de acuerdo con las directrices correspondientes (10). La fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) se estimó utilizando el método Simpson y se clasificó en normal ( $\geq 55\%$ ), levemente reducida (45-54%), moderadamente reducida (30-44%) y considerablemente reducida ( $< 30\%$ ). Las muestras de sangre se analizaron sin congelar según el procedimiento convencional de laboratorio local.

Estudio de criterios de valoración y seguimiento

El criterio de valoración principal del estudio fue la mortalidad por todas las causas y se obtuvo mediante la exploración del registro nacional de defunciones, incluida la exploración de la causa de la muerte (de acuerdo con la 10ª Revisión de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Relacionados). En la cohorte de derivación, se realizó un examen post mortem en el 34% de los pacientes para verificar la causa de la muerte. En la cohorte de validación (LURIC) se obtuvo información de los registros locales y se utilizaron certificados de defunción para clasificar quién falleció por causas cardiovasculares y no cardiovasculares como se describe anteriormente (12).

Análisis estadístico

Los datos continuos se presentaron como mediana e intervalo intercuartil, los datos discretos como recuentos y porcentajes. La prueba de Mann-Whitney-U y la prueba de chi-cuadrado se utilizaron para las comparaciones entre grupos, según fuera adecuado. Se aplicó el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el efecto de las variables sobre la supervivencia. Las variables continuas se sometieron a una transformación logarítmica antes de entrar en el análisis. Se utilizó un procedimiento de remuestreo bootstrap para identificar las variables que mejor se ajustan para el modelo de regresión de Cox multivariable. Antes de incluir variables en el procedimiento de bootstrapping, se evaluó la colinealidad entre biomarcadores utilizando coeficientes de correlación de Pearson (datos no mostrados). En caso de una estrecha correlación, solo el predictor univariado más fuerte de un grupo (definido por la razón de riesgos instantáneos univariado más alta para un aumento de 1 desviación típica (DT)) entró en el procedimiento de selección. Se eligieron muestras con un tamaño del 80% de la cohorte original para las repeticiones. Se realizaron 100 repeticiones con selección proactiva y 100 repeticiones con selección reactiva (con una  $P < 0,1$  para la selección). Las variables seleccionadas en más del 80% de todas las repeticiones se incluyeron en el modelo multivariable final. El poder discriminatorio de las puntuaciones de riesgo diseñadas se evaluó mediante el estadístico C de Harrell. Para un análisis posterior, se estratificó la cohorte por terciles de las puntuaciones de riesgo con múltiples marcadores. Se examinó una mejora de la predicción de riesgo individual mediante la mejora de reclasificación neta (NRI, por sus siglas en inglés) según lo descrito por Pencina et al. (13). Se aplicó el análisis de Kaplan-Meier (prueba del rango logarítmico) para verificar el poder discriminativo dependiente del tiempo de las puntuaciones de riesgo. Los valores de corte para una puntuación simplificada usando variables clasificadas se estimaron usando valores de chi-cuadrado derivados de los residuos de Martingala del modelo de Cox para todos los valores de corte posibles. Para un uso clínico optimizado, estos valores de corte calculados se redondearon y se evitaron los valores extremos. Se usaron valores P de dos colas  $< 0,05$  para indicar significación estadística. Se utilizaron SPSS 18.0 (IBM SPSS, EE. UU.) y STATA 11 (StataCorp LP, EE. UU.) para todos los análisis.

Resultados

Características basales y análisis de supervivencia univariado: Se inscribió de manera prospectiva a 547 pacientes con CAD estable en la cohorte de derivación (Viena) de los presente inventores. El treinta y nueve por ciento de todos los pacientes ( $n = 211$ ) fallecieron durante una mediana de seguimiento de 11,3 años (IQR, por sus siglas en inglés: 6,9-11,5) correspondiente a 4974 años-persona generales de seguimiento. El cincuenta y siete por ciento de las muertes en pacientes se debieron a causas cardiovasculares. La cohorte de validación (LURIC) incluye 1275 pacientes con CAD estables inscritos de manera prospectiva con una mediana de seguimiento de 9,8 años (IQR 7,0-10,5). De estos pacientes, el 35% ( $n = 499$ ) falleció durante el período de observación (criterio de valoración primario), el 51% falleció por causas cardiovasculares. Las características basales de ambas cohortes de estudio se muestran en la Tabla 1 complementaria. En el análisis univariado, los factores de riesgo adversos más fuertes para el resultado a largo plazo en pacientes con CAD estable fueron la edad con una razón de riesgos instantáneos (HR, por sus siglas en inglés) de 1,94 por aumento de 1-DT en la cohorte de derivación y una HR de 1,84 en la cohorte de validación y FEVI con una HR de 1,67 para una reducción de una categoría semicuantitativa en la cohorte de derivación y una HR

de 1,75 en la cohorte de validación, respectivamente. La colinesterasa tuvo un fuerte efecto inverso sobre la mortalidad con una HR de 0,57 por aumento de 1-DT en la cohorte de derivación y de 0,72 en la cohorte de validación (Tabla 1).

5 Resultados de bootstrapping y análisis de supervivencia multivariable: Después de la selección de variables por una técnica de bootstrapping se seleccionaron la edad, FEVI, colinesterasa sérica, creatinina, frecuencia cardíaca y HbA1c como predictores de mortalidad significativos para el modelo multivariable final (Figura 1). En este modelo multivariable, la edad y FEVI permanecieron como los factores de riesgo adversos más fuertes y la colinesterasa como el factor de riesgo inverso más fuerte (Tabla 1).

10 Diseño de puntuación de riesgo y validación interna: En una segunda etapa, se calculó una puntuación de riesgo ponderada, la puntuación de riesgo Vienna and Ludwigshafen Coronary Artery Disease (VILCAD), para la supervivencia a 10 años utilizando las variables mencionadas anteriormente obtenidas mediante el procedimiento de bootstrapping (consultese el Método 1 complementario para la fórmula). El estadístico C demostró un excelente poder discriminatorio de la puntuación de riesgo VILCAD para la supervivencia a 10 años con un valor de 0,77 ( $P < 0,001$ ).

15 La capacidad discriminatoria de la puntuación de los presentes inventores para predecir la mortalidad a 10 años fue significativamente mejor que la de una puntuación de riesgo convencional publicada por Marschner et al. (Estadístico C 0,61;  $P < 0,001$  para la comparación de las dos puntuaciones) (7). El valor predictivo de la nueva puntuación con múltiples marcadores también fue superior al de la puntuación GRACE (estadístico C = 0,67;  $P < 0,001$  para la comparación entre las dos puntuaciones) (14). El análisis de Kaplan Meier confirmó un alto poder discriminatorio al representar gráficamente terciles de la puntuación de riesgo VILCAD ( $P < 0,001$  entre todos los terciles, Figura 2A) con tasas de supervivencia a 10 años del 90 %, 75 % y 33 % en el primer, segundo y tercer tercil de la puntuación. La NRI mostró una mejora en la clasificación de riesgo individual del 34,8 % (intervalo de confianza [IC] del 95 %: 21,7-48,0 %) en comparación con la puntuación de riesgo convencional publicada por Marschner et al. (7) (Tabla 2,  $P < 0,001$ ). Con respecto a la mortalidad cardiovascular, se observó una tendencia comparable para la supervivencia a 10 años, con tasas de supervivencia del 94 %, 86 % y 52 % en el primer, segundo y tercer tercil de la nueva puntuación de riesgo ( $P < 0,001$  entre todos los terciles).

Validación externa: Se validó la puntuación de riesgo con múltiples marcadores de los presentes inventores en la población de estudio LURIC (11). Un estadístico C de 0,73 confirmó el poder discriminatorio fuerte y superior de la puntuación de riesgo de los presentes inventores para predecir la mortalidad a largo plazo ( $P < 0,001$  para comparaciones con los estadísticos C de 0,64 para la puntuación de riesgo Marschner (7) y de 0,61 para la puntuación de riesgo GRACE (14)). El análisis de Kaplan Meier confirmó un alto valor discriminatorio al trazar terciles de la nueva puntuación de riesgo ( $P < 0,001$  entre todos los terciles, Figura 2B) con tasas de supervivencia a 10 años del 85 %, 73 % y 37 % en el primer, segundo y tercer tercil de la puntuación. Con respecto a la mortalidad cardiovascular, se observó una tendencia comparable para la supervivencia a 10 años, con tasas de supervivencia del 93 %, 83 % y 52 % en el primer, segundo y tercer tercil de la puntuación de riesgo VILCAD ( $P < 0,001$  entre todos los terciles). Una NRI de 14,8 % (IC del 95 % 6,5-23,2 %) confirmó una mejora significativa de la clasificación de riesgo individual en la cohorte de validación en comparación con la puntuación de riesgo convencional de Marschner et al. ( $P < 0,001$ , Tabla 2).

#### 40 Puntuación simplificada

Finalmente, se diseñó una puntuación de riesgo simplificada para un uso clínico óptimo. Este puntuación se basó en las mismas variables que la puntuación de riesgo VILCAD. Las variables continuas se dicotomizaron de acuerdo con los niveles de corte óptimos, como se describe en la Figura 3. Se asignaron dos puntos a las variables edad y FEVI con el valor predictivo más fuerte. Esta puntuación de riesgo con múltiples marcadores simplificada aún tenía un fuerte valor predictivo para la mortalidad a 10 años con un estadístico C de 0,74 en la cohorte de derivación y de 0,70 en la cohorte de validación (ambos  $P < 0,001$  en comparación con la puntuación de riesgo convencional). La puntuación simplificada mostró un valor altamente discriminatorio con una mortalidad a 10 años del 11% en pacientes con 0 puntos y del 89 % en pacientes con al menos 5 puntos en la cohorte de derivación y una dispersión similar en la cohorte de validación (Figura 3A y 3C). Como la colinesterasa puede no estar disponible en todos los centros, también se calculó una puntuación de riesgo simplificada sin colinesterasa, que mostró un valor predictivo similar en la cohorte de derivación y de validación y una discriminación comparable del riesgo de mortalidad (Figura 3B y D).

55 Análisis: Se desarrolló una puntuación con múltiples marcadores para pacientes con CAD estable que proporciona un excelente poder discriminatorio para la predicción de la supervivencia a 10 años. El conjunto final de seis variables se seleccionó mediante un estricto procedimiento de remuestreo bootstrap de 48 variables clínicas y biomarcadores disponibles de forma habitual que reflejan una amplia gama de vías fisiopatológicas relevantes, determinantes de cardiopatía y comorbilidades. La relevancia clínica de la puntuación VILCAD se enfatizó adicionalmente por una mejora significativa de la reclasificación neta en un 34,8 %, que refleja la proporción de individuos, que pueden beneficiarse de una predicción de riesgo mejorada en comparación con una puntuación de riesgo convencional. Lo que es más importante, se realizó adicionalmente una validación externa de la puntuación de riesgo de los presentes inventores en la población del estudio LURIC (11), un gran estudio prospectivo de cohortes europeo y se obtuvieron resultados comparables que confirman la precisión de la puntuación de riesgo de los presentes inventores. A pesar de la gran cantidad de puntuaciones de riesgo publicadas, la transportabilidad del modelo rara vez se ha evaluado en poblaciones de estudio externas, pero es crucial para la evaluación objetiva y crítica de las puntuaciones de riesgo en evolución



(15).

Los puntuaciones de evaluación de riesgos anteriores para pacientes con CAD se han centrado predominantemente en los pacientes de riesgo alto que presentan ACS, que varían desde la puntuación de riesgo PURSUIT sobre la puntuación de riesgo TIMI hasta la puntuación de riesgo GRACE (3). En comparación, el área bajo la Curva Operativa del Receptor (AUC, por sus siglas en inglés) de las puntuaciones de riesgo TIMI, PURSUIT y GRACE variaron de 0,69 a 0,79 para la predicción de mortalidad en poblaciones con ACS. En contraste con el presente estudio, estas puntuaciones de riesgo se basaron en tiempos de seguimiento relativamente cortos de un año y utilizaron las curvas características operativas del receptor menos estrictas en lugar del estadístico C recomendado (16). En la población de estudio de los presentes inventores, la puntuación GRACE solo alcanzó un estadístico C de 0,67 en la cohorte de derivación y de 0,61 en la cohorte de validación y fue claramente más débil que la puntuación VILCAD presentada. Cada vez hay más pruebas de que los pacientes con CAD estable difieren significativamente de los pacientes con ACS en términos de morfología de la placa y grado de afectación de las arterias coronarias (17-19). Por lo tanto, es probable que diferentes factores de riesgo puedan ser relevantes con respecto a la predicción de mortalidad a largo plazo. Por tanto, las puntuaciones de riesgo de ACS pueden no ser aplicables a pacientes con CAD estable. Sin embargo, la información sobre la predicción a largo plazo de pacientes con CAD estable establecida es escasa (20) y, hasta donde saben los presentes inventores, no hay una puntuación de predicción de mortalidad establecida para pacientes con CAD estable (3). Una puntuación de riesgo previa publicada por Marschner et al. incluyó pacientes con CAD con un evento cardíaco agudo de 3 a 36 meses antes de la inclusión y recientemente se ha propuesto como puntuación de evaluación de riesgo para pacientes con CAD estable (3, 7). La aplicación de la puntuación de Marschner en la cohorte de los presentes inventores dio como resultado un estadístico C de 0,61 en la cohorte de derivación y de 0,64 en la cohorte de validación, que fue sorprendentemente más bajo que el estadístico C logrado con la nueva puntuación VILCAD ( $P < 0,001$  para ambas cohortes). Recientemente, se ha publicado otra puntuación con múltiples marcadores para CAD estable que integra los nuevos biomarcadores fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B, factor de diferenciación de crecimiento 15, región media del péptido natriurético auricular, cistatina C y la región media de proadrenomedulina (21). Si bien se supone que la integración de un conjunto integral de patomecanismos potencialmente relevantes mejora la predicción de riesgo, la puntuación mencionada anteriormente arrojó una AUC de solo 0,69 con respecto a una mediana de seguimiento de 3,6 años. Los costes adicionales para la determinación de nuevos biomarcadores pueden limitar el uso de la puntuación anteriormente mencionada en la práctica clínica.

La importancia relativa de los factores de riesgo cardiovascular establecidos difiere en pacientes con CAD manifiesta en comparación con las estrategias de prevención primaria (5). Además de los factores de riesgo cardiovascular establecidos, cobran importancia los determinantes de cardiopatía, tal como función ventricular izquierda, frecuencia cardíaca, ECG normal, enfermedad de múltiples vasos y el estado de revascularización coronaria en la predicción de riesgo secundario (3, 22, 23). Además, la función hepática y renal puede afectar el tratamiento con medicación cardíaca establecida y el resultado de pacientes con CAD estable (8, 9). Por consiguiente, puede ser importante una amplia gama de marcadores clínicos y de laboratorio fácilmente disponibles y se incluyeron en el procedimiento de bootstrapping. El modelo final seleccionado por un método estadístico estricto abarcaba la edad, los parámetros cardíacos (FEVI y frecuencia cardíaca), la función renal (creatinina), la función hepática (CHE) y HbA1c, una medición metabólica del control glucémico deficiente en pacientes diabéticos. Si bien se confirmó la importancia ya conocida de la edad, FEVI, frecuencia cardíaca, creatinina y HbA1c en la enfermedad cardiovascular, el papel de la colinesterasa está menos establecido. La colinesterasa sérica es una enzima colinesterasa inespecífica que hidroliza diferentes ésteres de colina y se ha implicado previamente en el desarrollo de CAD (24). Un estudio previo de Calderon-Margalit et al. demostró que la colinesterasa podría ser un factor de riesgo inespecífico de mortalidad (24). Además, un análisis del grupo de los presentes inventores demostró una fuerte asociación entre la disminución de colinesterasa y el resultado a largo plazo en pacientes con CAD, que fue más fuerte en pacientes con CAD estable que en aquellos con ACS (25).

A pesar de su precisión comprobada de forma repetida (26), las puntuaciones de riesgo se infrutilizan en la práctica clínica principalmente debido a limitaciones de tiempo. Por lo tanto, también se desarrolló una puntuación con múltiples marcadores simplificada optimizada para uso clínico basándose en las variables seleccionadas por el procedimiento de bootstrapping. La puntuación con múltiples marcadores simplificada divide los marcadores solo en dos o tres categorías basándose en los valores de corte optimizados como se difundió recientemente por Kooter et al. (27). A diferencia de las puntuaciones de riesgo más complejas, esta puntuación de riesgo con marcadores múltiples simplificada se puede calcular convenientemente a mano sin el uso de una calculadora. Este puntuación de riesgo simplificada es rentable ya que comprende mediciones de laboratorio determinadas de forma habitual y datos clínicos convencionales. La puntuación simplificada aún tenía un resultado predictivo competitivo que daba como resultado un estadístico C de 0,74 en la cohorte de derivación y de 0,70 en la cohorte de validación, que se ilustra mediante la siguiente comparación: Un paciente de 74 años con CAD estable, una creatinina de 1,5 mg/dl, pero ninguno de los otros predictores de riesgo incluidos alcanzaría 1 punto en la puntuación de los presentes inventores y tendría un riesgo de muerte del 37 % durante los siguientes 10 años (Figura 3). Por el contrario, un paciente de 77 años con una FEVI considerablemente reducida y una HbA1c de 6,8 % (5 puntos) esperaría un riesgo de muerte del 89 % en los próximos diez años. El uso de puntuaciones fácilmente aplicables es importante ya que un informe anterior ha demostrado que los puntuaciones con múltiples marcadores mejoran la precisión de la predicción de riesgo en comparación con el único juicio clínico del médico tratante (16). La sensibilización del riesgo de un paciente puede

tener consecuencias importantes en la elección de las opciones de tratamiento. Las opciones de tratamiento agresivo pueden estar infrutilizadas ya que los pacientes de riesgo alto pueden no ser reconocidos debido a una evaluación de riesgo imprecisa (16).

5 Limitaciones: Los presentes inventores son conscientes de las siguientes limitaciones del estudio de los presentes inventores: la cohorte de pacientes fue reclutada en un centro de atención terciaria afiliado a la universidad con una  
 10 unidad de cateterismo cardíaco de alto volumen y, por lo tanto, puede no ser representativa de pacientes con CAD estable en general. Además, los pacientes se incluyeron en el estudio entre 1999 y 2000. Desde entonces, se han modificado las estrategias de prevención secundaria (p. ej., endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos, directrices de implantación de desfibriladores cardioversores automatizados, terapia de resincronización cardíaca y modificación de la frecuencia cardíaca). Estas nuevas estrategias de prevención pueden afectar la precisión de la puntuación de riesgo de los presentes inventores. Además, pueden estar disponibles diferentes marcadores de laboratorio en diferentes sistemas de atención médica. No obstante, el resultado de la puntuación fue fuerte cuando se excluyeron variables tales como la colinesterasa, que pueden no estar disponibles de forma habitual en otros  
 15 centros. Los ensayos de troponina T de tercera generación no estaban disponibles al momento de la inscripción al estudio. Sin embargo, las anomalías variables del ECG que sugieren isquemia (clínicamente silenciosa) no se seleccionaron para el modelo final. Además, el péptido natriurético cerebral no se midió de forma habitual en pacientes con CAD estable. Sin embargo, la función miocárdica medida por ecocardiografía se seleccionó con mayor frecuencia y fue uno de los factores de riesgo más fuertes en el modelo final. Si bien estos biomarcadores en evolución pueden mejorar la predicción de mortalidad a largo plazo, raramente se ha logrado un estadístico C mayor de 0,77 para la mortalidad a largo plazo. Por lo tanto, es improbable que el valor predictivo de la nueva puntuación VILCAD mejore significativamente con un solo biomarcador. Finalmente, el análisis de la reclasificación neta está limitado por la falta de categorías de riesgo generalmente aceptadas para determinar la mortalidad a largo plazo en esta cohorte de  
 20 pacientes.

25 Conclusión: Un conjunto distinto de variables clínicas y de laboratorio parecen ser relevantes para determinar la supervivencia a largo plazo de los pacientes que presentan CAD estable. La puntuación VILCAD presentada llena un vacío en la predicción de riesgo de estos pacientes.

30 Las variables seleccionadas abarcan la edad, función cardíaca, renal y hepática y HbA1c, una medida de diabetes mal controlada. La puntuación de riesgo presentada puede mejorar la precisión de la predicción de supervivencia como lo demuestra su alto poder discriminatorio y su confirmación en una cohorte de validación externa. Se puede especular que la predicción de riesgo mejorada puede ayudar a adaptar más específicamente las posibles opciones de tratamiento en la prevención secundaria de CAD y seleccionar específicamente pacientes de riesgo alto que pueden beneficiarse de un tratamiento intensificado.  
 35

Tabla 1: Efectos no ajustados y ajustados sobre la mortalidad - Modelo de los riesgos proporcionales de Cox de variables seleccionadas por bootstrapping.

40 Las razones de riesgos instantáneos (HR) se refieren a un aumento de 1 - DT en variables continuas y a una reducción de una categoría de FEVI. Las HR se ajustan (aj.) para todas las variables seleccionadas por bootstrapping, es decir, por edad, FEVI, colinesterasa sérica, creatinina, frecuencia cardíaca y HbA1c. DT: desviación típica.

Población de estudio Vienna (n = 547)

	DT	HR bruta (IC del 95 %)	Valor p	Aj. HR (IC del 95 %)	Valor p
Edad	11,74	1,94 (1,62-2,32)	< 0,001	1,64 (1,37-1,95)	< 0,001
FEVI		1,67 (1,48-1,88)	< 0,001	1,51 (1,34-1,72)	< 0,001
Colinesterasa	1,43	0,57 (0,50-0,66)	< 0,001	0,77 (0,68-0,87)	< 0,001
Creatinina	0,31	1,44 (1,30-1,59)	< 0,001	1,31 (1,18-1,46)	< 0,001
Frecuencia cardíaca	13,62	1,56 (1,36-1,79)	< 0,001	1,30 (1,12-1,50)	< 0,001
HbA1c	1,13	1,36 (1,22-1,51)	< 0,001	1,32 (1,17-1,49)	< 0,001

Población de estudio LURIC (n = 1275)

	DT	HR bruta (IC del 95 %)	Valor p	Aj. HR (IC del 95 %)	Valor p
	9,30	1,84 (1,64-2,07)	< 0,001	1,74 (1,53-1,97)	< 0,001
		1,75 (1,60-1,91)	< 0,001	1,57 (1,43-1,73)	< 0,001
	1,30	0,72 (0,67-0,79)	< 0,001	0,85 (0,78-0,93)	< 0,001
	0,49	1,28 (1,20-1,37)	< 0,001	1,20 (1,10-1,30)	< 0,001
	12,45	1,31 (1,19-1,43)	< 0,001	1,19 (1,08-1,31)	< 0,001
	1,30	1,43 (1,32-1,55)	< 0,001	1,30 (1,19-1,42)	< 0,001

- 5 Tabla 2: Tabla de reclasificación - Tabla de reclasificación que compara la puntuación de riesgo VILCAD ponderada con la puntuación de riesgo convencional de Marschner et al., 2001.

Cohorte de Derivación (Viena)

	Puntuación de Riesgo Convencional	puntuación de riesgo VILCAD				
		Clase de riesgo	Bajo	Moderado	Alto	Total
Sin evento (n=337)	Bajo		62 % (76)	29 % (36)	9 % (11)	100 % (123)
	Moderado		41 % (48)	41 % (47)	18 % (21)	100 % (116)
	Alto		38 % (37)	42 % (41)	20 % (20)	100 % (98)
Evento (n=210)	Bajo		11 % (4)	37 % (13)	51 % (18)	100 % (35)
	Moderado		13 % (10)	25 % (20)	62 % (49)	100 % (79)
	Alto		8 % (8)	26 % (25)	66 % (63)	100 % (96)

10

Cohorte de Validación (LURIC)

	Puntuación de Riesgo Convencional	puntuación de riesgo VILCAD				
		Clase de riesgo	Bajo	Moderado	Alto	Total
Sin evento (n=826)	Bajo		58 % (227)	32 % (124)	10 % (40)	100 % (391)
	Moderado		34 % (85)	47 % (118)	19 % (49)	100 % (252)
	Alto		28 % (51)	38 % (69)	34 % (63)	100 % (183)
Evento (n=449)	Bajo		25 % (28)	33 % (37)	43 % (48)	100 % (113)
	Moderado		19 % (26)	29 % (39)	53 % (72)	100 % (137)
	Alto		07 % (13)	24 % (47)	70 % (139)	100 % (199)

15

Tabla 1 complementaria: Características basales de pacientes con arteriopatía coronaria estable de la población de estudio de los presentes inventores (n = 547) y de la población de estudio LURIC (n = 1275). Las variables continuas se dan como mediana (intervalo intercuartil [IQR]). Fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI); las anomalías del ECG están definidas como desviación del segmento ST y/o inversión de la onda T; lpm latidos por minuto.

	Población de estudio (n = 547)	Población de estudio LURIC (n = 1275)	valor p
Se seleccionaron la edad, años de la mediana (IQR)	64 (56-73)	65 (58- 71)	0,733
Género masculino, n (%)	404 (74 %)	962 (75 %)	0,472
IMC, kg/m <sup>2</sup> (IQR)	27,0 (24,7-29,4)	27,2 (24,7- 29,8)	0,411
Enfermedad de múltiples vasos, n (%)	402 (74 %)	745 (58 %)	0,185
Presión sanguínea sistólica, mmHg (IQR)	135 (120-150)	145 (128- 161)	< 0,001
Frecuencia cardíaca, lpm (IQR)	68 (60-77)	68 (60- 77)	0,282
FEVI			
≥ 55 %, n (%)	371 (68 %)	778 (61 %)	0,006
45-54 %, n (%)	64 (12 %)	207 (16 %)	0,013

(continuación)

	Población de estudio (n = 547)	Población de estudio LURIC (n = 1275)	valor p
30-44 %, n (%)	51 (09 %)	177 (14 %)	0,007
<30 %, n (%)	58 (11 %)	68 (5 %)	< 0,001
Anomalías del ECG, n (%)	250 (46 %)	351 (28 %)	< 0,001
Medicación			
Inhibidores plaquetarios, n (%)	465 (85 %)	1252 (98 %)	< 0,001
Ácido acetil salicílico, n (%)	440 (80 %)		
Tienopiridinas, n (%)	226 (41 %)		
Antagonistas de vitamina K n (%)	49 (09 %)	101 (07 %)	0,441
Beta bloqueante, n (%)	343 (63 %)	778 (61 %)	0,415
bloqueantes de Inhibidor de la ACE /receptor de angiotensina II, n (%)	354 (65 %)	727 (57 %)	0,004
Digitálicos, n (%)	70 (13 %)	217 (17 %)	0,067
Nitritos, n (%)	247 (45 %)	359 (28 %)	< 0,001
Estatinas, n (%)	363 (66 %)	624 (49 %)	< 0,001
Hipertensión, n (%)	379 (69 %)	807 (63 %)	0,014
Fumadores actuales, n (%)	221 (40 %)	192 (15 %)	< 0,001
Antecedentes familiares de CAD, n (%)	206 (38 %)	456 (36 %)	0,441
Accidente cerebrovascular previo, n (%)	24 (04 %)	132 (10 %)	< 0,001
Diabetes, n (%)	155 (28 %)	451 (35 %)	0,003
HbA1c, mg/dl (IQR)	6,1 (5,7-6,7)	6,1 (5,7- 6,8)	0,620
Glucosa, mg/dl (IQR)	107 (95-134)	94 (84- 111)	< 0,001
Hipercolesterolemia, n (%)	372 (68 %)	848 (67 %)	0,533
Colesterol total, mg/dl (IQR)	200 (168-228)	207 (180- 237)	< 0,001
colesterol LDL, mg/dl (IQR)	121 (95-150)	114 (93- 138)	< 0,001
colesterol HDL, mg/dl (IQR)	45 (38-56)	37 (32- 45)	< 0,001
Lp (a), mg/dl (IQR)	14 (< 12-34)	16,2 (7- 41)	< 0,001
Hipertrigliceridemia, n (%)	225 (41 %)	596 (47 %)	0,027
Triglicéridos, mg/dl (IQR)	131 (94-194)	144 (108- 198)	0,001
Magnesio, mmol/l (IQR)	0,79 (0,75-0,85)	0,85 (0,79- 0,91)	< 0,001
Hierro, µg/dl (IQR)	88 (69-115)	91 (70- 115)	0,233
Creatinina, mg/dl (IQR)	1,04 (0,94-1,18)	0,9 (0,8- 1,1)	< 0,001
Ácido úrico, mg/dl (IQR)	6,4 (5,4-7,4)	4,9 (4,1- 6,0)	< 0,001
Bilirrubina total, mg/dl (IQR)	0,64 (0,47-0,86)	0,6 (0,4- 0,8)	< 0,001
Proteína, g/l (IQR)	74,4 (70,5-77,7)	6,9 (6,6- 7,3)	< 0,001
Albumina, g/l (IQR)	42,8 (40,0-46,2)	44,0 (41,0- 48,0)	< 0,001
Colinesterasa, kU/l (IQR)	5,81 (4,98-6,76)	5,81 (4,94- 6,68)	0,692
ASAT, U/l (IQR)	10 (8-13)	10 (8- 12)	0,06
ALAT, U/l (IQR)	13 (9-18)	12 (9- 17)	0,04
Gamma-GT, U/l (IQR)	19 (11-32)	17 (11- 29)	0,168
proteína C-reactiva, mg/dl (IQR)	< 0,5 (< 0,5- < 0,5)	0,36 (0,09- 0,79)	< 0,001

(continuación)

	Población de estudio (n = 547)	Población de estudio LURIC (n = 1275)	valor p
APTT, s (IQR)	34,2 (31,6-37,9)	33,0 (31,0- 36,0)	< 0,001
Tiempo de trombina, s (IQR)	14,3 (13,7-15)		
Fibrinógeno, mg/dl (IQR)	367 (314-424)	371 (319- 436)	0,122
Hematocrito, % (IQR)	40,6 (38,0-42,7)	40,9 (38,2- 43,6)	0,016
Plaquetas, 1000/μl (IQR)	220 (183-261)	218 (182- 262)	0,859
Volumen medio de plaquetas, fl (IQR) 10,7 (10,0-11,3)		9,0 (8,3- 9,6)	< 0,001
Leucocitos, 1000/μl (IQR)	6,8 (5,7-8,1)	6,72 (5,65- 8,1)	0,954
% de rel. de Linfocitos (IQR)	25,6 (19,3-31,7)	26,4 (21,3- 32,0)	0,054
% de rel. de Neutrófilos (IQR)	64,6 (58,7-72,0)	60,5 (54,3- 66,3)	< 0,001
TSH, μIU/ml (IQR)	1,27 (0,83-1,81)	1,21 (0,73- 1,81)	0,109
fT4, ng/dl (IQR)	1,35 (1,22-1,49)	1,35 (1,23- 1,49)	0,665

Método 1 complementario: Generación de la Puntuación de Riesgo con Múltiples Marcadores Ponderada

General:

5 Puntuación de riesgo ponderada = [V1 - media de V1] \* coeficiente beta de V1 + [V2 - media de V2] \* coeficiente beta de V2 + [V3 - media de V3] \* coeficiente beta de V3 + + [Vn - media de Vn ] \* coeficiente beta de Vn.

Puntuación de Riesgo Ponderada:

10 = (edad - 4,14) \* 2,33 + FEVI \* 0,42 + (colinesterasa - 1,73) \* - 1,05 + (creatinina - 0,68) \* 1,27 + (frecuencia cardíaca - 4,21) \* 1,47 + (HbA1c - 1,85) \* 1,79

15 Los coeficientes beta derivaron de un modelo de regresión de Cox multivariable que incluye todas las variables del modelo correspondiente. Las variables continuas se transformaron logarítmicamente antes de su inclusión en la puntuación; n: número de variables de la puntuación de riesgo correspondiente; V: variable.

Método 2 complementario: Estadísticas de cohorte de Viena y LURIC

20

Cohorte de Viena		
Estadísticos		
weighted_score_cad		
N		547
mínimo		-3,90
máximo		5,97
percentil	33	-0,0072
	66	1,0851

Cohorte LURIC		
Estadísticos		
score_vienna_wo_alb_plat_master		
N		1225
mínimo		-3,14
máximo		3,98
percentil	33	-0,3159
	66	0,4323

Ejemplo 2

25 Antecedentes: Los algoritmos para predecir el riesgo futuro a largo plazo de pacientes con arteriopatía coronaria estable (CAD) son raros. La puntuación de riesgo de Viena and Ludwigshafen Coronary Artery Disease (VILCAD) fue una de las primeras puntuaciones específicamente diseñadas para esta población de pacientes clínicamente importantes. El objetivo de los presentes inventores fue refinar la predicción de riesgo en CAD estable creando un nuevo modelo de predicción que abarca varias vías fisiopatológicas. Por lo tanto, se evaluaron 135 nuevos biomarcadores para determinar la mortalidad a largo plazo en pacientes con CAD estable.

30

Métodos: Se incluyeron 1275 pacientes con CAD estable del estudio Ludwigshafen Risk and Cardiovascular health (LURIC) con una mediana de seguimiento de 9,8 años para investigar si el poder predictivo de la puntuación VILCAD podría mejorarse mediante la adición de nuevos biomarcadores. Se seleccionaron biomarcadores adicionales en un procedimiento de bootstrapping basándose en la regresión de Cox para determinar los predictores más informativos de mortalidad.

Resultados: El modelo final multivariable abarcó nueve marcadores clínicos y bioquímicos: edad, sexo, fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), frecuencia cardíaca, NT-proBNP, cistatina C, renina, 25OH-vitamina D3 y HbA1c. La puntuación extendida del biomarcador VILCAD logró un estadístico C significativamente mejorado (0,78 frente a 0,73;  $P = 0,035$ ) e índice de reclasificación neta (14,9%;  $P < 0,001$ ) en comparación con la puntuación VILCAD original. Omitiendo FEVI, que podría no estar fácilmente disponible, se redujo ligeramente la precisión de la nueva puntuación BIO-VILCAD, pero aún mejoró significativamente la clasificación de riesgos (NRI: 12,5 %;  $P < 0,001$ ).

Conclusión: La puntuación de biomarcadores VILCAD basándose en parámetros habituales complementados con nuevos biomarcadores supera los algoritmos de riesgo anteriores y permite una clasificación más precisa de pacientes con CAD estable, lo que permite a los médicos elegir regímenes de tratamiento más personalizados para sus pacientes.

La evaluación del riesgo cardiovascular y la prevención de eventos recurrentes en pacientes con arteriopatía coronaria establecida (CAD) es un problema importante de salud pública (3). El principio fundamental de la medicina preventiva es iniciar intervenciones apropiadas al nivel de riesgo individual del paciente. Por lo tanto, la evaluación minuciosa del riesgo es un elemento indiscutible de la atención preventiva. En pacientes con CAD estable, los eventos cardiovasculares importantes solo se producen con una tasa anual estimada de 1 a 2 % (3, 4). Por lo tanto, en esta población de pacientes, la estimación del riesgo acumulativo a largo plazo es crucial para aplicar eficazmente las medidas de prevención secundaria (5). La puntuación de Vienna and Ludwigshafen de CAD (VILCAD) fue la primera puntuación de riesgo específicamente diseñada para pacientes con CAD estable que abarca variables clínicas y de laboratorio disponibles de forma habitual (Goliash et al., 2012; Eur Heart J). Aún así, no se han evaluado numerosos biomarcadores nuevos e importantes en el proceso de desarrollo de la puntuación VILCAD (Goliash et al, 2012; Eur Heart J).

Los nuevos biomarcadores se han convertido en una parte integral en la evaluación de pacientes con enfermedad cardiovascular (3). Estos parámetros cubren diferentes vías fisiopatológicas del desarrollo de CAD y se han implicado previamente en un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y muerte. Estudios previos demostraron que la evaluación simultánea de múltiples biomarcadores potencia significativamente las puntuaciones de predicción de riesgo cardiovascular establecidas. Sin embargo, ningún estudio ha explorado la posibilidad de refinar la estimación del riesgo cardiovascular en pacientes con CAD estable con el uso de un amplio conjunto de nuevos biomarcadores.

El objetivo del estudio de los presentes inventores fue refinar aún más la predicción de riesgo en CAD estable mediante la creación de un nuevo modelo de predicción de riesgo que abarca varias vías fisiopatológicas. Por lo tanto, se evaluó el poder predictivo independiente de 135 nuevos biomarcadores de diferentes vías fisiopatológicas para determinar la mortalidad a largo plazo en pacientes con CAD estable y se añadieron estos marcadores a la puntuación VILCAD descrita anteriormente, que se compone de parámetros habituales. Además, el objetivo de los presentes inventores era generar una puntuación de riesgo exclusivamente basada en biomarcadores, lo que permitiría a los médicos evaluar el riesgo a largo plazo de pacientes con CAD estable con una sola extracción de sangre.

## Materiales y métodos

### Cohorte de estudio

El estudio Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) consiste en 3.316 pacientes caucásicos ingresados para angiografía coronaria entre 1997 y 2000 en el Centro Cardíaco Ludwigshafen (Alemania). El protocolo detallado se ha descrito previamente (11). El estudio fue aprobado por el comité de ética del "Ärztchamber Rheinland-Pfalz" y se realizó de conformidad con la "Declaración de Helsinki". Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes. Para el presente análisis se seleccionó un subgrupo de 1275 participantes de LURIC con CAD estable.

### Definiciones clínicas

La CAD se evaluó mediante angiografía coronaria y se definió como se describe anteriormente (Goliash et al, 2012; Eur Heart J). La fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) se calculó utilizando el método de Simpson y se clasificó en normal ( $> 55$  %), levemente reducida (45-54 %), moderadamente reducida (30-44 %) y considerablemente reducida ( $< 30$  %). Los factores de riesgo cardiovascular clásicos tal como la hipertensión, diabetes, fumar y los trastornos de los lípidos se registraron como se describe anteriormente (11).

### Análisis de laboratorio

Se extrajo sangre venosa en los participantes del estudio después de un período de ayuno nocturno en condiciones normalizadas. Dentro de los 30 minutos después de la punción venosa, la sangre restante se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos, inmediatamente se dividió en partes alícuotas y se congeló a -80 °C hasta el análisis adicional.

5 Anteriormente se ha indicado un sumario de los métodos analíticos (11). Las concentraciones de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y de triglicéridos se determinaron enzimáticamente. Las LDL y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se separaron por ultracentrifugación a una densidad de 1,0063 kg/l; el colesterol HDL se obtuvo después de precipitar LDL en los 1,0063 kg/l de infranato con ácido fosfotúngstico/MgCl<sub>2</sub>. NT-pro-BNP se midió por electroquimioluminiscencia en un Elecsys 2010 (Roche

10 Diagnostics). Los CV entre ensayos fueron de 3,2 % y 2,0 % a valores medios de 157 y 5125 ng/l. La cistatina C se ensayó mediante inmunonefelometría (N-Latex Cistatina C, Dade Behring, Marburg, Alemania) con CV intraensayo de 1,5-3,1 % y CV entre ensayos de 1,5-3,5 %. La concentración de renina en plasma se determinó mediante un ensayo inmunoradiométrico (Active Renin, Nichols Institute Diagnostics, Capistrano, Estados Unidos). Los coeficientes de variación intraensayo y entre ensayos fueron ambos < 10 %. Los niveles séricos de 25OH vitamina D se midieron

15 utilizando un radioinmunoensayo (DiaSorin SA, Antony, Francia) con coeficientes de variación intraensayo y entre ensayos de 8,6 % y 9,2 %, respectivamente.

#### Estudio de criterios de valoración y seguimiento

20 El criterio de valoración primario del estudio fue la mortalidad por todas las causas. La información sobre el estado vital se obtuvo de los registros locales. Ningún paciente se perdió durante el seguimiento. Se obtuvieron certificados de defunción en el 97 % de los participantes fallecidos y se utilizaron para clasificarlos en aquellos que fallecieron por causas cardiovasculares frente a no cardiovasculares. Esta clasificación se realizó de forma independiente por dos médicos experimentados que estaban a ciegas de los participantes del estudio, a excepción de la información

25 requerida para clasificar la causa de la muerte.

#### Análisis estadístico

30 Los datos continuos se presentaron como mediana e intervalo intercuartil, los datos discretos como recuentos y porcentajes. La prueba de Mann-Whitney-U y la prueba de chi-cuadrado se utilizaron para las comparaciones entre grupos, según fuera adecuado. Se aplicó el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el efecto de las variables sobre la supervivencia. Las variables continuas se sometieron a una transformación logarítmica antes de entrar en el análisis. Se utilizó un procedimiento de remuestreo bootstrap para identificar las variables que mejor se ajustan para el modelo de regresión de Cox multivariable. Antes de incluir variables en el procedimiento de

35 bootstrapping, se evaluó la colinealidad entre biomarcadores utilizando coeficientes de correlación de Pearson (datos no mostrados). En caso de una estrecha correlación, solo el predictor univariado más fuerte de un grupo (definido por la razón de riesgos instantáneos univariado más alta para un aumento de 1 desviación típica (1-DT)) entró en el procedimiento de selección. Se realizaron 100 repeticiones con selección proactiva y 100 repeticiones con selección reactiva (con una  $P < 0,1$  para la selección). Las variables seleccionadas en más del 80 % de todas las repeticiones se incluyeron en el modelo multivariable final. El poder discriminatorio de las puntuaciones de riesgo diseñadas se evaluó mediante el estadístico C de Harrell. Para un análisis posterior, se estratificó la cohorte por terciles de las puntuaciones de riesgo de biomarcadores en riesgo bajo, moderado y alto. Se examinó una mejora de la predicción de riesgo individual mediante la mejora de reclasificación neta (NRI, por sus siglas en inglés) según lo descrito por Pencina et al. (13). Se aplicó el análisis de Kaplan-Meier (prueba del rango logarítmico) para verificar el poder

40 discriminativo dependiente del tiempo de las puntuaciones de riesgo. Los valores de corte para una puntuación simplificada usando variables clasificadas se estimaron usando valores de chi-cuadrado derivados de los residuos de Martingala del modelo de Cox para todos los valores de corte posibles. Para un uso clínico optimizado, estos valores de corte calculados se redondearon y se evitaron los valores extremos. Se usaron valores P de dos colas < 0,05 para indicar significación estadística. Se utilizaron SPSS 18.0 (IBM SPSS, EE. UU.) y STATA 11 (StataCorp LP, EE. UU.)

45 para todos los análisis.

50

#### Resultados

##### Características basales

55 Se incluyeron 1275 pacientes con CAD estable del estudio LURIC. De estos participantes del estudio, 449 fallecieron (35 %) durante una mediana de seguimiento de 9,8 años (IQR 7,0-10,5), 284 de estos fallecimientos (63 %) se debieron a eventos cardiovasculares. Se desconoce la causa de fallecimiento de 11 personas. Estos pacientes se incluyeron en los cálculos de mortalidad por todas las causas ( $n = 449$ ) pero no en los cálculos que consideran la mortalidad cardiovascular. La cohorte del estudio incluyó a 962 pacientes masculinos (75%). La mediana de edad fue de 65 años (IQR 58-71). Las características basales detalladas se muestran en la Tabla 1 complementaria.

60

##### Resultados de bootstrapping y análisis de supervivencia

65 Se probaron un total de 135 biomarcadores de la base de datos LURIC para la inclusión complementaria en la puntuación VILCAD original que consiste en edad, HbA1c, FEV1, colinesterasa sérica, creatinina y frecuencia cardíaca.

Usando bootstrapping se seleccionaron la edad, HbA1c, FEVI, la frecuencia cardíaca, Nt-proBNP, género, renina, 25OH vitamina D y la cistatina C como predictores significativos de mortalidad en el nuevo modelo de biomarcadores (Figura 4). De las variables de la puntuación VILCAD original, se eliminó la creatinina debido a una estrecha correlación con la cistatina C. Además, la colinesterasa se excluyó del modelo final debido a la falta de significación. La correlación de las variables restantes fue solamente de débil a modesta. Los coeficientes de correlación de Pearson para las variables seleccionadas (transformadas logarítmicamente) se presentan en la Tabla 3 complementaria, siendo los coeficientes más altos 0,47 entre cistatina C y NT-proBNP, 0,34 entre renina y edad y 0,32 entre NT-proBNP y edad. Todos los demás coeficientes de correlación fueron  $< 0,3$ . En el análisis de regresión de Cox univariado, los factores de riesgo más fuertes de mortalidad en este grupo de pacientes con CAD estable fueron NT-proBNP con una HR para un aumento de 1-DT de 2,21 (IC del 95 %: 2,00-2,43) y edad con una HR de 1,84 (IC del 95 %: 1,64-2,07) (Tabla 3). La 25OH vitamina D3 mostró un efecto protector con una HR de 0,69 (IC del 95%: 0,63-0,76) por aumento de 1-DT. Los estadísticos C para marcadores individuales variaron de 0,58 (frecuencia cardíaca) a 0,71 (NT-proBNP, Tabla 3). En el análisis multivariado ajustado para cada variable en el modelo final, NT-proBNP y la edad mostraron los HR más altas con 1,63 (IC del 95 %: 1,44-1,84) y 1,51 (IC del 95 %: 1,34-1,70), respectivamente.

#### Diseño de puntuación de riesgo y comparación con la puntuación VILCAD original

A partir de las variables obtenidas por el procedimiento de bootstrapping, se calculó una puntuación de riesgo de biomarcadores ponderada para la supervivencia a 10 años (Método 3 complementario). La puntuación de biomarcadores VILCAD alcanzó un estadístico C de 0,78, que fue significativamente mejor que tanto el estadístico C de 0,73 para la puntuación VILCAD original ( $p = 0,035$  para comparación) como el estadístico C de 0,71 para el mejor marcador único NT-proBNP ( $P < 0,001$  para la comparación). El análisis de NRI confirmó que la predicción de riesgo individual mejoró en un 14,9 % (IC del 95 %: 5,7-24,16,  $P < 0,001$ ) en comparación con la puntuación VILCAD original (Tabla 4). La mejora de la predicción de riesgo individual se debió principalmente a una disminución del 34 % de los pacientes sin un evento inicialmente clasificados como pacientes de riesgo moderado a alto y una mejora del 43 % de los pacientes con un evento inicialmente clasificados como pacientes de riesgo bajo a moderado. Finalmente, se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para analizar el poder discriminatorio de las puntuaciones de biomarcadores de los presentes inventores al trazar terciles de las puntuaciones correspondientes para la mortalidad por todas las causas, así como para la mortalidad cardiovascular (Figura 5). Las tasas de supervivencia a 10 años fueron del 92 %, 70 % y 32 % para el primero, segundo y tercer tercil ( $P < 0,001$  entre todos los terciles), respectivamente. Se observó una tendencia comparable para la mortalidad cardiovascular con tasas libres de eventos a 10 años del 97 %, 81 % y 47 % ( $P < 0,001$  entre todos los terciles).

Para abordar el objetivo secundario de una puntuación de biomarcadores utilizando solo datos de laboratorio de una sola extracción de sangre (y datos demográficos) se probó otra puntuación sin FEVI. Esta puntuación BIO-VILCAD logró un estadístico C de 0,77 ( $p = 0,09$  para la comparación con la puntuación VILCAD original). La predicción neta del riesgo individual mejoró significativamente en un 12,5 % (IC del 95 %: 5,2-19,9,  $P < 0,001$ ) en comparación con la puntuación VILCAD original (Tabla 4B). De manera similar a la puntuación de biomarcadores VILCAD, la mejora en la clasificación del riesgo se impulsó por una disminución de los pacientes sin eventos originalmente clasificados como de riesgo moderado a alto y una mejora de los pacientes con eventos inicialmente clasificados como de riesgo bajo a moderado. Para la puntuación BIO-VILCAD, las tasas de supervivencia a 10 años fueron del 92 %, 70 % y 33 % para el primero, segundo y tercer tercil, respectivamente ( $P < 0,001$  entre todos los terciles, Figura 5). Con respecto a la mortalidad cardiovascular, las tasas sin eventos a 10 años fueron del 96 %, 81 % y 48 %, respectivamente ( $P < 0,001$  entre todos los terciles).

#### Puntuación simplificada

Finalmente, se diseñó una puntuación de biomarcadores VILCAD simplificada para un uso clínico óptimo. Las variables seleccionadas por bootstrapping se clasificaron utilizando valores de corte optimizados como se define en la Figura 6. Los predictores más fuertes, edad, FEVI y Nt-proBNP contribuyeron con 2 puntos, las variables restantes 1 punto. El factor protector 25OH vitamina D contribuyó con 1 punto cuando su valor estaba por debajo del punto de corte. La puntuación de biomarcadores VILCAD simplificada aún logró un valor predictivo competitivo con un estadístico C de 0,75 ( $p = 0,001$  para la comparación con la puntuación VILCAD simplificada). La puntuación de biomarcadores VILCAD simplificada discriminó muy bien entre riesgo bajo y alto. La mortalidad a 10 años varió de 5,8 % con cero puntos a 88,2 % con siete o más puntos (Figura 6A). Al excluir FEVI, la puntuación BIO-VILCAD simplificada todavía funcionó bien con un estadístico C de 0,74 ( $p = 0,028$  para la comparación con la puntuación de riesgo simplificada VILCAD). De acuerdo, la puntuación BIO-VILCAD simplificada mostró una alta dispersión de la mortalidad a 10 años del 7,5 % con cero puntos al 89,8 % con siete o más puntos (Figura 6B).

#### Análisis

Recientemente se desarrolló la puntuación VILCAD utilizando biomarcadores disponibles de forma habitual para la predicción de riesgo de pacientes con CAD estable (Goliasch et al., 2012, Eur Heart J, 33: 2282-2289). Ahora se amplía y refina la puntuación de riesgo VILCAD de los presentes inventores mediante la inclusión de nuevos marcadores bioquímicos que pueden medirse fácilmente con una sola extracción de sangre. El conjunto final de nueve variables se seleccionó mediante un procedimiento de remuestreo bootstrap de un gran conjunto de 135 marcadores



clínicos y bioquímicos que representan diversas vías fisiopatológicas. Este conjunto integral de variables proporcionó la oportunidad de personalizar una puntuación de riesgo adaptada con precisión al perfil de riesgo de pacientes con CAD estable. De las seis variables de la puntuación VILCAD original, edad, FEVI, frecuencia cardíaca y HbA1c se mantuvieron en la nueva puntuación de biomarcadores. Se añadieron Nt-proBNP, sexo, renina, 25OH de vitamina D y cistatina C a la puntuación de biomarcadores VILCAD debido a su selección consistente en el procedimiento de bootstrapping. La nueva puntuación de biomarcadores VILCAD logró un poder discriminatorio significativamente mejorado con un estadístico C de 0,78 y una NRI de 14,9 % en comparación con la puntuación VILCAD original. Como FEVI, que era parte de la puntuación VILCAD original, podría no estar fácilmente disponible en la práctica general, también se probó una puntuación BIO-VILCAD sin este parámetro. La exclusión de FEVI disminuyó ligeramente el resultado, pero la puntuación BIO-VILCAD aún era significativamente superior a la puntuación VILCAD original con respecto a la clasificación de riesgo mejorada con una NRI de 12,5 %. Además, ambas variantes de la puntuación de biomarcadores mejoraron significativamente la predicción de riesgo en comparación con el biomarcador único más fuerte NT-proBNP.

La única puntuación de riesgo para pacientes con CAD estable que se había descrito en la bibliografía antes de la puntuación VILCAD fue una puntuación propuesta por Marschner et al. (7) que logró un estadístico C de 0,64 en la cohorte LURIC. En paralelo al diseño de la puntuación VILCAD, se ha desarrollado otra puntuación para pacientes con enfermedad cardiovascular conocida utilizando el registro REACH con un seguimiento a medio plazo de 2 años (28). De acuerdo con la puntuación VILCAD, la insuficiencia cardíaca y la diabetes fueron parte de este modelo de predicción de riesgo, mientras que no se incluyeron la edad, frecuencia cardíaca, HbA1c, creatinina ni colinesterasa. Por otro lado, el hábito de fumar, el índice de masa corporal y los antecedentes de enfermedad cardiovascular se incluyeron en la puntuación REACH, pero no calificaron para el modelo final de la puntuación VILCAD en el procedimiento de remuestreo bootstrap. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que solo el 72 % de los pacientes REACH utilizados para generar y validar esa puntuación padecían CAD, mientras que el 28 % restante presentaba enfermedad cerebrovascular o arteriopatía periférica, lo que contrasta con los pacientes de los presentes inventores que tenían CAD demostrada angiográficamente.

Las puntuaciones de los biomarcadores pueden ser aún más eficientes en la práctica clínica ya que solo se requiere una extracción de sangre para la estimación del riesgo y se pueden tener en cuenta vías de enfermedad adicionales. Sin embargo, el aumento de los costes para la medición de biomarcadores debe justificarse por una mejora en la precisión de la predicción de riesgo. Hasta la fecha, Schnabel et al. han publicado solamente una puntuación de biomarcadores para CAD estable. (21). Esta puntuación de biomarcadores incluyó Nt-proBNP, factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15), región media de proadrenomedulina (MR-proADM), cistatina C y región media del péptido natriurético auricular (MR-proANP) en la selección final. Sin embargo, esta puntuación de múltiples biomarcadores mostró un estadístico C moderado de 0,69 para la mortalidad cardiovascular en la cohorte AtheroGene con una mediana de seguimiento de 3,6 años que no superó el estadístico C del mejor biomarcador único NT-proBNP. Uno puede especular que la colinealidad, particularmente debido a una estrecha correlación entre las neurohormonas Nt-proBNP, MR-proADM y MR-proANP, puede haber impedido un mayor valor predictivo de la puntuación.

En comparación, la puntuación de biomarcadores VILCAD alcanzó un estadístico C de 0,78 para un seguimiento a largo plazo más desafiante de casi 10 años en la cohorte LURIC con características basales bastante similares. Una posible explicación de la diferencia en la precisión predictiva puede ser que la puntuación de biomarcadores VILCAD se basó en un conjunto inicial de más de 100 biomarcadores en comparación con 12 biomarcadores en la cohorte AtheroGene. Si bien Nt-proBNP y la cistatina C se incluyeron en ambas puntuaciones, la puntuación de biomarcadores VILCAD consideró vías que no estaban disponibles en la cohorte AtheroGene y además incluyó la edad, FEVI, frecuencia cardíaca, HbA1c, sexo, renina y 25OH vitamina D en el modelo final. Por otro lado, la puntuación descrita por Schnabel et al. (21) incluyó adicionalmente, GDF-15, MR-proANP y MR-proADM.

Todos los marcadores bioquímicos que se han incluido en la puntuación de biomarcadores VILCAD han sido reconocidos durante mucho tiempo como marcadores de riesgo de morbilidad y mortalidad. Tanto el péptido natriurético cerebral (BNP) como el fragmento N-terminal (NT) de pro-BNP son biomarcadores bien establecidos utilizados para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca y se han investigado ampliamente en pacientes con síndrome coronario agudo e infarto de miocardio (29, 30). En LURIC, así como en otros varios estudios, se ha demostrado su utilidad como marcadores de riesgo en pacientes con CAD estable. La renina es parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), implicado en la patogénesis de una serie de trastornos hipertensivos y podría contribuir al desarrollo y progresión de enfermedad cardiovascular. La renina se ha asociado con la mortalidad total en el Estudio de los descendientes de Framingham, mientras que no se encontró asociación con eventos cardiovasculares o ECV (31, 32). Recientemente, Tomaschitz et al. informaron una asociación significativa de renina con ECV en LURIC (33). La deficiencia de vitamina D es muy común en todo el mundo. Además de la reconocida importancia de la vitamina D para la homeostasis del calcio y la salud esquelética, se ha propuesto un papel en una serie de afecciones patológicas extraesqueléticas que varían desde la infección hasta las enfermedades crónicas y el cáncer. Los metaanálisis recientes de ensayos controlados aleatorizados informaron una asociación de suplementación de vitamina D con una disminución de la mortalidad total. En LURIC, se han asociado bajos niveles de 25OH de vitamina D con diabetes, accidente cerebrovascular, inflamación, mortalidad total y cardiovascular (34). La cistatina C representa un parámetro sustituto endógeno alternativo para estimar la tasa de filtración glomerular (eGFR, por sus siglas en inglés). Existe evidencia de que las ecuaciones de eGFR que incorporan la concentración de cistatina C sola o en combinación con

creatinina pueden tener un mejor resultado en el intervalo normal de EFG que las que dependen únicamente de creatinina y una serie de estudios han demostrado que la cistatina C es un predictor mejor y más lineal de mortalidad y eventos cardiovasculares que la creatinina, aunque esto no se ha confirmado en todas las poblaciones.

5 Varios estudios han demostrado que una puntuación con múltiples marcadores es superior con respecto a la predicción de riesgo (21, 26). Sin embargo, El uso clínico de las puntuaciones con múltiples marcadores es limitado, principalmente debido a limitaciones de tiempo. Una puntuación de riesgo simplificada utilizando variables clasificadas con un punto de corte optimizado puede ayudar a superar esta limitación, mientras que aún proporciona una predicción de riesgo precisa como se demuestra con la puntuación de biomarcadores VILCAD simplificada. Para facilitar aún más el uso clínico, se calculó una puntuación BIO-VILCAD simplificada sin FEVI, que permite predecir con precisión el riesgo con una sola extracción de sangre seguida de un cálculo automatizado del riesgo en el laboratorio clínico. Si bien las herramientas de predicción de riesgos se han analizado previamente por su relevancia moderada para las decisiones de tratamiento personalizadas, las nuevas herramientas estadísticas, tales como el índice de reclasificación neta, proporcionan información sobre el porcentaje de personas que se benefician de la predicción de riesgo mejorada. Una gran parte de la mejora en la reclasificación con la puntuación de biomarcadores simplificada derivó de la disminución correcta del nivel de riesgo de las personas sin eventos. Aunque, hubo incluso un porcentaje grande de pacientes con eventos que se reclasificaron correctamente en una categoría de mayor riesgo. Casi la mitad de estos pacientes que se clasificaron como de "riesgo bajo" por la puntuación VILCAD original se actualizó a "riesgo moderado" por la puntuación de biomarcadores y aproximadamente un tercio de estos pacientes clasificados como "de riesgo moderado" por la puntuación original se actualizó correctamente al grupo de "riesgo alto". Esta mejora, tanto para pacientes que no experimentan un evento como para pacientes que padecen un evento, permite personalizar mejor la opción de tratamiento individual evitando que los pacientes con riesgo bajo sean tratados en exceso e, incluso más importante, ayudando a identificar pacientes que necesitan terapia intensiva debido al riesgo alto individual.

25 Limitaciones: La distribución específica de individuos con riesgo bajo, moderado y alto en una cohorte pueden tener un efecto sobre cómo de bien funciona un panel de biomarcadores. Además, los pacientes de los presentes inventores se reclutaron entre 1997 y 2000 y desde entonces se han modificado las estrategias de prevención secundaria, lo que podría afectar al resultado de la puntuación de los presentes inventores en la práctica actual. Los nuevos biomarcadores se han medido solo una vez a partir de muestras de sangre que se habían recogido al inicio y congelado a -80 °C hasta la medición, pero se espera que todos los biomarcadores incluidos sean relativamente estables en estas condiciones. Los biomarcadores recién incluidos aumentan los costes asociados con la puntuación, pero, por otro lado, todos los marcadores se pueden medir fácilmente a partir de una sola muestra de sangre.

35 Una fortaleza del estudio de los presentes inventores es la gran cohorte homogénea de pacientes con CAD estable con un seguimiento completo durante una mediana de 9,8 años. Durante el largo período de seguimiento se registró un número de 449 fallecimientos, lo que nos da la potencia suficiente para detectar incluso tamaños de efecto moderados de marcadores individuales. Otra fortaleza es la excelente caracterización clínica y bioquímica de los pacientes de los presentes inventores, lo que permitió a los presentes inventores comparar una gran cantidad de biomarcadores y seleccionar aquellos con los mayores tamaños de efecto y poca colinealidad.

40 Conclusiones: La puntuación de biomarcadores VILCAD que abarca nueve variables que representan diferentes vías fisiopatológicas (función cardíaca: frecuencia cardíaca, FEVI y NT-proBNP; función renal: cistatina C; metabolismo de la glucosa: HbA1c; presión arterial: renina; homeostasis de calcio y función inmunitaria: vitamina D), así como la edad y el sexo, tiene un excelente poder discriminatorio para clasificar a los pacientes con CAD estable en grupos de riesgo que es incluso superior a la puntuación VILCAD original. Todas las variables, excepto FEVI, son fácilmente medibles y la omisión de FEVI disminuye el resultado solo ligeramente. Por lo tanto, la puntuación de biomarcadores VILCAD representa una herramienta valiosa y fácil de usar para la predicción de riesgo de pacientes con CAD estable en la clínica habitual.

50 Tabla 3: Efectos no ajustados y ajustados sobre la mortalidad  
 Modelo de los riesgos proporcionales de Cox de variables seleccionadas por bootstrapping. Las razones de riesgos instantáneos (HR) se refieren a un aumento de 1-DT en variables continuas y a una reducción de una categoría de FEVI. Las HR se ajustan (aj.) para todas las variables seleccionadas por bootstrapping, es decir, por sexo, edad, frecuencia cardíaca, FEVI, pro-BNP, HbA1c, renina, 25-OH vitamina D<sub>3</sub> y cistatina C. El poder discriminatorio de las variables correspondientes se evaluó usando el estadístico C de Harrell. DT=desviación típica.

Variables	DT	HR bruta (IC del 95 %)	Valor p	Aj. HR (IC del 95 %)	Valor p	Estadístico C
Masculino	----	1,28 (1,02-1,61)	0,033	1,63 (1,28-2,08)	< 0,001	/
Edad	11,74	1,84 (1,64-2,07)	< 0,001	1,521(1,34-1,70)	< 0,001	0,65
Frecuencia cardíaca	11,8	1,30 (1,18-1,43)	< 0,001	1,12 (1,01-1,23)	0,026	0,58
FEVI	----	1,75 (1,60-1,91)	< 0,001	1,20 (1,08-1,33)	0,001	0,63
Nt-proBNP	2042,6 8	2,21 (2,00-2,43)	< 0,001	1,63 (1,44-1,84)	< 0,001	0,71
HbA1c	1,30	1,43 (1,32-1,55)	< 0,001	1,26 (1,15-1,38)	< 0,001	0,60
Renina	332,01	1,42 (1,30-1,54)	< 0,001	1,24 (1,13-1,36)	< 0,001	0,59
25-OH vitamina D <sup>3</sup>	9,27	0,69 (0,63-0,76)	< 0,001	0,75 (0,68-0,83)	< 0,001	0,60
Cistatina C	0,47	1,46 (1,38-1,54)	< 0,001	1,18 (1,08-1,29)	< 0,001	0,66

Tabla 4: Tabla de reclasificación - Tabla de reclasificación que compara la puntuación de biomarcadores ponderada (A) con o (B) sin FEVI con la puntuación de riesgo VILCAD ponderada.

A					
	VILCAD	Biomarcador			
	Clase de riesgo	Bajo	Moderado	Alto	Total
Sin evento (n = 826)	Bajo	78 % (280)	21 % (76)	1 % (4)	100 % (360)
	Moderado	33 % (102)	55 % (169)	13 % (40)	100 % (308)
	Alto	4 % (6)	33 % (52)	63 % (100)	100 % (158)
Evento (n=449)	Bajo	40 % (26)	49 % (32)	11 % (7)	100 % (65)
	Moderado	5 % (6)	61 % (71)	34 % (40)	100 % (117)
	Alto	0 % (0)	10 % (27)	90 % (240)	100 % (267)
B					
	VILCAD	Biomarcador sin FEVI			
	Clase de riesgo	Bajo	Moderado	Alto	Total
Sin evento (n = 826)	Bajo	76 % (274)	22 % (79)	2 % (7)	100 % (360)
	Moderado	34 % (105)	53 % (163)	13 % (40)	100 % (308)
	Alto	6 % (9)	36 % (57)	58 % (92)	100 % (158)
Evento (n=449)	Bajo	40 % (26)	47 % (31)	13 % (8)	100 % (65)
	Moderado	8 % (9)	55 % (65)	37 % (43)	100 % (117)
	Alto	0 % (0)	13 % (35)	87 % (232)	100 % (267)

Los datos se dan como % de la fila (n).

- 5 Tabla 2 complementaria: Características basales y biomarcadores - Las variables continuas se dan como mediana (intervalo intercuartil [IQR]). Fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI); las anomalías del ECG están definidas como desviación del segmento ST y/o inversión de la onda T; latidos por minuto por minuto

	Población de estudio LURIC (n = 1275)
Se seleccionaron la edad, años	65 (58- 71)
Género masculino, n (%)	962 (75 %)
IMC, kg/m <sup>2</sup>	27,2 (24,7- 29,8)
Enfermedad de múltiples vasos, n (%)	745 (58 %)
Presión sanguínea sistólica, mmHg	145 (128- 161)
Frecuencia cardíaca, lpm	68 (60- 77)
FEVI	
≥ 55 %, n (%)	778 (61 %)
45-54 %, n (%)	207 (16 %)
30-44 %, n (%)	177 (14 %)
<30 %, n (%)	68 (5 %)
Anomalías del ECG, n (%) Medicación	351 (28 %)
Inhibidores plaquetarios, n (%)	1252 (98 %)

(continuación)

	Población de estudio LURIC (n = 1275)
Antagonistas de vitamina K n (%)	101 (07 %)
Beta bloqueante, n (%)	778 (61 %)
bloqueantes de inhibidores de la ACE /receptores de Angiotensina II, n (%)	727 (57 %)
Digitálicos, n (%)	217 (17 %)
Nitratos, n (%)	359 (28 %)
Estatinas, n (%)	624 (49 %)
Hipertensión, n (%)	807 (63 %)
Fumadores actuales, n (%)	192 (15 %)
Antecedentes familiares de CAD, n (%)	456 (36 %)
Accidente cerebrovascular previo, n (%)	132(10 %)
Diabetes, n (%)	451 (35 %)
HbA1c, mg/dl	6,1 (5,7- 6,8)
Glucosa, mg/dl	94 (84- 111)
Hipercolesterolemia, n (%)	848 (67 %)
Colesterol total, mg/dl	207 (180- 237)
colesterol VLDL, mg/dl	31 (21- 46)
colesterol LDL, mg/dl	114 (93- 138)
colesterol HDL, mg/dl	37 (32- 45)
Triglicéridos VLDL, mg/dl	101 (66- 152)
Triglicéridos LDL, mg/dl	29 (23- 36)
triglicéridos HDL, mg/dl	14 (11- 19)
Lp (a), mg/dl	16,2 (7-41)
ApoA-I, mg/dl	128 (114- 146)
ApoA-II, mg/dl	41,6 (36,0- 47,6)
Radio promedio de partículas LDL, nm	8,26 (8,13- 8,37)
Hipertrigliceridemia, n (%)	596 (47 %)
Triglicéridos, mg/dl	144 (108- 198)
Ácidos grasos libres, mmol/l	0,60 (0,43- 0,85)
Zinc, mmol/ L	87 (78- 96)
Hierro, µg/dl	91 (70- 115)
Sodio, mmol/l	141 (139- 143)
Cobre, mg/dl	105 (91- 121)
Ceruloplasmina, mg/dl	29 (25- 32)
Receptor de transferrina soluble, mg/l	1,28 (1,07- 1,57)
Fosfato, mg/dl	3,5 (3,1- 3,8)
Beta-crosslaps, ng/ml	0,31 (0,21-0,44)
Creatinina, mg/dl	0,9 (0,8- 1,1)
La cistatina C, mg/l	0,9 (0,8- 1,1)
Renina, pg/ml	20 (10- 45)
Angiotensina I	1470 (1160- 1881)
Angiotensinógeno, nmol/l	1135 (897- 1451)
Ácido úrico, mg/dl	4,9 (4,1- 6,0)
Proteína, g/l	6,9 (6,6- 7,3)
Albumina, g/l	44,0 (41,0- 48,0)
Vitamina B6, mg/l	9,2 (5,7- 14,4)
25OH-vitamina D <sub>3</sub> , mg/l	15,3 (9,9- 22,8)
Colinesterasa, kU/l	5,81 (4,94- 6,68)
Fosfatasa alcalina, U/l	116 (96- 138)
Noradrenalina, ng/l	336,5 (236.- 472.3)
17β estradiol, ng/l	37 (28- 47)
Lactato deshidrogenasa, U/l	166 (146- 187)
Hormona paratiroidea, pg/ml	31,0 (23,0- 41,8)
Licopeno, mmol/l	0,25 (0,15- 0,39)
Homocisteína, mmol/l	12,5 (10,0- 15,7)
LpPLA2, U/l	471 (396- 556)
IL-6, ng/l	3,1 (1,8- 5,7)

(continuación)

	Población de estudio LURIC (n = 1275)
proteína C-reactiva, mg/dl	0,36 (0,09- 0,79)
Mieloperoxidasa, µg/l	30,2 (21,0- 48,8)
Relación aPC	4,4 (4,1- 4,9)
APTT, s	33,0 (31,0- 36,0)
Antitrombina III, %	98 (89- 106)
INR quick	1,04 (0,99- 1,10)
Factor VII, U/dl	122 (106- 136)
Trombomodulina, µg/l	47 (36- 60)
vWF, U/dl	156 (121- 197)
dímero D, mg/l	0,36 (0,22- 0,60)
Inhibidor de la vía del factor tisular, µg/l	1,23 (1,02- 1,44)
Antígeno PAI-1, µg/l	25,7 (16,5- 38,0)
antígeno tPA, µg/l	11,7 (9,4- 14,8)
Plaquetas, 1000/µl	218 (182- 262)
Volumen medio de plaquetas, fl 9,0 (8,3- 9,6)	
Eritrocitos, 10 <sup>12</sup> /l	4,6 (4,3- 4,9)
Leucocitos, 1000/µl	6,72 (5,65- 8,1)
fT3, pmol/l	4,8 (4,3- 5,4)
TnT, pg/ml	10,2 (6,0- 19,3)
Copeptina, pmol/l	6,9 (4,3- 12,1)
Adiponectina, µg/ml	8,4 (5,7- 12,6)
Neopterinina, nmol/l	5,7 (4,6- 7,3)
NT-proBNP, ng/l	302 (116- 922)

Tabla 3 complementaria: Tabla de correlación de variables continuas en el modelo multivariado - Las variables transformadas logarítmicamente se correlacionan utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Variables	Edad	Frecuencia cardíaca	Pro-BNP	HbA1c	Renina	25-OH vitamina D <sub>3</sub>
Frecuencia cardíaca	r = -0,01 p = 0,73	-----	-----	-----	-----	-----
Pro-BNP	r = 0,32 P < 0,001	r = 0,07 P = 0,02	-----	-----	-----	-----
HbA1c	i = 0,14 P < 0,001	r = 0,13 P < 0,001	i = 0,14 P < 0,001	-----	-----	-----
Renina	r = -0,03 P = 0,34	r = 0,22 P < 0,001	r = 0,06 P = 0,05	r = 0,15 P < 0,001	-----	-----
25-OH vitamina D <sub>3</sub>	r = 0,12 P < 0,001	r = -0,09 P < 0,001	r = -0,16 P < 0,001	r = -0,07 P = 0,02	r = -0,07 P = 0,02	-----
Cistatina C	r = 0,26 P < 0,001	r = 0,11 P = 0,70	r = 0,47 P < 0,001	r = 0,09 P = 0,001	r = -0,12 P < 0,001	r = -0,12 P < 0,001

### 5 Método 3 complementario: Generación de la puntuación de biomarcadores VILCAD ponderada

General:

10 Puntuación de riesgo ponderada = [V1 - media de V1] \* coeficiente beta de V1 + [V2 - media de V2] \* coeficiente beta de V2 + [V3 - media de V3] \* coeficiente beta de V3 +... + [Vn - media de Vn] \* coeficiente beta de Vn.

Puntuación de biomarcadores VILCAD ponderada:

15 = [edad-4,151] \* 2,69 + [HbA1c - 1,848] \* 1,320 + [frecuencia cardíaca - 4,221] \* 0,633 + FEVI \* 0,182 + [proBNP - 5,786] \* 0,345 + femenino \* -0,495 + [renina - 3,168] \* 0,172 + [25-hidroxi vitamina D - 2,688] \* -0,492 + [cistatina C - 0,019] \* 0,593

20 Los coeficientes beta derivaron de un modelo de regresión de Cox multivariable que incluye todas las variables del modelo correspondiente. Las variables continuas se transformaron logarítmicamente antes de su inclusión en la puntuación; n, número de variables de la puntuación de riesgo correspondiente; V, variable

Referencias citadas

- (1) Bassand J.P. et al., 2007. Eur Heart J, 28: 1598-1660.  
 (2) Fuster V. et al., 1992. N Engl J Med, 326: 242-250.  
 (3) Morrow D.A., 2010. Circulation, 121: 2681-2691.  
 (4) Steg P.G. et al., 2007. JAMA, 297: 1197-1206.  
 5 (5) Graham I. et al., 2007. Eur Heart J, 28: 2375-2414.  
 (6) Clark A.M. et al., 2005. Ann Intern Med, 143: 659-672.  
 (7) Marschner I.C. et al., 2001. J Am Coll Cardiol, 38: 56-63.  
 (8) Manjunath G. et al., 2003 J Am Coll Cardiol, 41: 47-55.  
 (9) Sachdev M. et al., 2004, J Am Coll Cardiol 43: 576-582.  
 10 (10) Niessner A. et al., 2005. Thromb Haemost, 93:949-954.  
 (11) Winkelmann B.R. et al., 2001. Pharmacogenomics, 2:S1-73.  
 (12) Tomaschitz A. et al., 2010. Eur Heart J, 31:1237-1247.  
 (13) Pencina M.J. et al., 2008. Stat Med, 27:157-172; análisis 207-112.  
 (14) Granger C.B. et al., 2003. Arch Intern Med, 163: 2345-2353.  
 15 (15) Hemingway H. et al., 2009. BMJ, 339: b4184.  
 (16) Yan A.T. et al., 2007. Eur Heart J, 28: 1072-1078.  
 (17) Libby P., 1995. Circulation, 91: 2844-2850.  
 (18) Naghavi M. et al., 2003. Part I. Circulation, 108: 1664-1672.  
 (19) Bogaty P. et al., 1993. Circulation, 87: 1938-1946.  
 20 (20) Vranckx P. et al., 2011. EuroIntervention 7: 859-871.  
 (21) Schnabel R.B. et al., 2010. Eur Heart J 31: 3024-3031.  
 (22) Emond M. et al. 1994. Circulation 90: 2645-2657.  
 (23) Mock M.B. et al., 1982. Circulation 66: 562-568.  
 (24) Calderon-Margalit R. et al., 2006. Clin Chem 52:845-852.  
 25 (25) Goliash G. et al., 2012. Clin Chem Jan 31. (publicación electrónica previa a la impresión)  
 (26) Wang T.J., 2010. J Am Coll Cardiol 55:2092-2095.  
 (27) Kooter A.J. et al., 2011. Circulation, 124: 741-745.  
 (28) Wilson P.W. Am J Med 2012; 125: 695-703.  
 (29) Omland T., Circulation 2002; 106: 2913-8.  
 30 (30) de Lemos J.A., N Engl J Med 2001; 345: 1014-21.  
 (31) Wang T.J., N Engl J Med 2006; 355: 2631-9.  
 (32) Parikh N.I., Eur Heart J 2007; 28: 2644-52.  
 (33) Tomaschitz A., Eur Heart J 2011, 32: 2642-9.  
 (34) Thomas G.N., Diabetes Care 2012; 35: 1158-64.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular es una arteriopatía coronaria estable, que comprende las etapas de

a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende las siguientes variables:

el género del paciente,

la edad del paciente,

al menos un indicador de función miocárdica o rendimiento miocárdico, en donde el al menos un indicador de la función miocárdica o del rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen o por la concentración en sangre del paciente del fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP),

al menos dos indicadores de función renal o rendimiento renal, en donde los al menos dos indicadores de la función renal o del rendimiento renal están definidos por la concentración en sangre del paciente de renina y cistatina C, la frecuencia cardíaca del paciente,

al menos un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre, en donde el al menos un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total,

y al menos un indicador del metabolismo del calcio en sangre, en donde el al menos un indicador del metabolismo del calcio en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de 25(OH)-vitamina D<sub>3</sub>,

b) establecer los parámetros biológicos en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos 10 años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular, caracterizado por que la puntuación de riesgo de mortalidad es una puntuación de riesgo simplificada X<sub>1#</sub> y los parámetros biológicos se ponen en correlación por una suma de al menos ocho cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada X<sub>1#</sub>,

en donde una primera cantidad es igual a 2 si la edad del paciente es igual o superior a 75 años y de lo contrario es igual a 0, en donde una segunda cantidad es igual a 1 si la concentración del fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP) es igual o superior a 400 ng/l, igual a 2 si la concentración del fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP) es igual o superior a 2000 ng/l y, de lo contrario, igual a 0,

en donde una tercera cantidad es igual a 1 si la concentración de glucohemoglobina HbA1c es igual o superior a 6,5 % para pacientes con diabetes conocida y, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una cuarta cantidad es igual a 1 si la concentración de renina es igual o superior a 50 pg/ml y, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una quinta cantidad es igual a 1 si la concentración de cistatina C es igual o superior a 1,2 mg/l o, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una sexta cantidad es igual a 1 si la concentración de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> es igual o inferior a 10 ng/l y, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una séptima cantidad es igual a 1 si la frecuencia cardíaca del paciente es igual o superior a 75 latidos por minuto y, de lo contrario, es igual a 0 y

en donde una octava cantidad es igual a 1 si el género del paciente es masculino y, de lo contrario, es igual a 0,

en donde una puntuación de riesgo simplificada X<sub>1#</sub>

igual a 0 o igual a 1 indica un riesgo de mortalidad bajo,

igual a 2 o igual a 3 indica un riesgo de mortalidad moderado,

igual o superior a 4 indica un riesgo de mortalidad alto,

en donde un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad moderado significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y 40 % y un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 50 %.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende una variable adicional en forma de un indicador de la función miocárdica o del rendimiento miocárdico, en donde el indicador de función miocárdica o rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen y en donde los parámetros biológicos se ponen en correlación por una suma de al menos nueve cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada X<sub>1a#</sub>, preferentemente

en donde la novena cantidad está definida por la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente en % de volumen por volumen y en donde la novena cantidad es

igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0,

en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 -

44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen, en donde una puntuación de riesgo simplificada  $X_{1a\#}$  igual a 0 o igual a 1 indica un riesgo de mortalidad bajo, igual a 2 o igual a 3 indica un riesgo de mortalidad moderado, igual o superior a 4 indica un riesgo de mortalidad alto, en donde un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad moderado significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y 40 % y un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 50 %.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la puntuación de riesgo es una puntuación de riesgo ponderada  $X_{2\#}$  y los parámetros biológicos se ponen en correlación usando la siguiente fórmula, proporcionando, de este modo, la puntuación de riesgo ponderada  $X_{2\#}$ :

$$X_{2\#} = (\text{variable 1} - 4,151) * 2,69 + (\text{variable 2} - 1,848) * 1,32 + (\text{variable 3} - 4,221) * 0,633 + \text{variable 4} * 0,182 + (\text{variable 5} - 5,786) * 0,345 + (\text{variable 6}) * -0,495 + (\text{variable 7} - 3,168) * 0,172 + (\text{variable 8} - 2,688) * -0,492 + (\text{variable 9} - 0,019) * 0,593,$$

en donde

- a) la variable 1 está definida por el valor logarítmico de la edad del paciente en años,
- b) la variable 2 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total,
- c) la variable 3 está definida por el valor logarítmico de la frecuencia cardíaca del paciente en latidos por minuto,
- d) la variable 4 está definida como igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del paciente está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen,
- e) la variable 5 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente del fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B en ng/l,
- f) la variable 6 está definida como igual a 1 si el género del paciente es masculino e igual a 0 si el género del paciente es femenino,
- g) la variable 7 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de renina en pg/ml,
- h) la variable 8 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> en ng/l,
- i) la variable 9 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de cistatina C en mg/l,

preferentemente en donde una puntuación de riesgo ponderada  $X_{2\#}$  en el intervalo inferior o igual a 0 indica un riesgo de mortalidad bajo, en el intervalo de 0 a 1 indica un riesgo de mortalidad intermedio y en el intervalo de mayor o igual a 1 indica un riesgo alto o mortalidad, en donde un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad moderado significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y 40 % y un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 50 %.

4. Un método *in vitro* para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente con una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular es una arteriopatía coronaria estable, que comprende las etapas de

- a) analizar un conjunto de parámetros biológicos obtenidos del paciente, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende al menos las siguientes variables: la edad del paciente, un indicador de rendimiento miocárdico, un indicador de rendimiento renal, la frecuencia cardíaca del paciente, un indicador del metabolismo de la glucosa en sangre,
- b) establecer los parámetros biológicos en correlación, proporcionando, de este modo, una puntuación de riesgo de mortalidad, en donde la puntuación de riesgo es indicativa de la mortalidad del paciente en los próximos 10 años y en donde la puntuación de riesgo es indicativa para un tratamiento de prevención secundaria del paciente para reducir el riesgo de mortalidad del paciente debido a la enfermedad cardiovascular, en donde
  - i) el indicador de rendimiento miocárdico está definido por la fracción de eyección ventricular izquierda del paciente en % de volumen por volumen,
  - ii) el indicador de rendimiento renal está definido por la concentración en sangre del paciente de creatinina sérica,
  - iii) el indicador del metabolismo de la glucosa en sangre está definido por la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total y



en donde la puntuación de riesgo de mortalidad es una puntuación de riesgo simplificada  $X_{1a}$  y en donde los parámetros biológicos se ponen en correlación por una suma de al menos seis cantidades, proporcionando la suma, de este modo, la puntuación de riesgo simplificada  $X_{1a}$ ,

- 5 en donde una primera cantidad es igual a 2 si la edad del paciente es igual o superior a 75 años y de lo contrario es igual a 0, en donde una segunda cantidad es igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen, en donde una tercera cantidad es igual a 1 si la concentración de glucohemoglobina HbA1c es igual o superior a 6,5 % para pacientes con diabetes conocida y de lo contrario es igual a 0, en donde una cuarta cantidad es igual a 1 si la concentración de creatinina sérica es igual o superior a 1,3 mg/dl y de lo contrario es igual a 0 y
- 15 en donde una quinta cantidad es igual a 1 si la frecuencia cardíaca del paciente es igual o superior a 75 latidos por minuto y de lo contrario es igual a 0, en donde el conjunto de parámetros biológicos comprende además una variable en forma de un indicador de rendimiento hepático, en donde el indicador de rendimiento hepático está definido por la concentración en sangre del paciente de colinesterasa sérica y en donde una sexta cantidad se establece en 1 si la concentración de colinesterasa sérica es igual o inferior a 4,4 Unidades/ml y de lo contrario es igual a 0, en donde una puntuación de riesgo simplificada  $X_{1a}$  igual a 0 indica un riesgo de mortalidad bajo, igual a 1 o igual a 2 indica un riesgo de mortalidad intermedio,
- 20 igual o superior a 3 indica un riesgo de mortalidad alto, en donde un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad intermedio significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y el 50 % y un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 60 %.

- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde la puntuación de riesgo es una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  y los parámetros biológicos se ponen en correlación usando la siguiente fórmula, proporcionando, de este modo, la puntuación de riesgo ponderada  $X_2$ :

35 
$$X_2 = (\text{variable 1} - 4,14) * 2,33 + (\text{variable 2}) * 0,42 + (\text{variable 3} - 1,73) * - 1,05 + (\text{variable 4} - 0,68) * 1,27 + (\text{variable 5} - 4,21) * 1,47 + (\text{variable 6} - 1,85) * 1,79,$$

en donde

- 40 a) la variable 1 está definida por el valor logarítmico de la edad del paciente en años,  
 b) la variable 2 está definida como igual a 1 si la fracción de eyección ventricular izquierda está moderadamente reducida, igual a 2 si la fracción de eyección ventricular izquierda está considerablemente reducida y de lo contrario es igual a 0, en donde una fracción de eyección ventricular izquierda moderadamente reducida está definida por un valor de 30 - 44 en % de volumen por volumen y en donde una fracción de eyección ventricular izquierda considerablemente reducida está definida por un valor por debajo de 30 en % de volumen por volumen,  
 45 c) la variable 3 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de colinesterasa sérica en Unidades/ml,  
 d) la variable 4 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de creatinina sérica en mg/dl,  
 e) la variable 5 está definida por el valor logarítmico de la frecuencia cardíaca del paciente en latidos por minuto,  
 50 f) la variable 6 está definida por el valor logarítmico de la concentración en sangre del paciente de glucohemoglobina HbA1c en % de hemoglobina total,

preferentemente en donde una puntuación de riesgo ponderada  $X_2$  en el intervalo inferior o igual a 0 indica un riesgo de mortalidad bajo, en el intervalo de 0 a 1 indica un riesgo de mortalidad intermedio y

- 55 en el intervalo de mayor o igual a 1 indica un riesgo alto o mortalidad, en donde un riesgo de mortalidad bajo significa un riesgo de mortalidad por debajo del 20 %, un riesgo de mortalidad moderado significa un riesgo de mortalidad de entre el 30 y 40 % y un riesgo de mortalidad alto significa un riesgo de mortalidad de al menos el 50 %.

- 60 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento de prevención secundaria es en forma de fármacos administrados, en donde los fármacos son para tratar hiperlipidemia, regular la presión arterial, modificar la frecuencia cardíaca y/o proporcionar control glucémico en pacientes diabéticos, preferentemente en donde los fármacos son para reducir la concentración en sangre del paciente de colesterol, para reducir la presión sanguínea del paciente y/o para reducir la concentración de glucosa en sangre del paciente.

- 65 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la puntuación de riesgo es indicativa para

un tratamiento de prevención secundaria de pacientes con un riesgo de mortalidad intermedio o moderado o de pacientes con un riesgo de mortalidad alto.

- 5 8. Un producto de programa informático que se puede cargar directamente en la memoria interna de un ordenador digital, que comprende partes del código del programa informático para implementar el cálculo de la puntuación de riesgo de mortalidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 cuando dicho producto se ejecuta en un ordenador, comprendiendo, preferentemente, partes del código del programa informático para implementar el cálculo de la puntuación de riesgo ponderada como se define en la reivindicación 3 o en la reivindicación 5.

Figura 1

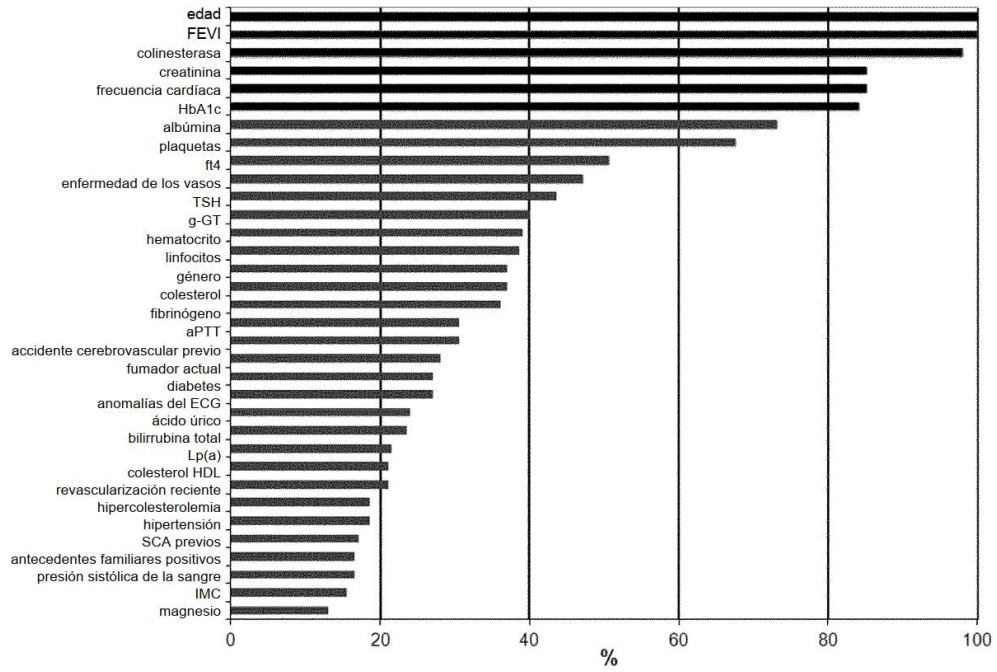


Figura 2

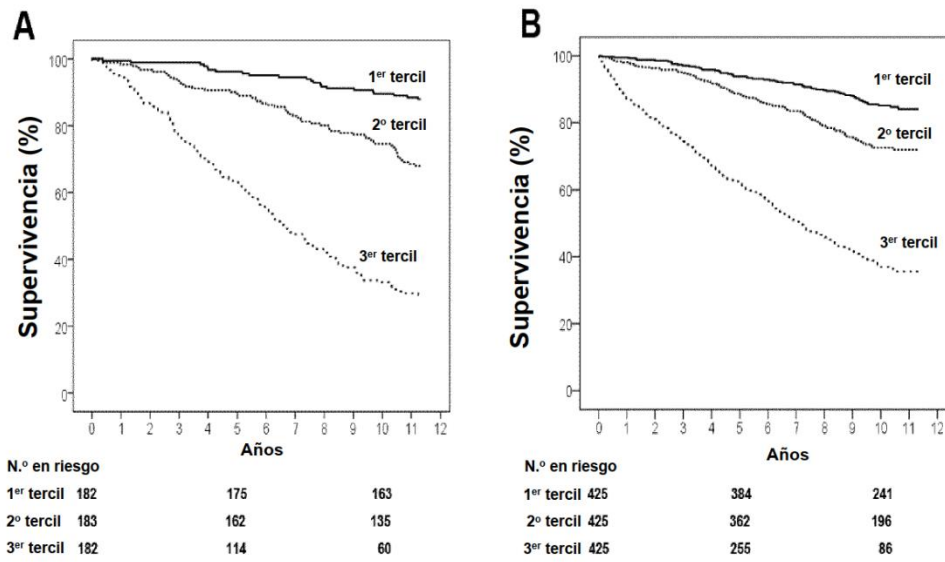
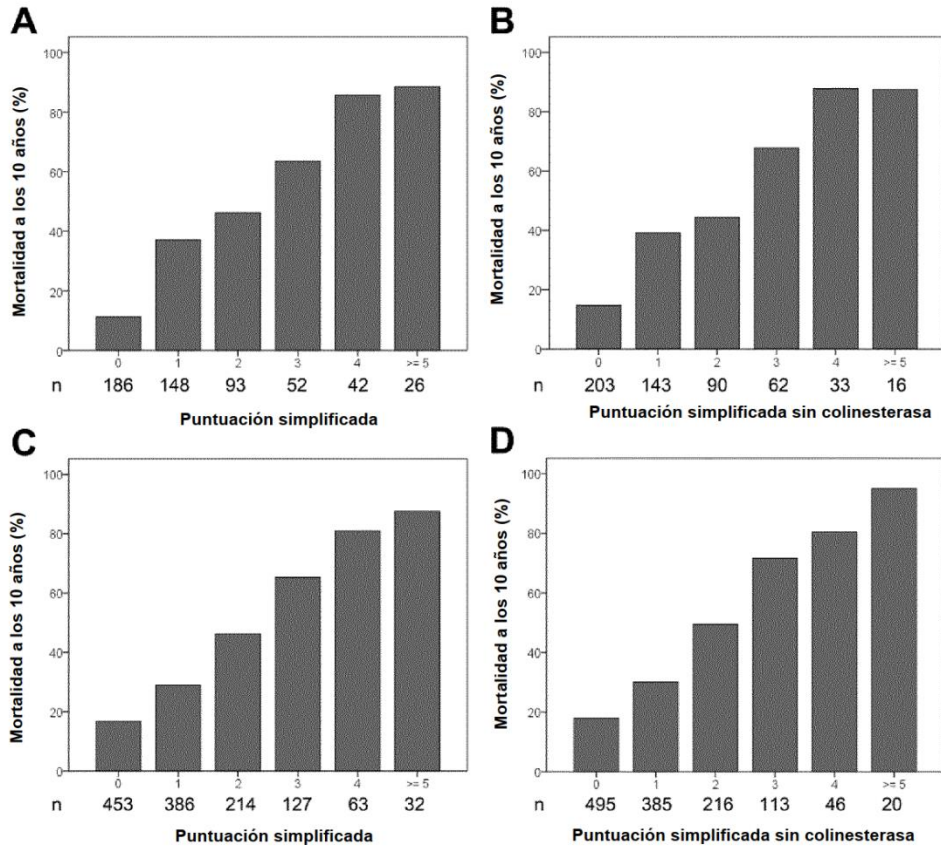


Figura 3



**Figura 4**

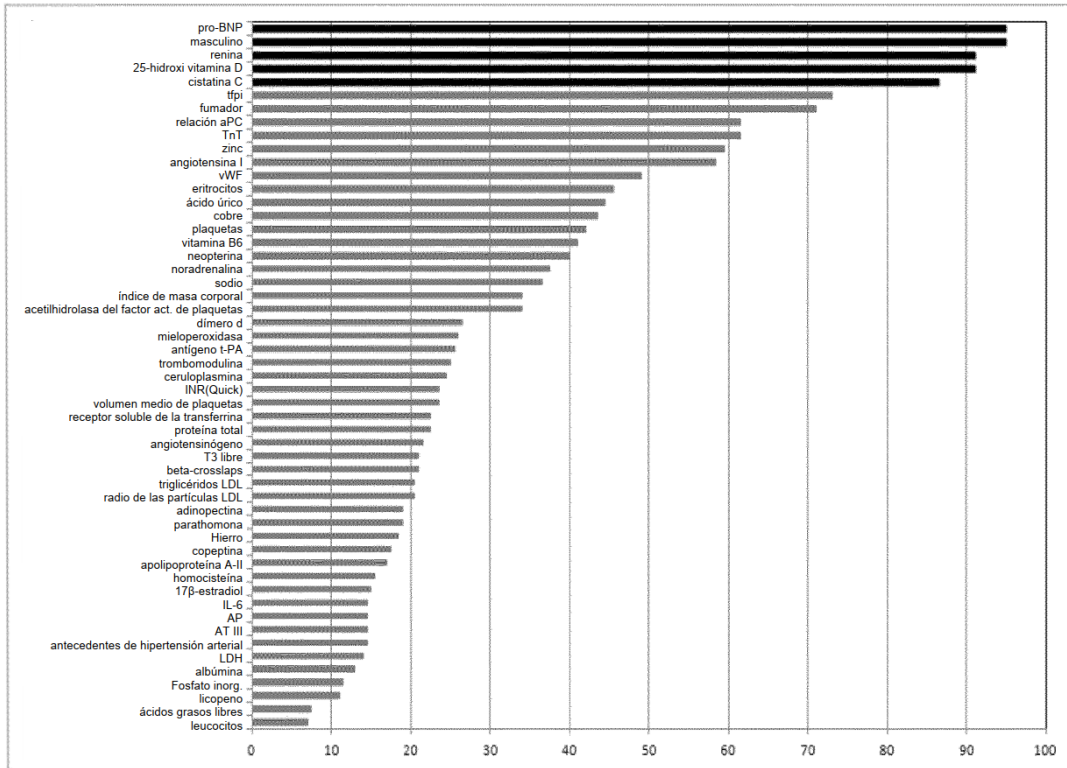
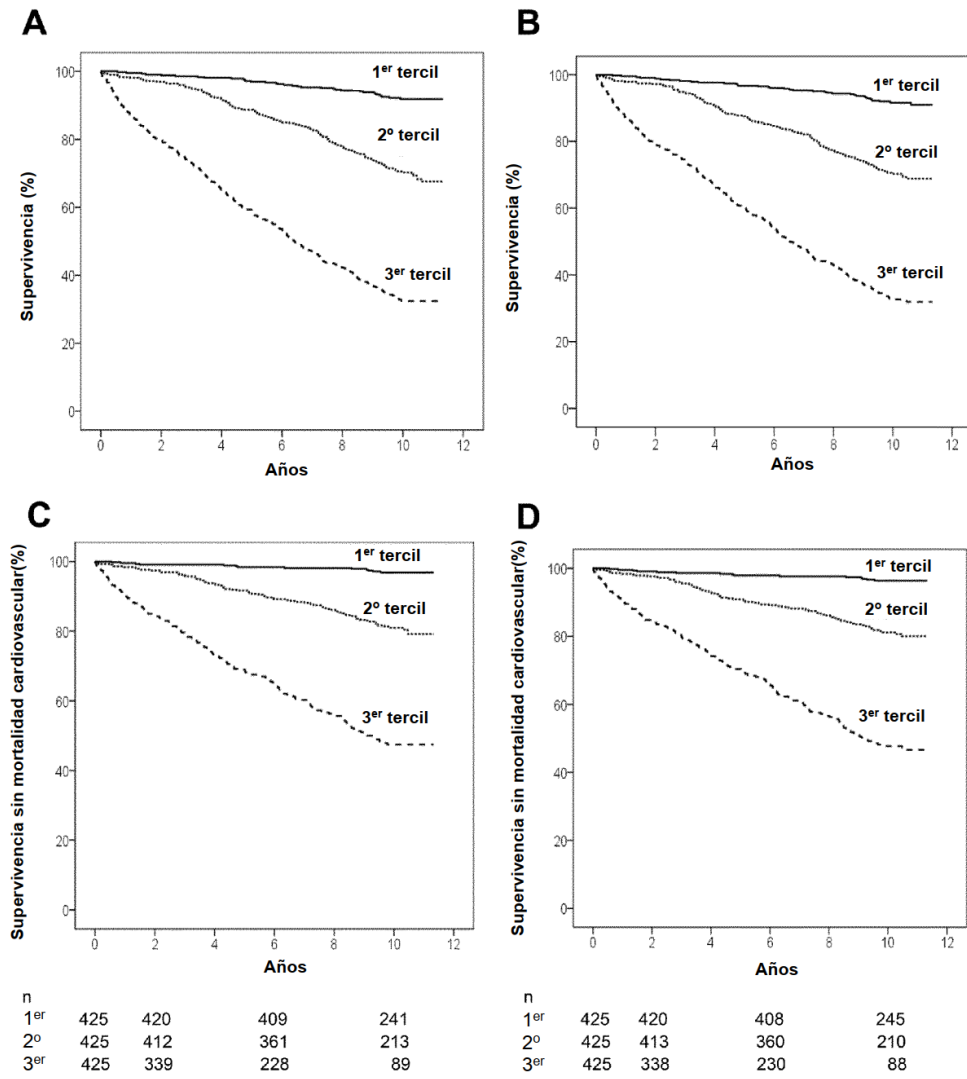


Figura 5



**Figura 6**

