

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE
INTERÉS EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO
DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Aránzazu Martín García

Bajo la dirección de las doctoras

María Teresa Méndez Marco
Rafaela Raposo González

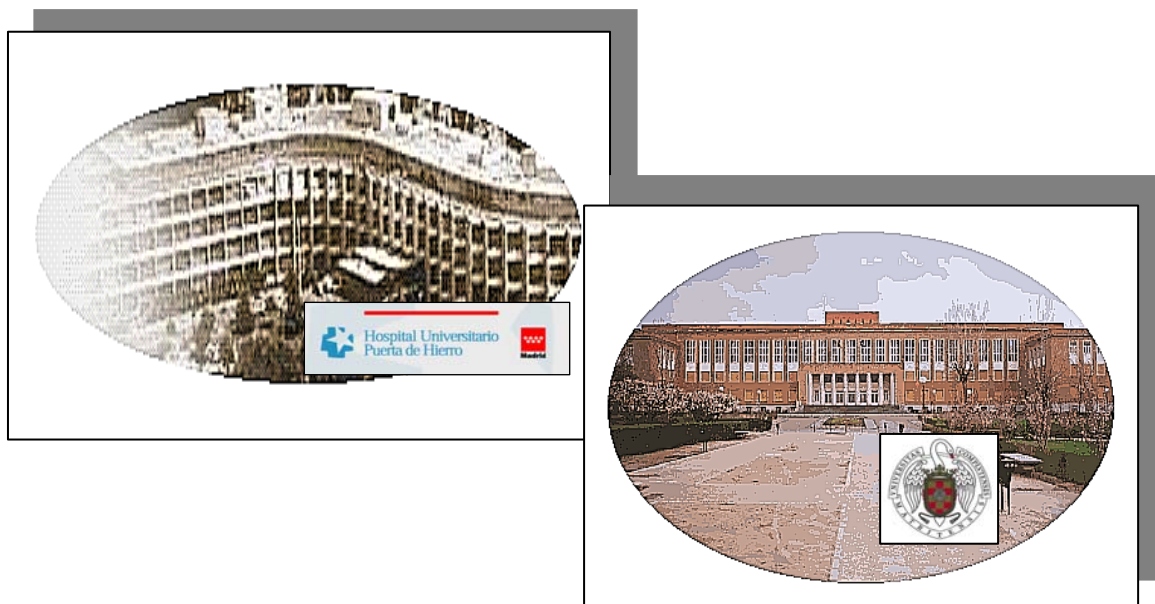
Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-4105-6

© Aránzazu Martín García, 2009

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE INTERÉS EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO.



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

ARÁNZAZU MARTÍN GARCÍA.

Directoras de Tesis: Dra. María Teresa Méndez Marco (Departamento Bioquímica y Biología Molecular II) y Dra. Rafaela Raposo González (Secc. Deptal. Fisiología).

- ✓ **ÍNDICE**

- ✓ **INTRODUCCION.....Pág. 7**

- ✓ **1. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA.....Pág. 7**
- ✓ **1.1 CAUSAS DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA.....Pág. 7**
- ✓ **1.2 FORMACIÓN DE LA LESIÓN MIOCÁRDICA.....Pág. 8**
- ✓ **1.3 EFECTOS METABÓLICOS EN LA ISQUEMIA.....Pág. 9**
- ✓ **1.4 EFECTOS ESTRUCTURALES DE LA ISQUEMIA.....Pág. 10**

- ✓ **2. DEFINICIONES Y DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO.....Pág. 11**
- ✓ **Definiciones de angina estable, angina inestable e infarto.**

- ✓ **3. MARCADORES BIOQUÍMICOS.....Pág. 14**
- ✓ **3.1 PROTEÍNAS ENZIMÁTICAS.....Pág. 16**
- ✓ **Aspartato aminotransferasa.**
- ✓ **Lactato deshidrogenasa.**
- ✓ **Creatín quinasa.**
- ✓ **Mieloperoxidasa.**
- ✓ **Isoenzima BB de la glucógeno fosforilasa.**
- ✓ **Metaloproteinasas.**

- ✓ **3.2 PROTEÍNAS NO ENZIMÁTICAS.....Pág.24**
- ✓ **Mioglobina.**
- ✓ **Troponina.**
- ✓ **PCR.**
- ✓ **NT-proBNP y BNP.**
- ✓ **sCD40L.**
- ✓ **PAPPA.**
- ✓ **Albúmina modificada por isquemia.**
- ✓ **Factor de crecimiento placentario.**
- ✓ **Lipoproteína asociada a fosfolipasa A2.**
- ✓ **3.3 OTRAS MOLÉCULAS.....Pág. 36**
- ✓ **Colina.**
- ✓ **3.4 NUEVOS MARCADORES RELACIONADOS CON EL SCA.....Pág. 37**
- ✓ **Colesterol.**
- ✓ **Acidos grasos libres.**
- ✓ **Estudios genéticos.**
- ✓ **Otros biomarcadores, metabólicos e inflamatorios.**

- ✓ **RECOMENDACIONES DE LA NACB PARA EL SCA.....Pág. 40**

- ✓ **4. OBJETIVOS.....Pág. 48**

- ✓ **MATERIALES Y MÉTODOS.....Pág. 50**
- ✓ **1. Población de estudio.....Pág. 50**
- ✓ **2. Variables recogidas.....Pág. 52**
- ✓ **3. Muestras utilizadas.....Pág. 53**
- ✓ **4. Metodología: sistemas analíticos, técnicas y reactivos.....Pág. 54**
- ✓ **4.1 Métodos automatizados mediante sistemas analíticos.....Pág.54**
- ✓ **4.1.1 Métodos automatizados en analizador STA® R Evolution (Roche Diagnostics España).....Pág.54**
 - ✓ **Dímero D.**
 - ✓ **Fibrinógeno.**
 - ✓ **Plasminógeno.**
- ✓ **4.1.2 Métodos automatizados en analizador Modular P800 (Roche Diagnostics España).....Pág.58**
 - ✓ **Lactato deshidrogenasa.**
 - ✓ **Aspartato aminotransferasa.**
 - ✓ **Colesterol total.**
- ✓ **4.1.3 Métodos automatizados en analizador Elecsys 2010 (Roche Diagnostics España).....Pág.62**
 - ✓ **Nt-proBNP.**

- ✓ **4.1.4 Métodos automatizados en analizador Dimension RxL (Dade Behring, Newark DE).....Pág.64**
- ✓ **Creatín quinasa.**
- ✓ **Isoenzima MB de creatín quinasa.**
- ✓ **Mioglobina.**
- ✓ **Proteína C reactiva.**
- ✓ **Troponina I cardíaca.**
- ✓ **Creatinina.**

- ✓ **4.1.5 Métodos automatizados en analizador AxSYM (Abbott Diagnostics USA).....Pág.72**
- ✓ **Homocisteína.**

- ✓ **4.2 Métodos no automatizados.....Pág.74**
- ✓ **Mieloperoxidasa.**
- ✓ **Albúmina modificada por isquemia.**

- ✓ **4.3 Métodos de análisis para técnicas de biología molecular.....Pág.77**
- ✓ **Técnicas en el secuenciador ABI Prism (Applied Biosystems USA).**
- ✓ **Gen codificante de leucotrieno B4.**
- ✓ **Gen codificante de beta-miosina.**
- ✓ **Gen codificante de troponina T2.**
- ✓ **Gen codificante de troponina I3.**
- ✓ **Gen codificante del enzima convertidor de angiotensina: ACE-17q.**
- ✓ **Gen codificante del receptor alfa2 adrenérgico.**

- ✓ **5. Análisis estadístico.....Pág.85**

- ✓ **RESULTADOS.....Pág.86**
- ✓ **1. Sujetos.....Pág.86**
- ✓ **2. Descripción de variables clínicas y bioquímicas.....Pág.88**
- ✓ **3. Relación de los marcadores con el sexo en el grupo de pacientes.....Pág.90**
- ✓ **4. Límites de referencia.....Pág.92**
- ✓ **5. Estudio de las variables a distintos tiempos de muestreo tras el proceso agudo.....Pág.95**

- ✓ **CK.**
- ✓ **cTnl.**
- ✓ **LD.**

- ✓ **6. Cálculo de las curvas ROC.....Pág.100**
- ✓ **7. Construcción de un modelo matemático con finalidad predictiva. Creación y validación del SCORE.....Pág.103**
- ✓ **8. Mortalidad en los grupos de población y en los de puntuación.....Pág.107**
- ✓ **9. Validación de la fórmula en otro grupo de pacientes.....Pág.108**

- ✓ **DISCUSIÓN.....Pág.112**
- ✓ **CONCLUSIONES.....Pág.122**
- ✓ **BIBLIOGRAFÍA.....Pág.124**

✓ INTRODUCCIÓN.

1. Cardiopatía isquémica (1-3).

La isquemia cardíaca se define como la situación en la que el corazón recibe un aporte sanguíneo inadecuado para mantener sus funciones esenciales, con la consecuente carencia de oxígeno. Los tejidos biológicos necesitan obtener energía para sobrevivir a partir del metabolismo de moléculas que posee el propio órgano como reserva, o de moléculas que llegan a las células por la circulación sanguínea, donde el oxígeno juega un papel importante. En el caso del tejido miocárdico, la función es estrictamente dependiente de la irrigación sanguínea dado que, en su carácter de órgano altamente aerobio, el corazón posee una escasa reserva energética en caso de deficiente aporte sanguíneo.

1.1 Causas de cardiopatía isquémica.

Existen numerosas causas de isquemia miocárdica, pero indudablemente la más frecuente es la *ateroesclerosis coronaria*. Esta patología representa un proceso prolongado, caracterizado por el estrechamiento progresivo de las arterias que irrigan el corazón como resultado del depósito en la pared arterial de lípidos y materiales asociados, con una disminución del lumen hasta llegar a un punto en el que el aporte sanguíneo es insuficiente.

Otra causa de gran importancia es el vasoespasma coronario, una condición patológica en la que la pared arterial coronaria responde de forma hipersensible a los estímulos vasoconstrictores normales, ya sean emocionales, nerviosos u hormonales, teniendo como efecto una constricción anormal y prolongada de la pared arterial, con una consecuente isquemia tisular. Si este espasmo se relaja, puede no observarse signos de lesión, pero si el espasmo es prolongado, puede traer como consecuencia un infarto de miocardio y la muerte del paciente.

Causas menos comunes de isquemia miocárdica incluyen la inflamación de las arterias coronarias con trombosis (coágulos sanguíneos), la anemia severa y la hipotensión importante.

En cualquiera de las causas anteriores, los efectos que la oclusión arterial tiene sobre el miocardio son consecuencia de la interrupción del flujo sanguíneo, lo que provoca una compleja secuencia de mecanismos tanto metabólicos como estructurales.

1.2 Formación de la lesión miocárdica.

Inicialmente, el estrechamiento (en forma de placas ateroscleróticas) de las arterias coronarias puede ser lo suficientemente grave como para ocasionar una angina estable cuando hay esfuerzo o estrés. Sin embargo, este estrechamiento en algunas ocasiones puede ser asintomático. Por razones que aún no se conocen bien, las placas alcanzan un punto en el que se rompen. Bajo estas circunstancias se puede formar un tapón compuesto por plaquetas y coágulos sanguíneos haciendo que un vaso sanguíneo ya estrecho se vuelva más susceptible de bloquearse por completo. Esta situación inestable puede progresar a una oclusión completa del vaso, con infarto del músculo cardíaco (ataque cardíaco).

1.3 Efectos metabólicos en la isquemia.

La oclusión repentina de una arteria coronaria implica que las células miocárdicas solamente disponen de algunos segundos de metabolismo aerobio, en los que utilizan el aporte de oxígeno que resta de la microvasculatura. Una vez que se utiliza este oxígeno, la fosforilación oxidativa no puede continuar, dado que no existen moléculas de oxígeno receptoras para llevar a cabo la transferencia de electrones.

Como mecanismo compensatorio, para mantener el nivel de energía, se incrementa la incorporación de glucosa a nivel miocárdico y se activa la glucógenolisis. En este caso, el metabolismo miocárdico utiliza la glucosa o el glucógeno por medio del ciclo anaerobio de Embden-Meyerhof (glucólisis) con producción de ATP, molécula de reserva energética, en lugar de utilizar el ciclo aerobio de Krebs. El producto final del metabolismo anaerobio de la glucosa, el piruvato, es reducido a lactato produciendo un reciclaje de NADH para que el ciclo de Embden-Meyerhof pueda seguir funcionando. El acúmulo intracelular de lactato produce una acidosis intracelular, siendo uno de los signos más precoces y dramáticos; esto afecta negativamente a la enzima fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.56), responsable de la formación de fructosa 1,6-bifosfato en el proceso de glucólisis. Por lo tanto, incluso la glucólisis puede ser ineficaz en condiciones de isquemia.

Los ácidos grasos libres representan otra fuente de sustrato, pero en condiciones de isquemia no pueden ser oxidados y se acumulan en el interior de las células miocárdicas.

Todos estos efectos metabólicos se relacionan con cambios estructurales en la célula isquémica, produciendo lesión en mayor o menor grado.

1.4 Efectos estructurales de la isquemia.

Después de un episodio isquémico, el tejido miocárdico puede recuperarse si se restaura el flujo sanguíneo en un intervalo de 15 a 20 minutos y, puesto que no se ha detectado ninguna lesión estructural, es posible pensar que las células son capaces de mantener su integridad hasta dicho límite. Transcurrido este tiempo se ha consumido todo el glucógeno celular, apareciendo alteraciones estructurales de gran importancia, tales como que las miofibrillas sufren un estiramiento excesivo y el sarcolema desarrolla áreas de separación.

También es evidente la presencia de lesiones en la membrana celular. Si se produce una reducción significativa de los compuestos de alta energía, necesarios para mantener el equilibrio iónico de la membrana, las células acumulan sodio y pierden potasio; como consecuencia, se produce una entrada excesiva de iones cloruro que se acompaña de hinchazón celular, llegando finalmente a la lisis y muerte de la célula. Si el episodio isquémico es eliminado en este momento y el tejido miocárdico recupera su irrigación sanguínea, se desarrolla un proceso de contractura.

2. Definiciones y diagnóstico bioquímico del síndrome coronario agudo.

- Definiciones de angina estable, angina inestable e infarto. (4-7).

Se define **angina** como la situación clínica en la que se produce un dolor en el pecho causado por flujo sanguíneo insuficiente al músculo cardíaco. El dolor generalmente comienza de forma lenta y empeora durante unos minutos antes de desaparecer.

El **angor o angina estable**, se desencadena en condiciones de esfuerzo físico, emociones, durante la digestión o por acción del frío y se alivia con el reposo y la acción de vasodilatadores coronarios (nitroglicerina, solinitrina). La causa más común es la arteriopatía coronaria. Otras causas menos comunes de angina son espasmo de la arteria coronaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, insuficiencia cardíaca, ritmos cardíacos anormales o anemia.

El **angor o angina inestable** describe un síndrome que es intermedio entre la angina estable y el infarto de miocardio: un patrón en aceleración o "crescendo" de dolor torácico que dura más que la angina estable, se presenta con menos esfuerzo o en reposo o responde menos a los medicamentos. Los mecanismos por los cuales se presenta una angina inestable son:

- Formación de un trombo no oclusivo (a menudo plaquetario) sobre una placa aterosclerótica fisurada.
- Obstrucción dinámica, bien por espasmo de la arteria coronaria epicárdica (angina variante de Prinzmetal), bien por vasoconstricción anormal de la microcirculación coronaria, como en la angina microvascular.
- Estrechamiento luminal orgánico grave, tal como ocurre en la reestenosis.
- Inflamación arterial que favorece la trombosis.
- Aumento de la necesidad de oxígeno por el miocardio, debido a situaciones tales como la taquicardia.

Se define **infarto** (del latín: “infartus”, relleno), al proceso patológico en el que una porción del parénquima es privada súbitamente de circulación sanguínea por obstrucción de vasos arteriales y al conjunto de fenómenos (desde isquemia hasta necrosis) consecutivos a esta obstrucción (8-9). Por tanto, se podría decir que un episodio de angor inestable es un microinfarto agudo de miocardio, que ocasiona lesión celular menor del propio miocardio. Un microinfarto (daño miocárdico menor) puede derivar a un infarto agudo de miocardio (lesión miocárdica mayor). La angina inestable y el infarto de miocardio se consideran síndromes coronarios agudos; mientras que la angina estable es una condición crónica.

La OMS (1979) ha definido el infarto, en relación al cumplimiento de dos de los tres criterios que se exponen a continuación (10-11):

- **Cuadro clínico característico.** Criterio clínico de dolor torácico, característico de isquemia miocárdica. Dolor de tipo opresivo que, generalmente, aparece con la realización de esfuerzo físico o con el frío. Puede irradiarse hacia el brazo izquierdo, sin olvidar otras localizaciones como pueden ser el cuello o las mandíbulas. Por regla general, se acompaña de sintomatología con malestar general, sudoración profusa, sensación nauseosa e incluso vómitos y sensación de disnea.
- **Alteraciones en el registro electrocardiográfico.** Durante el estadio inicial, la obstrucción completa de la arteria productora del infarto provoca una elevación del segmento ST. La mayoría de los pacientes que presentan esta elevación, manifiestan luego ondas Q de necrosis pronunciadas en el electrocardiograma (ECG) y terminan por ser diagnosticados de *infarto de miocardio con persistencia de la onda Q*. Cuando el trombo no provoca una oclusión completa, cuando la obstrucción es transitoria o cuando la circulación colateral es abundante, no se aprecia elevación alguna del segmento ST (figura 1).

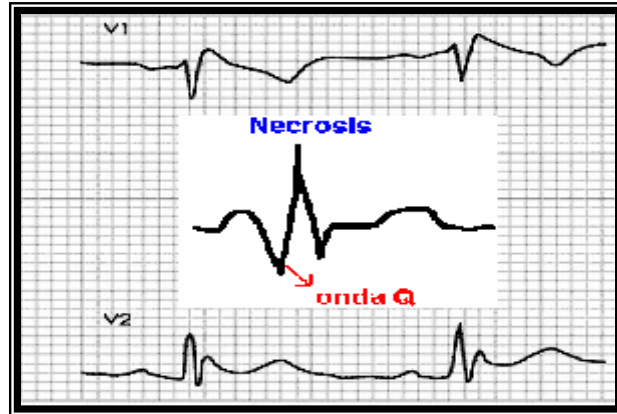


Figura 1. Electrocardiograma (elevación del segmento ST en la parte superior e inferior y presencia de onda Q en el centro).

- **Criterios de pruebas bioquímicas.** Un porcentaje de pacientes presentan signos y síntomas atípicos y trazados electrocardiográficos muy poco sugerentes de isquemia miocárdica, sobre todo, si se tiene en cuenta el tiempo de evolución de los síntomas hasta su valoración médica. El uso de pruebas bioquímicas, como marcadores de necrosis miocárdica, se convierte en una utilidad diagnóstica muy importante. La determinación de estos marcadores y su evolución en el tiempo, junto con los síntomas clínicos del paciente, presentan la mayor eficacia diagnóstica en el SCA (12-15).

3. Marcadores bioquímicos. (16)

Una vez que se ha producido la lesión de la membrana, la velocidad de aparición de moléculas intracelulares en circulación depende sobre todo del flujo sanguíneo; por lo tanto, un área de miocardio lesionado con una perfusión sanguínea deficiente, libera estas moléculas mucho más lentamente que las áreas en las que la recirculación es más adecuada.

La zona subendocárdica del ventrículo izquierdo posee una menor irrigación sanguínea y, por lo tanto, las células alcanzan la muerte más rápidamente en esa región en caso de infarto de miocardio. Sin embargo, dado que el flujo sanguíneo de las arterias colaterales es reducido, se retarda la liberación de contenido intracelular a circulación general. Estas diferencias del flujo colateral, probablemente, contribuyen a reducir la correlación entre la cantidad de tejido miocárdico perdido y la destrucción miocárdica estimada a partir de las moléculas liberadas.

Otro factor que afecta la liberación del contenido intracelular es el tamaño molecular de sus componentes; así, la enzima CK, con un peso molecular de 80.000 daltons, es liberada antes que la enzima AST, que posee un peso molecular de 93.000 daltons y ésta, a su vez, es liberada antes que la enzima LD, con un peso molecular de 140.000 daltons.

Desde el punto de vista diagnóstico en el SCA, de las moléculas liberadas, las de mayor interés son las proteínas tanto enzimáticas como no enzimáticas. Esto se debe a que son moléculas intracelulares, identificadas y que suelen ser fácilmente medibles en el laboratorio. Existen numerosos datos clínicos y experimentales que indican que, si estas moléculas no son liberadas a la circulación, podría afirmarse que las células han sobrevivido a la lesión isquémica por lo que puede considerarse como reversible (17, 18).

El uso de biomarcadores cardíacos en la diagnosis y seguimiento del SCA puede ayudar a facilitar un buen juicio clínico. Los test clínicos de laboratorio se focalizan en dos puntos fundamentales (19):

- 1) Para estudiar (y revertir potencialmente) las causas.
- 2) Estimar la gravedad y riesgo de progresión de la enfermedad.

Para disminuir la demora en establecer el diagnóstico, es preciso contar con técnicas de diagnóstico rápidas y específicas, que delimiten qué grupos de pacientes se van a someter a los posibles beneficios de tratamientos agresivos, no exentos de efectos secundarios.

Las pruebas bioquímicas relacionadas entre sí y con la sospecha clínica y electrocardiográfica, logran un alto grado de especificidad diagnóstica (entendiendo como tal el porcentaje de población con diagnóstico distinto al SCA entre los individuos que realmente no tienen SCA), así como un elevado valor predictivo positivo (proporción de pacientes con SCA y cuyo resultado es positivo para dicho proceso).

En estas patologías la sensibilidad diagnóstica (porcentaje de la población con la prueba positiva entre los individuos con SCA) no tiene tanto valor como la especificidad debido a que interesa asegurarse el menor número de resultados falsos negativos (prueba negativa en un paciente con SCA) (20 y 21).

Cada una de las magnitudes bioquímicas tiene sus características que la hacen útil en un momento determinado del proceso de diagnóstico y, por tanto, los laboratorios han de dar respuesta a unas cuestiones de importancia con respecto a estos parámetros bioquímicos:

- Qué pruebas bioquímicas se deben solicitar.
- En qué momento del proceso de diagnóstico se han de pedir.
- A lo largo del proceso de diagnóstico, cuál debe ser la frecuencia de petición.
- Cuáles son los distintos criterios de interpretación clínica de estos datos de laboratorio.

A continuación se describen las principales moléculas estudiadas a lo largo de los últimos años, que se liberan a circulación sanguínea tras un SCA:

3.1 Proteínas enzimáticas.

De las enzimas liberadas después de una lesión isquémica irreversible, la mayoría son enzimas solubles o citoplasmáticas y, en menor cantidad, son mitocondriales.

- **Aspartato aminotransferasa (AST, AAT, SGOT, L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.1).**

Cada molécula de AST consta de dos unidades de la misma cadena polipeptídica. Los pesos moleculares de estos dímeros son 93.000 daltons para la enzima soluble y 90.400 daltons para la enzima mitocondrial (22).

Cataliza la transferencia reversible de un grupo α -amino de un aminoácido específico (L-glutamato o L-aspartato) a un cetoácido específico (2-oxoglutarato u oxaloacetato). Es bastante inespecífica para el par oxoglutarato/glutamato, mostrando una relativa inespecificidad para el segundo sustrato que preferentemente es aspartato/oxaloacetato pero puede ser también cualquier otro par aminoácido/oxoácido. Aunque a pH fisiológico la reacción es energéticamente favorable hacia la formación de aspartato y α -cetoglutarato, in vivo, la reacción transcurre en sentido contrario proveyendo al organismo de una fuente de nitrógeno para el ciclo de la urea. (Figura 2).

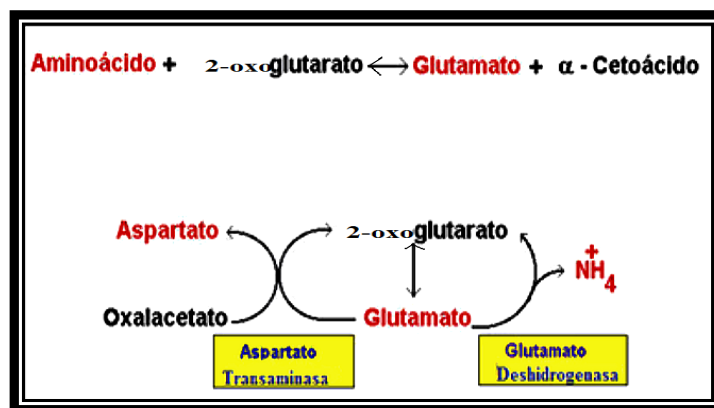


Figura 2. Esquema de la reacción catalizada por AST.

El hígado, corazón, músculo esquelético y riñón tienen actividades similares de AST; por ello, la liberación de la enzima no es órgano-específica.

Durante mucho tiempo su determinación ha resultado útil en el diagnóstico del SCA, por su alta presencia en músculo cardíaco y por su corta vida media, aproximadamente 20 horas, pero debido a su gran inespecificidad cada vez se usa menos (23-25).

- Lactato deshidrogenasa (LD, LDH, (S)-lactato-NAD⁺ óxidoreductasa, EC 1.1.1.27).

La enzima LD posee un peso molecular de aproximadamente 140.000 daltons y es un tetrámero compuesto por subunidades de peso molecular 35.000 daltons cada una. Las subunidades consisten en dos formas, H (“Heart”, corazón) y M (“Muscle”, músculo), las cuales se encuentran polimerizadas para formar las cinco isoenzimas de LD. (26)

Cataliza una reacción redox reversible, en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD⁺. El equilibrio de la reacción es dependiente del pH; con pH alcalino se favorece la conversión de lactato a piruvato y el pH neutro favorece la reacción inversa (figura 3) (27).

La isoenzima principal del corazón (HHHH), ejerce una actividad máxima en presencia de concentraciones reducidas de piruvato y es inhibida por un exceso de éste. Por el contrario, la principal isoenzima del músculo (MMMM) exhibe una actividad máxima con altas concentraciones de piruvato y, un exceso de éste, produce menor grado de inhibición. Esto se debe a que el corazón metaboliza ácidos grasos e hidratos de carbono a una velocidad constante con una oxidación completa del piruvato a través del ciclo de Krebs. Por el contrario, el músculo, debe operar a las bruscas demandas energéticas durante el ejercicio con grandes incrementos de los niveles tisulares de piruvato y lactato causados por el metabolismo anaerobio.

La enzima LD se encuentra en el citosol de todas las células humanas y, por lo tanto, tendría muy poco valor de especificidad diagnóstica si no fuese por la presencia de isoenzimas, que poseen actividades diferentes en los distintos tejidos. El corazón y los eritrocitos contienen principalmente LD₁ y LD₂, mientras que el músculo esquelético y el hígado contienen LD₃ y, en menor grado, LD₄ y LD₅. El suero normal contiene principalmente LD₂, con una menor cantidad de LD₁ y de las otras isoenzimas. Si las enzimas provienen del tejido cardíaco es posible, a menudo, observar una modificación sérica del cociente LD₁/LD₂ (28).

Por otro lado, la vida media de LD depende de la isoenzima considerada; la isoenzima 1 (HHHH) exhibe una vida media de aproximadamente 100 horas, pero la isoenzima 5 (MMMM) posee una vida una vida media de sólo 10 horas. La importancia de este fenómeno es evidente en la discusión del mecanismo de liberación de enzimas durante el SCA. Por ello, su determinación ha sido utilizada durante mucho tiempo, aunque actualmente existen marcadores más específicos (29).

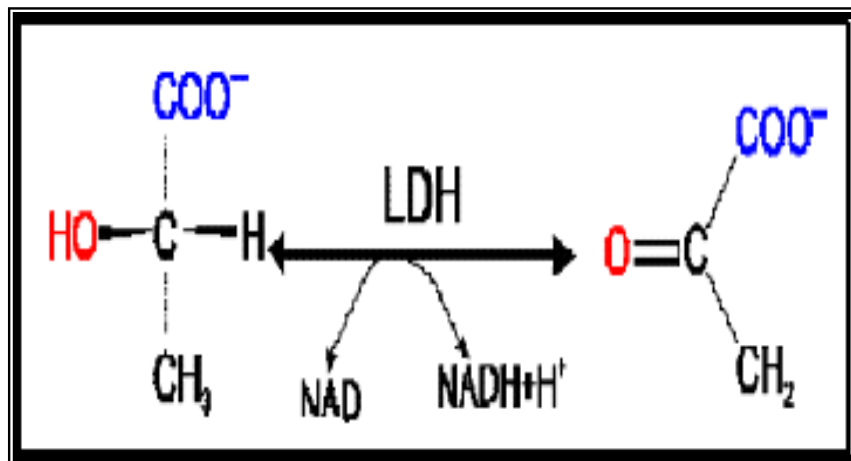


Figura 3. Esquema de la reacción catalizada por LDH o LD (molécula de lactato a la izquierda y de piruvato a la derecha).

- **Creatín quinasa (CK, CPK, adenosina trifosfato-creatín-N-fosfotransferasa, creatín fosforiltransferasa, EC 2.7.3.2).**

La molécula de CK es un dímero compuesto por dos subunidades, no idénticas: M y B. Cada una tiene un peso molecular de 40000 daltons. Estas subunidades M y B, son el producto de dos genes estructurales distintos, y puesto que la forma activa de la enzima es un dímero, solamente pueden existir tres pares distintos de subunidades: BB o CK1 (“*Brain*”), MB o CK2 y MM o CK3 (“*Muscle*”). Las tres isoenzimas se encuentran en el citosol celular o asociadas con estructuras miofibrilares (30).

Cataliza la fosforilación reversible de la creatina por el adenosín-trifosfato (ATP). El principal componente fosforilado del músculo esquelético y cardíaco es el fosfato de creatina, que está, aproximadamente, unas 8 veces en exceso sobre el ATP. Cuando el músculo se contrae, el ATP se consume y la enzima cataliza la refosforilación del ADP para formar ATP, usando fosfato de creatina como reservorio de la fosforilación. Esto ocurre en situaciones con un incremento de trabajo cardíaco, como en la hipoxia, hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca (31).

En el tejido fetal predomina CK-BB y, con el transcurso del tiempo, esta isoenzima es reemplazada por MB y luego por MM hasta que, finalmente, la isoenzima significativa es MM. CK-MM, predomina en el músculo esquelético y cardíaco. CK-MB, está presente en el músculo cardíaco (de 25 a 46% de la actividad de CK total) y también, en menor grado, en el músculo esquelético (< 5%) y otros tejidos (32).

En el suero normal, al menos un 95% es del tipo MM, y este fenómeno probablemente sea el resultado de la liberación desde el músculo esquelético, en particular durante la actividad física.

La actividad de CK se encuentra elevada en necrosis o atrofia aguda del músculo estriado, enfermedades del corazón, hipertermia maligna, últimas semanas de embarazo, hipotiroidismo y, ligeramente, en inyecciones intramusculares y espasmos musculares. Aunque no es específico del corazón, se utiliza en la diagnosis del SCA, sobre todo, en el caso de CK-MB (33).

- Mieloperoxidasa (lactoperoxidasa, MPO, donante: hidrógeno-peróxido óxidoreductasa, EC 1.11.1.7).

Es una hemoproteína de 140000 daltons formada por una cadena pesada y una ligera. Su función es la conversión de cloruro y peróxido de hidrógeno a hipoclorito. Se almacena en los gránulos azurófilos de los polimorfonucleares neutrófilos y en los macrófagos. Se libera en el líquido extracelular y en la circulación general durante un proceso inflamatorio y está implicado en la oxidación de lípidos (34).

El estrés oxidativo y la inflamación, juegan un papel importante en la desestabilización de la placa aterocoronaria. La infiltración de los macrófagos y los neutrófilos en esta placa aterosclerótica, participa en la transformación de una placa estable en la arteria coronaria a una lesión inestable con una fina capa fibrosa (35). Estas células secretan a la matriz metaloproteinasas (MMPs) y mieloperoxidasa metal-independiente, las cuales degradan la capa de colágeno, que protege la placa de ateroma, transformándola en una fina capa fibrosa que es vulnerable a la erosión o ruptura, dando lugar al SCA (36-38).

Los aumentos de mieloperoxidasa no parecen ser específicos de enfermedad cardíaca ya que, la activación de neutrófilos y macrófagos, puede ocurrir en algunos procesos infecciosos, inflamatorios (39) o de enfermedad infiltrativa.

- Isoenzima BB de la glucógeno fosforilasa (amilofosforilasa, EC 2.4.1.1).

La glucógeno fosforilasa es una enzima dimérica (masa molecular de un monómero, 97000 daltons), compuesto por subunidades idénticas (homodímeros) (figura 4).

Se encuentran tres isoenzimas en los tejidos humanos: GPLL (hígado), GPMM (músculo) y GPBB (cerebro). Estas isoenzimas están codificadas por genes diferentes y difieren tanto en estructura como en función, reflejando diferencias en el metabolismo tisular. Tanto la isoenzima BB como la MM se encuentran en el corazón humano, pero la isoenzima BB es predominante. El músculo esquelético, por el contrario, contiene sólo GPMM. La GPLL es el isoenzima predominante en hígado humano y otros tejidos excepto corazón, músculo esquelético y cerebro (40).

La enzima GPBB cataliza el primer paso de la glucógenolisis, en el que el glucógeno pasa a glucosa-1-fosfato por fosforolisis en presencia de fosfato inorgánico y, a través de la movilización del glucógeno, está especialmente asociada con la provisión de un suplemento urgente de glucosa durante períodos de hipoxia e hipoglucemia (41,42). Esto sucede, por ejemplo, en el caso del daño miocárdico.

En la mayoría de pacientes con SCA, GPBB aumenta entre 2 y 4 horas tras el inicio del dolor torácico y tiene su máximo entre las 6 a las 20 horas; vuelve a valores normales en 1-2 días y todo ello ha hecho cuestionar su validez como indicador de daño miocárdico irreversible (43).

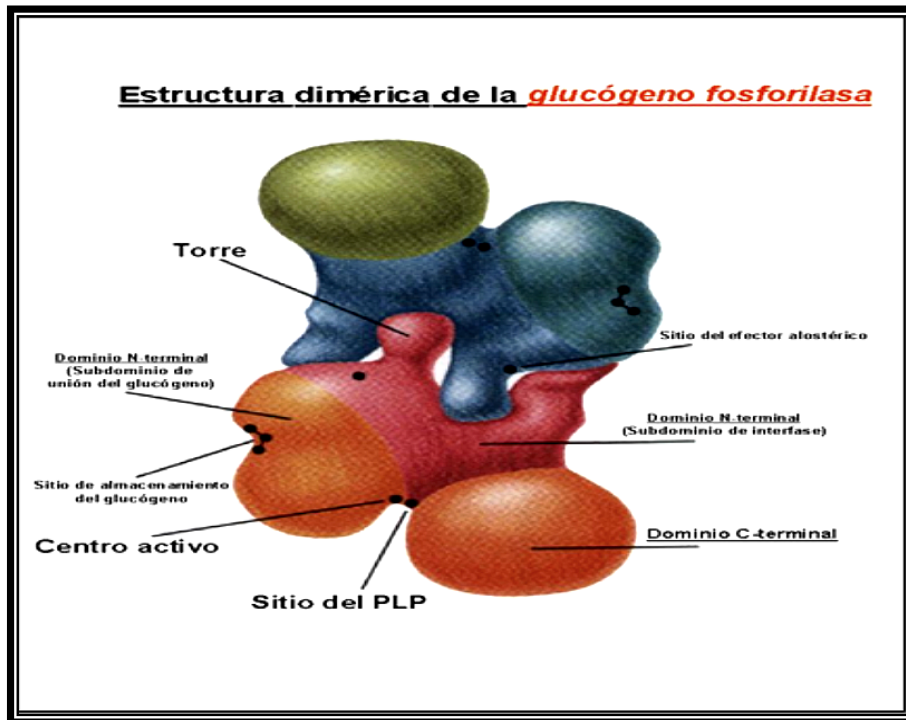


Figura 4. Estructura dimérica de la glucógeno fosforilasa (PLP = cofactor fosfato de piridoxal)

(Dibujo creado por *Nelio E. Bazán* y *Emilse Paccotti*).

- Las MMPs (metaloproteinasas, EC3.4.24).

Son una clase de 24 endopeptidasas, reguladores fisiológicos de la matriz extracelular, que se encuentran en la mayoría de los tejidos. La producción de estas sustancias está regulada en la transcripción por ciertos precursores y por la interacción con factores de crecimiento; además, tienen inhibidores endógenos específicos conocidos como inhibidores titulares de metaloproteinasas (TIMPs). En el corazón, estas sustancias participan en la inestabilidad de la placa, en la remodelación vascular y ventricular tras enfermedad cardíaca (44).

De estas endopeptidasas destaca la MMP-9 (metaloproteinasa 9, EC 3.4.24.35), proteínasa dependiente de zinc y que se conoce como gelatinasa B (45-48). Las gelatinasas tienen 3 repeticiones del dominio de unión de fibronectina que le unirá a gelatina, colágeno y laminina. (49)

En el tejido vascular, la MMP-9 y otras MMPs están localizadas en los bordes de las placas ateroscleróticas (50, 51). En tejido cardíaco, la MMP-9 es parcialmente responsable de la degradación de factores de crecimiento después de daño cardíaco. Parece claro que, tras una elevación aguda, la disminución de producción de MMP es parte esencial de la reparación después de daño cardíaco agudo por lo que es estudiado como marcador de SCA (52).

3.2) Proteínas no enzimáticas (53).

Tras la desintegración de la membrana celular, se liberan otros componentes citoplasmáticos como pueden ser **proteínas no enzimáticas**. De ellas la mioglobina, las troponinas, la proteína C reactiva y el NT-proBNP son las más estudiadas en el síndrome coronario agudo.

- **Mioglobina.**

Es una proteína globular, relativamente pequeña ya que posee un peso molecular de 17000 daltons, integrada por una sola cadena polipeptídica de 153 aminoácidos y un grupo prostético hemo, idéntico al de la hemoglobina, que contiene hierro (figura 7).

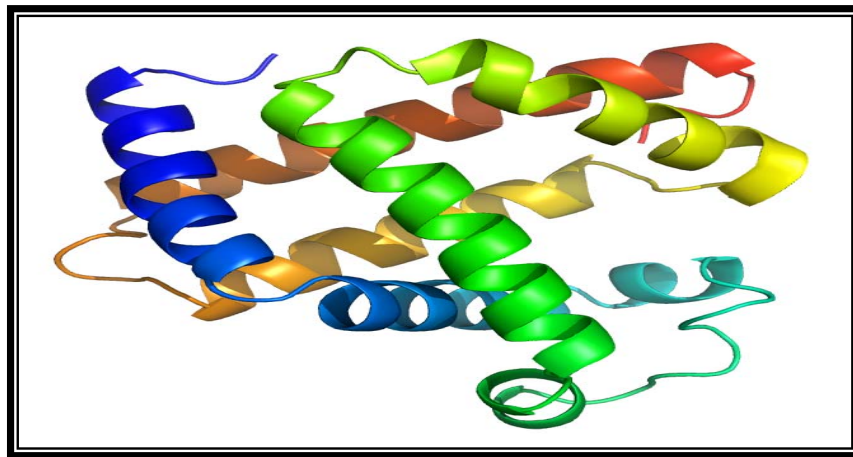


Figura 5. Modelo de dominios helicoidales en la mioglobina (*Protein data bank*).

Posee la capacidad de funcionar como reservorio intracelular de oxígeno, si bien la cantidad real de oxígeno almacenable alcanza solamente para algunos latidos cardíacos. Normalmente, alrededor del 70 % del oxígeno que llega al corazón es extraído para su utilización. La mioglobina es la molécula encargada de almacenar este oxígeno extraído (54).

La curva de disociación del oxígeno (figura 6), correspondiente a la mioglobina, es diferente de la curva de disociación de la hemoglobina (la mioglobina se une con mayor facilidad y se disocia con mayor dificultad) y, por lo tanto, facilita la entrada de oxígeno en la célula, siendo esencial para el mantenimiento de la función cardíaca.

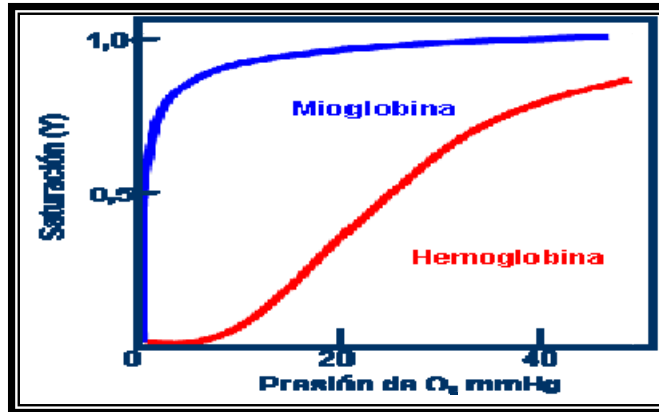


Figura 6. Curvas de disociación de la mioglobina y hemoglobina con el oxígeno.

Se encuentra en células del músculo esquelético y cardíaco. La mioglobina del músculo esquelético y la del cardíaco son inmunológicamente idénticas y no pueden ser distinguidas por métodos inmunológicos. Se libera como resultado de daño celular y puede aparecer, posteriormente, en orina debido a su masa molecular relativamente pequeña. Debido a su liberación en las primeras horas tras un SCA y a su alta concentración en músculo cardíaco, es un marcador muy utilizado desde hace años y hasta la actualidad en el SCA. No obstante, existe controversia al no ser cardiospecífico (55).

- La Troponina.

Complejo proteínico regulador de la función contráctil del músculo estriado. Consta de 3 polipéptidos distintos: Troponina C, que fija el calcio; Troponina T, que liga el complejo troponina a la tropomiosina; y Troponina I, que es la subunidad inhibidora del complejo troponina-tropomiosina.

Este complejo sirve para regular la interacción calcio-dependiente de actina y miosina, por eso juega un papel integral en la contracción muscular. Cada una de las tres subunidades, que conforman la troponina, existe en 3 isoformas diferentes que son específicas del tipo de fibra muscular del que proceden (56). (Figura 7)

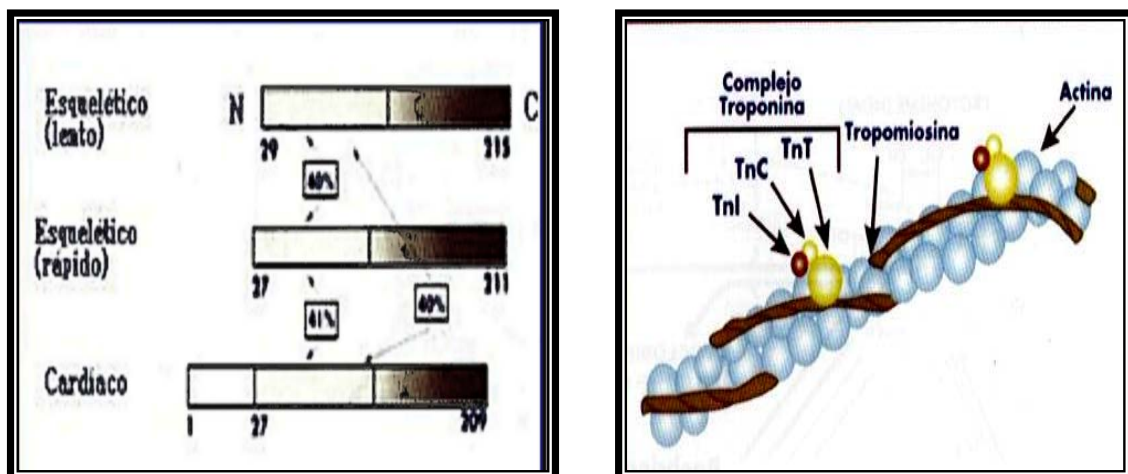


Figura 7. Izquierda. Heterogeneidad de las isoformas. Derecha. Estructura de una miofibrilla. (Cummigs et al, AMER. Heart Journal. 1987).

La troponina C es el componente sensor del Ca^{2+} y tiene dominios de alta y baja afinidad por este catión. En el músculo en reposo, los sitios de alta afinidad son ocupados por el Ca^{2+} mientras que los de baja afinidad están vacíos. Cuando el calcio es liberado del retículo sarcoplásmico, tras el estímulo nervioso provocado en la contracción, ocupa los sitios de baja afinidad produciéndose un cambio de conformación que es transmitido a los otros componentes del complejo troponina y luego a la tropomiosina (57).

Parece ser que la troponina T controla la posición de la tropomiosina en el filamento delgado entre la actina y la cabeza S1 de la miosina. La tropomiosina interacciona con las cabezas S1 de la miosina cuando el músculo esquelético es activado por impulsos nerviosos (58).

La Troponina I, como se ha dicho anteriormente, existe en tres formas moleculares distintas (isoformas) encontrados en fibras de músculo rápidas, fibras de músculo lentas y corazón (cTnI), ésta última expresada tanto en aurículas como en ventrículos y siendo de mayor interés en el SCA. La cTnI tiene 30 residuos extra en el extremo amino terminal y se libera precozmente al torrente sanguíneo después de un SCA; parece persistir en plasma durante, al menos, 5 a 7 días (59-62).

La Troponina I y la Troponina T (63-70), que permanece presente en la sangre durante 10 a 14 días, pero es menos precoz y cardioespecífica que la anterior, están siendo muy usadas en la actualidad como marcadores de síndrome coronario de urgencia al ser liberadas por el tejido cardíaco.

- Proteína C Reactiva (PCR).

Es sintetizada por los hepatocitos como proteína de 115000 daltons, integrada por cinco subunidades idénticas dispuestas en un pentámero cíclico. En presencia del ión calcio, dicha proteína podría formar un complejo con el polisacárido pneumocócico C, en una reacción de floculación, viniendo de aquí su nombre (71).

Una variedad de estímulos incluyendo la infección, el trauma importante, la cirugía, y condiciones inflamatorias crónicas (72) puede dar lugar a una mayor producción de PCR. Después de un estímulo, las concentraciones en plasma aumentan hasta duplicarse en 5-8 horas. Como proteína reactante de fase aguda (73) que es, puede aumentar en 100 a 1000 veces su valor inicial en procesos inflamatorios e infecciosos.

El mecanismo implicado, en la elevación de la proteína C reactiva (PCR), en el síndrome coronario agudo es motivo de controversia en la actualidad (74-76). Teóricamente, el origen de la actividad inflamatoria podría residir tanto en la placa de ateroma complicada, como en el foco de necrosis miocárdica (77-81). La **PCR (proteína C reactiva) ultrasensible** (rangos de medida de concentración muy bajos), se está empezando a usar como marcador bioquímico de la inflamación en las lesiones de las arterias coronarias, en prevención primaria y secundaria (82, 83).

- Péptido natriurético tipo B (BNP) y segmento NT-proBNP.

Los péptidos natriuréticos contienen en su estructura un anillo de 17 aminoácidos, 11 de los cuales son idénticos entre los distintos péptidos. Esta estructura de anillo es esencial para su unión al receptor (ligado a la guanilato ciclasa) (figura 8).

El sistema de péptidos natriuréticos tiene como función oponerse a los efectos negativos del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA), promoviendo la pérdida de sodio y de agua con la consiguiente reducción del volumen de fluidos corporales. Estas acciones también conducen a la vasodilatación y a una reducción en la presión arterial a nivel renal.

El péptido BNP y el fragmento N-terminal de su propéptido (NT-proBNP) son liberados de los miocitos cardíacos, en respuesta a incrementos de presión sanguínea en la pared ventricular (84-92). Incrementos tanto del diámetro de la cámara ventricular, como de la presión dentro del ventrículo izquierdo, durante la remodelación tras un infarto transmural, o como consecuencia de un daño isquémico primario, puede contribuir a la elevación de los péptidos natriuréticos observado en pacientes con SCA (93-108).

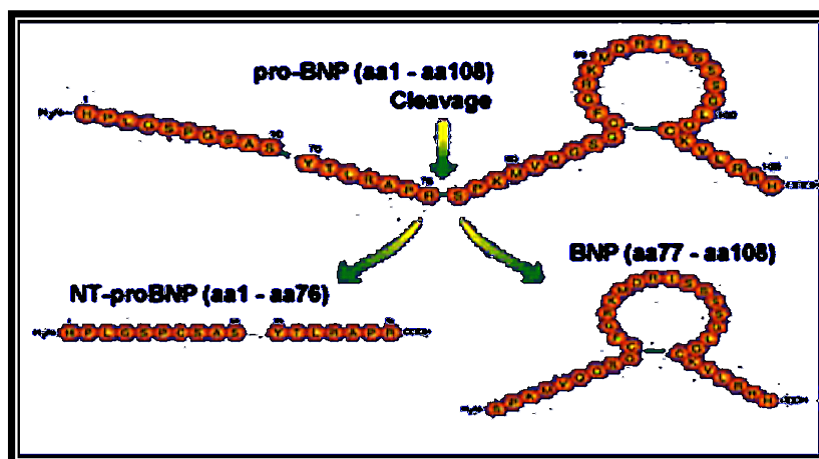


Figura 8. Estructura de BNP y NT-proBNP.

- El sCD40L (ligando soluble de CD40; CD: cluster determinant o antígeno de superficie de diferenciación leucocitaria).

CD40 es una proteína integral de membrana de 40000 a 45000 daltons que contiene 4 dominios extracelulares ricos en cisteína de 45 aminoácidos cada uno, propios de la familia del TNF-R (receptor del factor de necrosis tumoral) (109). Su expresión es ubicua, hallándose en todas las células presentadoras de antígenos (células B, células dendríticas, monocitos/macrófagos), células T, epitelio tímico, endotelio vascular, queratinocitos y fibroblastos. También, se ha encontrado en varios tipos de carcinomas como el de ovario, nasofaringe, hígado, vejiga y mama. El fragmento citoplasmático del CD40 se asocia a segundos mensajeros de la familia TRAF (factor asociado al receptor del TNF). Dicha asociación modula la actividad de quinasas y fosfatasa que afectan el ciclo celular (110-114).

CD40L (CD154, gp39) es una proteína, de 32 a 39 KDa, que se expresa predominantemente en linfocitos T CD4 activados, pero también se ha descrito en células T CD8, eosinófilos, mastocitos, basófilos, células asesinas naturales y células dendríticas (115). Desde el punto de vista estructural, en la membrana se produce una asociación en la que CD40L forma un trímero y CD40 se une a dicho trímero en la interfase entre dos monómeros. Las interacciones CD40/CD40L son claves en la regulación de numerosos procesos de activación del sistema inmune (116) (figura 9). La molécula CD40, está presente en circulación sanguínea de forma soluble (sCD40), deriva de la activación de plaquetas y tiene actividad biológica que puede activar una reacción inflamatoria en las células del endotelio vascular, secreción de citocinas y quimiocinas (117).

Se han demostrado aumentos en la concentración de sCD40L (ligando soluble de CD40) en desórdenes inflamatorios como son las enfermedades autoinmunes, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria ósea, así como en hipercolesterolemia y diabetes (118).

En el contexto de un SCA, el CD40L ligado a la membrana y el sCD40L (soluble) interactúan con la molécula de receptor de CD40 provocando la liberación de la matriz de MMPs con la subsiguiente desestabilización de la placa (119). La liberación de factores tisulares activa a las plaquetas, las cuales producen más sCD40L y perpetúa la inflamación y la actividad protrombínica en la vasculatura.

Se han observado aumentos de sCD40L en pacientes con IAM, angina inestable y a consecuencia de intervenciones coronarias percutáneas, así como en mujeres aparentemente sanas que desarrollaron IAM o muerte cardiovascular (120).

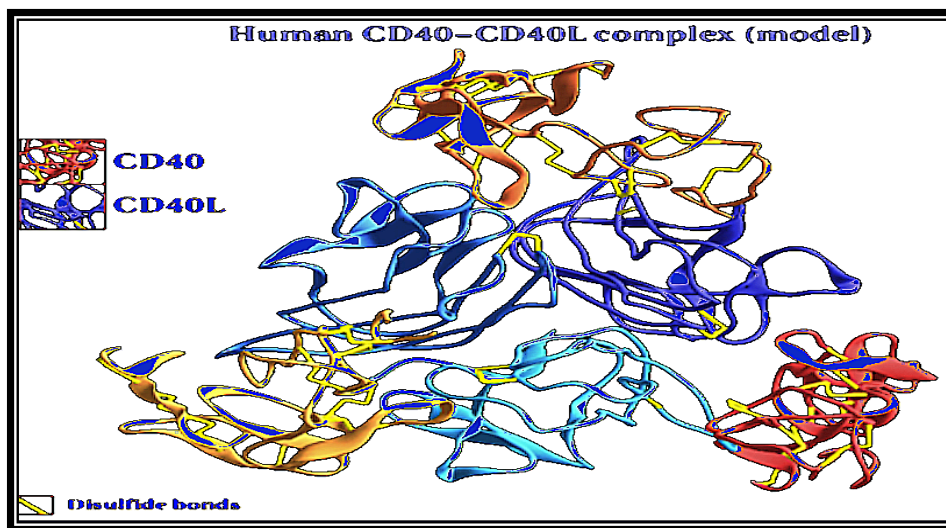


Figura 9. Complejo CD40L-CD40 (MC. Peitsch, DR. Stampf, TNC. Wells, JL. Sussman The Swiss-3DImage collection and PDB-Browser on the World-Wide Web. *Trends in Biochemical Sciences* **20** :82 - 84 (1995)).

- Proteína A plasmática asociada a embarazo (PAPP-A).

Es una glicoproteína sintetizada por el sincitiotrofoblasto, con un peso molecular elevado (200000 daltons), que ha sido descrita como factor de crecimiento similar a insulina (IGF). (121)

Potencialmente es una molécula proateroesclerótica, a través de su acción desintegradora de la capa protectora de la placa de ateroma. La PAPP-A, en situaciones fisiológicas normales, se encuentra en los fibroblastos humanos y se libera, durante la ruptura de la placa aterosclerótica, como un homodímero activo, desacomplejado de su inhibidor proMBP (pro forma de la proteína básica mayor eosinofílica) (122). La PAPP-A ha sido evaluada como marcador de riesgo cardiovascular en individuos hiperlipidémicos asintomáticos, mostrando una correlación con la degradación de las placas ateroscleróticas carotídeas (123-131).

En el embarazo, la PAPP-A circula en un complejo heterotetramérico, consistente en dos subunidades de PAPP-A unidas, covalentemente, con 2 subunidades de la proforma de la proteína básica mayor eosinofílica (proMBP) que es su inhibidor endógeno (132). Se cree que, la PAPP-A circulante en un SCA, es una forma distinta de la PAPP-A encontrada en el suero de embarazadas (133).

- Albúmina modificada por isquemia.

La observación de que la isquemia miocárdica produce una baja capacidad de unión del cobalto con la albúmina, ha sido un desarrollo reciente de la FDA (Food and Drug Administration) (134).

El test ACB es un ensayo cuantitativo que mide la albúmina modificada por isquemia (IMA) en suero humano. Los métodos actuales van encaminados hacia la tecnología del inmunoanálisis (135, 136).

Su determinación tiene un pobre poder discriminador entre pacientes isquémicos con y sin infarto de miocardio. Un test positivo ACB, no muestra diferencias entre angina inestable y necrosis miocárdica inestable, donde los marcadores de necrosis no están todavía aumentados. Se necesitará evidencia clínica adicional para dar soporte a este marcador (137-150). Además, se encuentran valores aumentados de albúmina modificada por isquemia en pacientes con cáncer, infecciones, enfermedad renal en estadio final (151), enfermedad hepática, e isquemia cerebral.

- Factor de crecimiento placentario (PIGF).

Es una proteína formada por un heterodímero de 50000 daltons consistente en 149 aminoácidos, de la familia de proteínas derivadas de plaquetas, y con alta homología con el factor de crecimiento del endotelio vascular; por ello, funciona como potente quimioatrayente de monocitos (efecto inductor de quimiotaxis en el cual células del organismo dirigen sus movimientos de acuerdo a ciertas sustancias químicas) y está envuelta en la regulación del crecimiento del endotelio vascular (152).

Las funciones biológicas del PIGF parecen estar relacionadas con la iniciación del proceso inflamatorio, lo cual incluye el reclutamiento de macrófagos circulantes hacia la lesión aterosclerótica y la estimulación del crecimiento en las células musculares (153-156).

La búsqueda de procesos implicados en la aterosclerosis y la inestabilidad de placa ha llevado a descubrir que el proceso inflamatorio es fundamental (157); el PIGF parece que sí es estable en circulación y, por ello, debe ser considerado un fuerte candidato como biomarcador de inestabilidad de placa, isquemia miocárdica y prognosis de pacientes con SCA.

- Lipoproteína asociada a fosfolipasa A2.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son una población de partículas heterogéneas, respecto al tamaño, densidad y composición química (158-160). Estas diferencias han partido del reconocimiento de 2 fenotipos distintos: fenotipo A, que se asocia con partículas de LDL grandes y huecas; y fenotipo B, en las cuales predominan partículas de LDL pequeñas y densas (sdLDL) (161). Varios estudios (162) han mostrado que las partículas sdLDL son más aterogénicas que las partículas de LDL grandes y vacías.

El factor activador de plaquetas (PAF), también conocido como acetilhidrolasa o fosfolipasa A2 (PLA2), independiente de Ca^{2+} , degrada y oxida fosfolípidos, catalizando la hidrólisis de la unión éster (163). La PAF-acetilhidrolasa en plasma está acomplejada con las lipoproteínas, sobre todo sdLDL; por ello se la conoce como fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2) (164, 165).

Datos recientes de estudios en la población caucasiana indican una asociación positiva entre la masa o actividad de Lp-PLA2 en plasma y el riesgo de incidente aterosclerótico (166-173).

3.3) Otras moléculas. Tras el daño de la membrana citoplasmática se liberan otros componentes del citosol que pueden tener valor como marcadores del SCA (174).

- Colina.

La Fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son los principales fosfolípidos de las membranas celulares. Cuando éstos se degradan en isquemia, por acción de las fosfolipasas, se libera colina a circulación sanguínea.

Varios estudios experimentales (175, 176) apoyan el concepto de que la activación de la fosfolipasa D es el evento clave en varios procesos fundamentales de la desestabilización de la placa coronaria: estimulación de macrófagos por oxidación de LDL, secreción de MMPs, activación de plaquetas por colágeno y trombina, y promoción de la unión de fibrinógeno al receptor de la glicoproteína IIb/IIIa (177).

La colina en sangre total podría ser un predictor significativo de morbilidad cardíaca, cuando se mide en la primera muestra de sangre obtenida en la llegada a urgencias del paciente, ya que su pico de liberación es a las pocas horas del proceso agudo (178).

3.4) Nuevos marcadores relacionados con el SCA.

- **Colesterol.**

En el 2001 se publicaron las guías ATP III del National Cholesterol Education Program Adult (179), un sistema basado en la evidencia de pautas para el control del colesterol. Los ensayos confirman la ventaja de la terapia para disminuir el colesterol en pacientes de riesgo elevado y apoyan el objetivo de una concentración sérica de LDL-Colesterol (lipoproteína de baja densidad ligada al colesterol) <100 mg/dL. Por las mismas razones se recomiendan unos niveles de LDL-C < 70 mgdL cuando el riesgo es muy alto.

Los exámenes epidemiológicos han demostrado que los niveles totales del colesterol en suero están correlacionados de forma continua con el riesgo de enfermedad cardiovascular sobre una amplia gama de valores.

- **Ácidos grasos libres.**

La mayoría de los ácidos grasos libres en suero (AGL) están unidos a la albúmina, una pequeña proporción se encuentran en forma soluble (AGL soluble). En las bases de los descubrimientos preliminares, las concentraciones de AGL solubles, más que AGL total, puede proveer una guía sensible a la patofisiología de enfermedad coronaria (180).

Los mecanismos que inician y mantienen aumentados las concentraciones de AGL tras isquemia no están claros. Un aumento de catecolaminas sanguíneas en asociación con isquemia, sugiere que un aumento de las concentraciones de AGL solubles resulta de un aumento de AGL liberado por la lipólisis adiposa (181).

Aunque la isquemia activa la oxidación lipídica en las células cardíacas, el gran incremento en suero parece atribuirse a los AGL originados de otros tejidos, como el adiposo. Los datos sugieren que en pacientes con síntomas isquémicos, la monitorización de AGL solubles plasmáticos puede ser indicador temprano de isquemia cardíaca. Los ensayos adicionales necesitan ser evaluados para su uso potencial como biomarcador de isquemia cardíaca (182, 183).

- Estudios genéticos

En la actualidad se está aplicando la genética en el estudio del SCA. Uno de los trabajos más importantes (184) se realizó en la población de Islandia donde se identificaron las primeras variantes genéticas ligadas a la forma común del SCA. Entre otras conclusiones, se demuestra que las variantes de un gen contribuyen al riesgo de enfermedad aumentando la producción de una molécula proinflamatoria llamada leukotrieno B4 (LTB4). LTB4 contribuye a la inflamación de las placas que se acumulan en la pared interna de las arterias, aumentando la propensión de las placas a su ruptura. Éste es el acontecimiento que precede directamente la mayoría de los SCA.

Estos resultados han dado un acercamiento terapéutico, directo y potencialmente de gran alcance para prevenir el SCA: inhibir la síntesis de LTB4. Es el efecto biológico básico con el que se diseñan dos compuestos en desarrollo:

1. DG051, una molécula pequeña de primera generación desarrollada en la unidad de química en Chicago, es un inhibidor de la hidrolasa del leukotrieno A4 (LTA4H). LTA4H es la proteína codificada por uno de los genes ligado al riesgo del SCA, y está implicado directamente en la síntesis de LTB4 (185).

2. DG031, se está reformulando actualmente para la prueba clínica de fase III, se desarrolla en Bayer AG y es un inhibidor de la proteína que activa la lipoxigenasa 5, o FLAP. FLAP es codificada por el otro gen aislado en los trabajos de genética del SCA y regula el primer paso en el camino bioquímico de síntesis de LTB4 (186).

También se están aplicando estos descubrimientos de la genética para optimizar el desarrollo clínico en etapas tardías. Además, se está estudiando la relación de genes como el de la beta-miosina, MYBPC3 (proteína C ligada a la cadena pesada de la miosina), troponina I y troponina T (187).

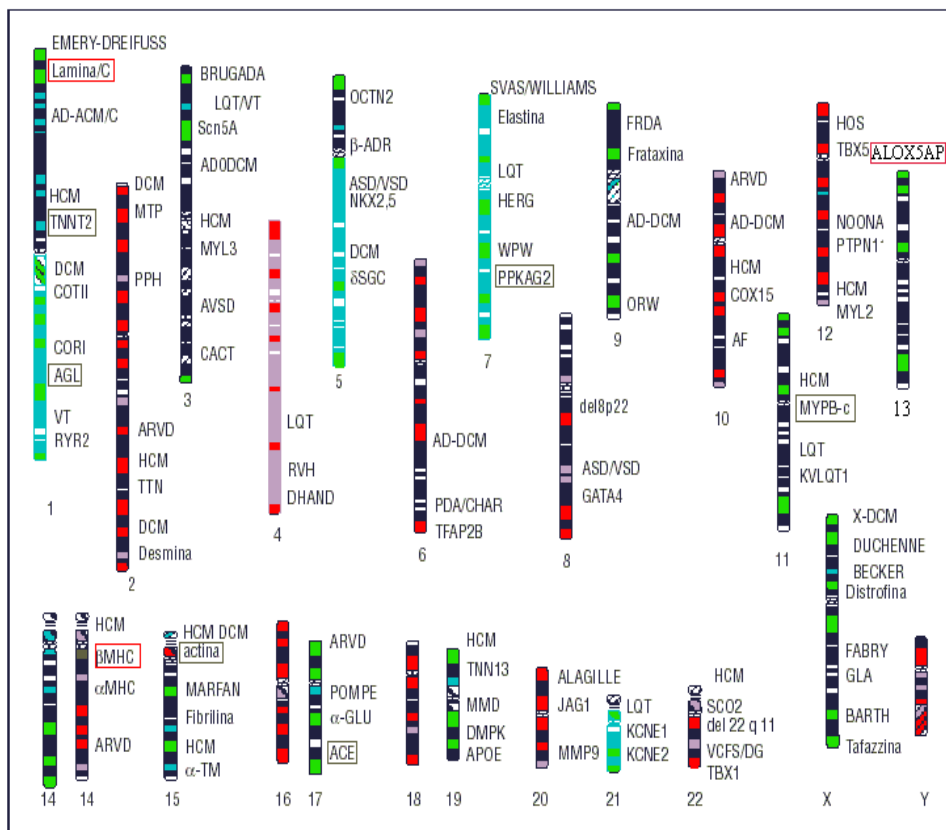


Figura 10. Mapa cromosómico con los principales genes implicados en patología cardíaca y muscular localizados.

- **Otros biomarcadores, metabólicos e inflamatorios**, como el péptido natriurético tipo C (188), la endotelina 1 (189), adelina, miotrofina (190), urotensina II (191-193), adrenomedulina (194), cardiotrofina 1 (195), urocortina (196), dímero D, fibrinógeno (parece estar involucrado en la patogeneidad de los fenómenos trombóticos cardiovasculares), plasminógeno (su déficit se asocia con riesgo trombótico), homocisteína y selectina P soluble (197), han emergido en la literatura.

Ante la gran cantidad de información sobre los marcadores bioquímicos en el diagnóstico y pronóstico del SCA, la NACB establece unas recomendaciones de uso en la práctica clínica:

- Recomendaciones de la NACB para el SCA (198-199).

En la sexta conferencia sobre la estandarización en la práctica del laboratorio, patrocinada por la **National Academy of Clinical Biochemistry (NACB)**, y que se llevó a cabo el 4 de agosto de 1998, en la reunión anual de la AACC (American Association for Clinical Chemistry), en Chicago, se creó un comité de expertos para redactar las recomendaciones en el uso de marcadores bioquímicos en enfermedades cardiovasculares. A continuación se resumen las conclusiones establecidas en las recomendaciones:

- El síndrome coronario agudo es una serie continua de efectos fisiopatológicos, resultado de la ruptura de una placa aterosclerótica, con la agregación y la formación subsiguiente de trombo plaquetario que puede conducir a las presentaciones clínicas que van desde enteramente asintomático, a la angina inestable, IAM y muerte cardíaca repentina atribuible a las arritmias. Por ello existen muchos marcadores implicados en estos procesos fisiopatológicos.

- El diagnóstico de pacientes con dolor torácico en el servicio de urgencias es uno de los desafíos más difíciles al que hacen frente los médicos de hoy (200). Los miembros de los departamentos de urgencias, cardiología, administraciones del hospital, y los laboratorios clínicos deben *trabajar conjuntamente* para desarrollar un protocolo para el uso de marcadores bioquímicos en la evaluación de pacientes con SCA. Este protocolo debe aplicarse tanto en el servicio de urgencias como en otras áreas del hospital.

- Muchos hospitales tienen hoy un área dedicada al SCA dentro del servicio de urgencias. Estas áreas se han denominado como centros de dolor torácico, cuartos de emergencia del corazón, o algunos otros términos que indican que el diagnóstico eficiente de estos pacientes es un objetivo importante de estos centros. En esta área se debe establecer una pauta de práctica clínica, para la evaluación de pacientes con dolor torácico, que reducirá la variabilidad de prácticas entre médicos e instituciones mejorando, al mismo tiempo, la exactitud de las decisiones diagnósticas.

- El 50% de pacientes con SCA acuden al servicio de urgencias con evidencia de lesión aguda del miocardio en el electrocardiograma (ECG). En estos pacientes (201, 202) se debe considerar una intervención aguda de terapia con agentes trombolíticos o la angioplastia dentro de las 12 h después del inicio de los síntomas (203, 204). En pacientes con un ECG claramente diagnóstico (elevaciones del segmento ST, presencia de ondas Q...), se puede establecer que el paciente sufre un SCA y se puede iniciar el tratamiento inmediato sin aguardar los resultados para el marcador bioquímico. En estos casos el análisis del marcador bioquímico (por ejemplo, dos veces por día) tiene valor para la confirmación de la diagnosis, para estimar cualitativamente el tamaño del infarto (205), y para detectar la presencia de complicaciones tales como un reinfarto.

- El marcador bioquímico ideal es el que tiene alta sensibilidad y especificidad clínica, aparece de forma precoz después del SCA para facilitar la diagnosis, que permanece elevado durante varios días después del suceso, y vuelve a concentraciones normales en poco tiempo (206). Se recomienda utilizar dos marcadores bioquímicos para la diagnosis del SCA: un marcador precoz (que aumenta en sangre dentro de 6 horas después del inicio de los síntomas) y un marcador definitivo (que se eleva en sangre después de 6-9 horas, con alta sensibilidad y especificidad para lesión miocárdica y que permanece elevado varios días después del inicio) (207).

- Para los pacientes que tienen un ECG ambiguo (sin inversión de la onda Q), los marcadores cardíacos tienen un papel esencial en el diagnóstico de SCA. En 1986, la ACEP (American College of Emergency Physicians) recomendó una pauta basada en la determinación de CK total y CK-MB en suero en el momento del ingreso, 12 y 24 h después y, la determinación de isoenzimas de LD cuando el ingreso fuera posterior a las 24 horas del inicio del proceso agudo. El comité de la NACB cree que esta estrategia no es adecuada para resolver las necesidades de diagnóstico actuales. El estudio del SCA requiere la obtención y determinación de pruebas seriadas (a lo largo del tiempo en intervalos establecidos, por ejemplo, cada 6 horas) en sangre para los marcadores cardíacos aceptados en esta reunión.

- A diferencia de la mioglobina, CK total, CK-MB, y LD, los resultados positivos para cTnT y cTnI (209) son altamente indicativos de daño del miocardio, sin existir liberación de estas proteínas en músculo esquelético u otros tejidos.

- Se han producido mejoras importantes en la especificidad y sensibilidad analítica de nuevos marcadores cardíacos (tales como troponina cardíaca (210-214)) y aumentos en la sensibilidad analítica para marcadores más antiguos tales como CK-MB. Un aumento de la sensibilidad analítica en estas pruebas, hace que aumentos pequeños en marcadores sensibles, tales como troponina cardíaca (215), proporcionen la información clínica adicional que no es evidente con los marcadores convencionales enzimáticos. Los nuevos marcadores se comparan a los marcadores estándares aceptados, y puede ocurrir que los resultados estén discordes el uno del otro.

- El riesgo es aditivo, es decir, cuanto más elevadas son las concentraciones de cTnT y de cTnI en sangre, más alto es el riesgo anticipado. Así, la detección de un bajo grado de lesión del miocardio es posible con el uso de una baja concentración de corte para la troponina cardíaca, tal podría ser el uso del límite superior del intervalo de referencia. Se trata de una estrategia que es menos aplicable para los marcadores no específicos tales como CK-MB (216-219).

- Bajo los criterios para el diagnóstico del IAM que son redefinidos por la OMS u otros grupos clínicos como AHA (American Heart Association), el comité de la NACB recomienda la designación de dos puntos de corte para la troponina cardíaca; un límite bajo que detecta una cantidad pequeña de lesión del miocardio pero clasifica esos pacientes como de riesgo elevado, y un límite más alto con extensión de la lesión hasta IAM.

- Los resultados obtenidos de la determinación de CK-MB en suero, entre el límite superior de normalidad y el límite de decisión para IAM se consideraban “zona gris”. Esta práctica era apropiada al no ser el origen de la CK-MB específicamente cardíaco, y había sujetos sanos que tenían en suero actividad o masa medible de CK-MB liberada por el músculo esquelético. El uso de un punto de corte bajo de CK-MB haría que muchos de estos pacientes fueran clasificados incorrectamente como de alto riesgo cardíaco. Para la cTnT y la cTnI, la zona gris no debe utilizarse porque connota incertidumbre en la interpretación clínica. Los pacientes con dolor torácico, con resultados de laboratorio para cTnT y cTnI entre el límite superior del intervalo de referencia y el límite de decisión para IAM deben ser etiquetados como pacientes con “lesión del miocardio” (220).

- Aunque a menudo se sabe el momento de inicio del dolor torácico para los pacientes con sospecha de SCA, algunas veces, esta información no está disponible, o es menos fiable, para pacientes con angina inestable y otras enfermedades cardíacas. Para la práctica clínica rutinaria, la obtención de sangre debe referirse al momento de presentación del síndrome agudo y, cuando sea posible, al tiempo transcurrido desde el inicio del dolor torácico.

- Otro punto importante discutido es el tiempo de respuesta (TATs) de los resultados de laboratorio. Los factores que lo afectan incluyen el retraso en la entrega de la muestra al laboratorio, los pasos preanalíticos necesarios para preparar la muestra, la duración del análisis en sí mismo, y la entrega de resultados al médico. El comité de la NACB recuerda que el tiempo para la entrega de muestras al laboratorio no está siempre bajo control del propio laboratorio; sin embargo, este personal debe trabajar de cerca con las personas implicadas para reducir el retraso al mínimo.

- El análisis de sangre para los lípidos tales como colesterol y las lipoproteínas LDL y HDL se utiliza para establecer el riesgo de enfermedad coronaria (222). Como tal, estos marcadores se están utilizando para el screening de individuos asintomáticos. Como los marcadores cardíacos sensibles han demostrado proporcionar información para la estratificación del riesgo (223), puede haber un ímpetu por utilizar estos marcadores como parte de un panel bioquímico de rutina para detectar la presencia de isquemia silenciosa, o después de una prueba de estrés por ejercicio para detectar la presencia de lesión isquémica. Actualmente, no hay datos disponibles para recomendar el uso de marcadores cardíacos, por ejemplo cTnT o cTnI, para la investigación de síndrome coronario agudo en pacientes asintomáticos. La probabilidad de detectar isquemia silenciosa o silente es extremadamente baja y no puede justificar los costes de programas de investigación (224).

- Muchos participantes de la conferencia creían que la medida continuada de marcadores era útil en la detección de un reinfarto, estimado en un 17% de pacientes con IAM. Si ocurre antes de que el marcador vuelva a concentraciones normales tras el infarto original, puede que no se detecte su presencia porque los marcadores liberados del segundo acontecimiento son indistinguibles de los liberados por el acontecimiento inicial. Por ello, el uso de los marcadores cardíacos que vuelven a concentraciones iniciales en poco tiempo, puede tener una ventaja sobre el uso de los marcadores que tienen un aclaramiento lento de circulación (208).

- Como la troponina se mantiene aumentada muchos días después del IAM es posible que, sin una historia clínica completa, los aumentos pequeños de troponina sin aumento de actividad de CK-MB pudieran reflejar simplemente un IAM en el cual la CK-MB había vuelto a la normalidad. Debido a este hecho, se abogó por el uso de CK-MB masa como prueba disponible para este propósito. Sin embargo, el empleo de la mioglobina podría satisfacer esta necesidad porque sería normal en estos pacientes de presentación tardía del IAM (221).

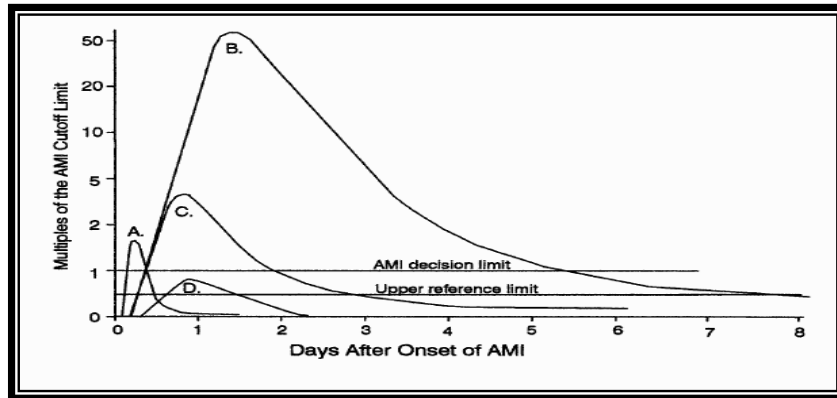


Figura 11. Diagrama del comportamiento de marcadores cardíacos en sangre frente al tiempo después del inicio de los síntomas. Línea A, Mioglobina tras SCA; línea B, troponina tras SCA; línea C, CK-MB tras SCA; línea D, troponina cardíaca después de la angina inestable. (Panteghini M. Acute coronary syndrome. Biochemical strategies in the troponin era. Chest 2002;122:1428-35).

- Los marcadores bioquímicos pueden ser útiles en otras situaciones tales como seguimiento del proceso de revascularización. La revascularización aguda es actualmente el proceso establecido para pacientes con SCA con elevación del segmento ST (225). Los objetivos para la terapia trombolítica y/o angioplastia coronaria transluminal percutánea son recanalizar las arterias ocluidas y reducir la mortalidad. Los marcadores cardíacos pueden ser utilizados para determinar el éxito o fracaso de tales terapias (226, 227).

Cuando la reperfusión es acertada, los pacientes con IAM que desarrollan circulación coronaria alternativa liberarán una cantidad de enzimas y proteínas a circulación (fenómeno de desagüe) en torno a los 90 minutos después de la iniciación de la terapia. La obtención de sangre 60 minutos después de iniciada ésta pueda ser útil en la determinación precoz de una reperfusión acertada pero, en casos de recanalización tardía, podría fallar. Aunque este intervalo es aceptable, podría retrasar cualquier decisión.

- Los marcadores cardíacos también se han utilizado para detectar la presencia de IAM perioperatorio en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos (228, 229). El uso de marcadores cardíacos no específicos, tales como CK, CK-MB, mioglobina, y LD, han limitado su utilidad porque son liberados de tejidos no cardíacos. La utilidad de la troponina cardíaca, para la detección de IAM perioperatorio, ha demostrado ser superior a otros marcadores cardíacos tal como CK-MB.

- Establecer la gravedad del infarto puede ser útil como herramienta de investigación en ensayos clínicos de fármacos nuevos (por ejemplo, terapia trombolítica intravenosa, inhibidores de la trombina, e inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa) o de los procedimientos (por ejemplo, angioplastia) diseñados para limitar el grado de lesión del miocardio, o en estudios que implican lesión que ocurre cuando una arteria ocluida es perfundida repentinamente (230).

- Se ha establecido una **recomendación para las plataformas del análisis y marcadores del infarto agudo de miocardio**. El uso de CK-MB se ha sustituido por cTnT y cTnI por su disponibilidad y porque el coste para tales análisis llega a ser competitivo con los ensayos de CK-MB masa (231). Si un hospital está utilizando ya cTnT o cTnI, el comité de la NACB recomienda que las medidas de los isoenzimas de lactato deshidrogenasa y β -hidroxibutirato deshidrogenasa deben eliminarse inmediatamente, no hay ninguna recomendación en cuanto a la eliminación de las medidas para CK total. Este marcador es barato y fácilmente disponible en laboratorios clínicos, y puede ser muy útil para la detección de lesión o de enfermedad del músculo esquelético. La troponina cardíaca (T o I) es el nuevo estándar para la diagnosis del infarto de miocardio y detección de necrosis celular, substituyendo a CK-MB.

- Como conclusión, el comité de la NACB destacó el establecimiento de las metas analíticas para los análisis de nuevos marcadores bioquímicos. Esto asistirá a fabricantes en la puesta a punto de nuevos procedimientos (232).

4. Objetivos.

El número de pacientes que presentan un cuadro sugestivo de SCA sigue creciendo en las instituciones sanitarias españolas. Las manifestaciones clínicas que presentan dichos pacientes son muy diversas, haciendo difícil el diagnóstico; además, el tiempo transcurrido desde la presentación de los síntomas hasta el tratamiento es directamente proporcional a la mortalidad de estos pacientes.

La información sobre los marcadores bioquímicos utilizados en el diagnóstico del SCA es muy amplia en los últimos años y, a menudo, confusa. Por todo ello, este trabajo pretende revisar los principales marcadores utilizados en los últimos años, así como los que van emergiendo en la literatura, con la esperanza de que los resultados obtenidos en el mismo puedan ser extrapolados a la población que asiste el hospital y poder clarificar información y unificar criterios.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Estudiar los principales marcadores de diagnóstico y pronóstico del SCA en una población perteneciente al Area Sanitaria 6. Esta población se subdivide de forma retrospectiva en si el diagnóstico definitivo es SCA (grupo de casos) o es otra patología diferente (grupo de controles).
2. Recopilar los resultados obtenidos en otros estudios para los marcadores analizados teniendo en cuenta todo lo publicado anteriormente.
3. Comparar el comportamiento de los marcadores estudiados tanto para diagnóstico como para pronóstico del SCA en los grupos de población establecidos, entre ellos y con lo descrito en la bibliografía.

4. Estudiar la influencia de determinados factores fisiológicos individuales, tales como sexo, edad, consumo de tóxicos, hipertensión, hiperglucemia, hipercolesterolemia, alteraciones genéticas,... en el origen y desarrollo de un SCA.

5. Análisis de marcadores (cTnI, CK y LD) en el tiempo de forma seriada.

6. Diseñar una fórmula y un score para la estratificación de riesgo de SCA en pacientes, donde se conviene el uso de distintos marcadores. Validación de este modelo.

7. Demostrar la posible utilidad del modelo estadístico anterior en la práctica clínica.

✓ **MATERIAL Y MÉTODOS.**

1. Población de estudio.

Se trata de un estudio de casos y controles realizado de manera retrospectiva en el hospital Universitario Puerta de Hierro. Este hospital contaba con 500 camas de hospitalización y tenía 16367 ingresos anuales en el momento de realización del estudio. En él se realizaban 507371 consultas y 66781 urgencias anuales.

Se analiza una población de 238 pacientes a los que se les solicita analítica urgente tras acudir al servicio de urgencias del Hospital Universitario Puerta de Hierro, o que permanecen ingresados en el propio hospital, y sugestivos de sufrir un SCA según los criterios estándar de la European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee (234).

El seguimiento se hace desde Septiembre del 2005 a Mayo del 2006. Los pacientes se clasifican en dos grupos: casos (pacientes con diagnóstico definitivo de SCA) y controles (pacientes con diagnóstico definitivo distinto al SCA).

Dentro del grupo de pacientes con SCA, el 13 % tiene dos factores de riesgo, el 15 % tres factores de riesgo y un 6 % presenta los cuatro factores de riesgo estudiados (hipercolesterolemia, hiperglucemia, tabaquismo e hipertensión arterial).

A todos los pacientes se les realiza electrocardiograma, exploración física y analítica en el momento de ingreso y a las 4, 8, 12 y 24 horas según el protocolo de urgencias para dolor torácico.

Se excluyen aquellos pacientes a los que no se les puede realizar al completo las pruebas necesarias para diagnosticar un SCA por fallecimiento del mismo o alta voluntaria. También se excluyen los pacientes cuyo dolor torácico tiene origen no cardiovascular claro y a los que para el diagnóstico de SCA no es necesaria la determinación de marcadores bioquímicos.

La información se obtiene a través de las historias clínicas de los pacientes y del sistema informático del laboratorio (Omega, Roche Diagnostics). Este sistema informático es utilizado con finalidad tanto clínica como administrativa y tiene una alta fiabilidad.

2. Variables recogidas.

Las variables recogidas en el estudio se pueden agrupar de la siguiente forma:

2.1 Epidemiológicas:

- Al paciente, y en caso de no ser posible, a los familiares se les pregunta si padecía hipertensión, diabetes e hipercolesterolemia previas, la edad, sexo, historia de tabaquismo y antecedentes personales y familiares de cardiopatía isquémica.

2.2 De presentación:

- Al paciente, y en caso de no ser posible, a los familiares, se les pregunta por la presencia o ausencia de dolor torácico, las características del dolor, su duración y, tras realizarse el electrocardiograma de urgencia, se anotan las alteraciones del electrocardiograma.

2.3 Analítica:

- Según el protocolo de urgencias establecido en el hospital para SCA se determinan cTnI, CK total, CK-MB actividad, fibrinógeno, plasminógeno y dímero D. Posteriormente, se guardan los sueros, separados y congelados para la determinación de LD, PCR, creatinina, HDL-colesterol, colesterol total, NT-proBNP, mioglobina y albúmina modificada por isquemia. Para la determinación de homocisteína, mieloperoxidasa y mutaciones genéticas, se congelan las muestras de sangre total en EDTA a -20 °C hasta su determinación. Todas las muestras son anonimizadas (desvinculadas de los datos demográficos del paciente).

2.4 Ecocardiografía:

- Se incluyen las medidas del tabique, pared posterior, diámetro telediastólico, diámetro telesistólico, fracción de eyección, diámetro de aurícula izquierda y alteración de la contractilidad segmentaria

3. Muestras utilizadas.

Se obtienen muestras de sangre en el momento de atención al paciente en el servicio de urgencias, en el caso de pacientes extrahospitalarios, y de presentación del proceso agudo en pacientes intrahospitalarios, según el protocolo establecido para posibles SCA en el hospital.

Según el protocolo citado anteriormente, se deben extraer tres tubos de sangre:

- Uno de sangre total con EDTA como anticoagulante. Se utiliza para estudio de serie hematológica. Este tubo es congelado posteriormente, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, que es la conservación más correcta para los estudios genéticos.
- Uno de sangre total con citrato como anticoagulante. Se utiliza para la determinación de proteínas de la coagulación.
- Uno de suero sin anticoagulante. Se utiliza para la determinación de proteínas y enzimas séricas. Una vez hechas las pruebas incluidas en el protocolo, el suero se separa y congela a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este suero será utilizado para el resto de determinaciones séricas.

En las extracciones sucesivas, sólo se necesita un tubo de sangre con anticoagulante EDTA para estudio de la serie hematológica, y un tubo de sangre sin anticoagulante para la determinación de las concentraciones séricas de CK, cTnI y LD.

4. Metodología: sistemas analíticos, técnicas y reactivos.

4.1 Métodos automatizados mediante sistemas analíticos.

4.1.1 Métodos automatizados en analizador STA® R Evolution (Roche Diagnostics España).



STA® R Evolution es un analizador de coagulación automatizado de acceso abierto y aleatorio, para la realización de tests de coagulación cromogénicos e inmunológicos por aglutinación. Este aparato integra 3 principios de medición: coagulación (viscosidad basada en medidas cronométricas), absorbancia fotométrica (450 nm) y turbidimetría (540 nm).

Los reactivos utilizados son:

*** Dímero D (Ref. 11777009 140).**

Test in vitro para la determinación cuantitativa del dímero D en plasma citratado. El ensayo consiste en que partículas de látex recubiertas de anticuerpos monoclonales aglutinan en presencia de productos de degradación de la fibrina. Esta aglutinación provoca una mayor dispersión de la luz que se mide como aumento de la densidad óptica. Se calcula la concentración extrapolando el aumento de densidad óptica en la curva de calibración.

Los reactivos vienen preparados para su uso:

- Reactivo 1. Tampón reactivo: tampón TRIS, pH aprox. 7,5.
- Reactivo 2. Suspensión de partículas de látex recubiertas de anticuerpos monoclonales específicos de dímero D (ratón), estabilizada con albúmina bovina.

El reactivo ha sido previamente calibrado frente a Asserachrom D-Dimer (Roche Diagnostics). La exactitud y reproducibilidad de los resultados se confirma mediante controles STA Liatest Control I/II (Ref. 11777017).

El intervalo de ensayo es 0,22-4,00 µg/ml de dímero D (en unidades de equivalentes de fibrinógeno, UEF). Si el test se realiza con dilución automática de la muestra, el intervalo de medición es de 0,22-20 µg/mL (en UEF).

*** Fibrinógeno (Ref. 10658642 140).**

Test in vitro para la determinación cuantitativa de las concentraciones de fibrinógeno en plasma citratado según el método de Clauss (en presencia de un exceso de trombina, el tiempo de coagulación de la muestra de plasma diluida es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno).

El reactivo tiene la siguiente composición:

- Trombina humana ≥ 70 unidades/ml, liofilizada. Para su preparación se debe disolver su contenido con 5,0 ml de agua destilada, se deja reposar 30 minutos a 18-25 °C.

El reactivo ha sido previamente calibrado específicamente según lote con STA Unicalibrator (Ref. 11776584). La exactitud y reproducibilidad de los resultados se confirma mediante controles STA PreciClot Plus I/II/III (I-normal, II/III-patológico).

El intervalo de ensayo es 1,5-9,00 g/l.

- Plasminógeno (Ref. 11776916 140).

Ensayo fotométrico para la determinación cuantitativa in vitro de la actividad de plasminógeno, con un sustrato cromogénico, en plasma citratado. Un exceso de estreptoquinasa unido al plasminógeno de la muestra, forman un complejo con actividad similar a la plasmina. La cantidad de estreptoquinasa-plasminógeno formado se mide por su acción en el sustrato sintético cromogénico. La cuantificación viene dada por la cantidad liberada de p-nitroanilina, medida a 405 nm.

Los reactivos utilizados son:

- Reactivo 1: estreptoquinasa, aproximadamente 15.000 UI/vial, estabilizado con albúmina humana; liofilizado.
- Reactivo 2: sustrato cromogénico H-D-But-CHA-Lys-pNA·2AcOH (CBS 30.41), aproximadamente 16.5 µmol por vial; liofilizado.

Se disuelve el contenido de cada vial añadiendo 3 ml de agua destilada. Se deja 60 minutos a 18-25 °C y se agita el vial para conseguir una solución uniforme antes de usar.

Para la calibración del método se usa el calibrador STA Unicalibrator (Ref. 11776584). La exactitud y reproducibilidad de los resultados se verifican mediante controles STA PreciClot Plus I (Normal, ref.11776886) y STA PreciClot Plus II (patológico, ref. 11776894).

El intervalo de ensayo es de actividad de plasminógeno 11-160 % con respecto al control.

4.1.2 Métodos automatizados en analizador Modular P800 (Roche Diagnostics España).



Aparato con estación de trabajo consolidada para química clínica e inmunoquímica homogénea, ampliable y adaptable in situ. Posee un módulo de medida de electrolitos ISE 900 (medida indirecta por electrodos selectivos) y un módulo de medida fotométrica P 800.

Los reactivos utilizados son:

*** LD (lactato deshidrogenasa Ref. 1187961 216).**

Test in vitro para la determinación cuantitativa de lactato deshidrogenasa (LD) en suero humano. El presente método deriva de la formulación recomendada por la Sociedad Alemana de Química Clínica (DGKC) en 1972 y ha sido mejorado en cuanto al rendimiento y la estabilidad. La enzima lactato deshidrogenasa cataliza la conversión de piruvato a lactato donde el NADH se oxida a NAD. La velocidad de reducción de NADH es directamente proporcional a la actividad de LD y se mide fotométricamente.

Los reactivos de los que consta están listos para su uso:

- R1 (tampón fosfato pH 7,5; piruvato $\geq 0,73$ mmol/L); estabilizadores y conservantes.
- R2 (NADH $\geq 1,1$ mmol/L); estabilizadores y conservantes.

El presente método ha sido estandarizado frente a un reactivo del sistema Roche utilizando pipetas calibradas con un fotómetro manual que proporciona valores absolutos. Se calibra a dos puntos: S1 (NaCl 0,9 %) y S2 (C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), Ref. 10759350)). Como control de calidad se utiliza Precinorm U (Ref. 10171743) y Precipath U (Ref. 10171778).

El intervalo de ensayo es 0.10-20.00 μ kat/L [6-1200 U/L].

*** Aspartato aminotransferasa (AST/ASAT/GOT Ref.11876848).**

Método conforme con la IFCC, sin activación de piridoxal fosfato, destinada a la determinación cuantitativa de la enzima aspartato aminotransferasa in vitro en suero humano. La enzima AST presente en la muestra cataliza la reacción de equilibrio siguiente: α -cetoglutarato + L-aspartato \leftrightarrow L-glutamato + oxaloacetato. El incremento de oxaloacetato se determina en la reacción indicadora que es catalizada por la malato-deshidrogenasa (MDH): $\text{oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{L-malato} + \text{NAD}^+$. La tasa de disminución de NADH, que se mide fotométricamente, es directamente proporcional a la tasa de formación de oxaloacetato y con ello, a la actividad de la AST.

Los reactivos utilizados son:

- R1. Tampón TRIS: 100 mmol/L, pH 7.8; L-aspartato: 300 mmol/L; NADH (levadura): 0.23 mmol/L; MDH (corazón porcino) \geq 0.53 U/mL; LD (microorganismos) \geq 0.75 U/mL; conservante.
- R2. α -cetoglutarato: 75 mmol/L; conservante.

El reactivo 1 viene en 2 recipientes (1 y 1a) que se deben mezclar mediante un adaptador. El reactivo 2 está listo para su uso.

El presente método ha sido estandarizado manualmente frente a la fórmula original de la IFCC. Los reactivos se calibran con S1 (solución de NaCl al 0,9 %) y S2 (C.f.a.s. (Calibrator for automated systems). Ref.10759350). Como material para control de calidad se utiliza Precinorm U (Ref.10171743) y Precipath U (Ref.10171778).

El intervalo de ensayo es de 0,07-13,34 μ kat/L (4 a 800 U/L).

*** Colesterol total (Ref. 11491458).**

Test enzimático in vitro para la determinación cuantitativa directa de colesterol en suero. Este método se basa en la determinación de la Δ^4 -colestenoa tras el desdoblamiento enzimático de los ésteres de colesterol por la colesteroesterasa y la transformación del colesterol por la colesteroxidasa, así como la medición subsiguiente del H_2O_2 formado a través de una reacción de Trinder (medible fotométricamente).

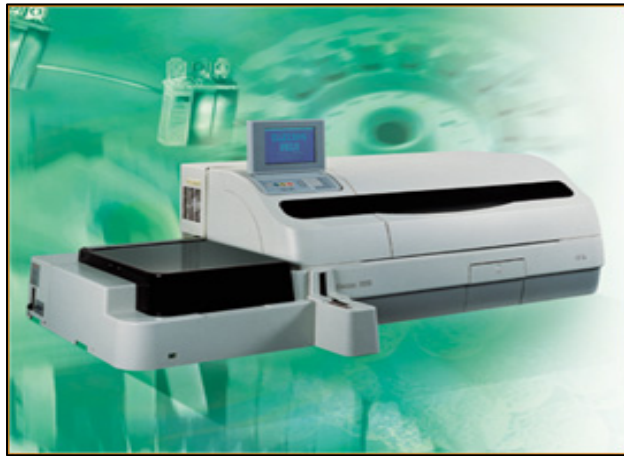
El reactivo viene listo para su uso:

- R1. Tampón PIPES (ácido piperacín 1,4-bis (2-etanosulfónico)): 75 mmol/L, pH 6.8; Mg^{2+} : 10 mmol/L; colato sódico: 0,2 mmol/L; 4-aminofenazona $\geq 0,15$ mmol/L; fenol $\geq 4,2$ mmol/L; éter poliglicólico de alcohol graso: 1%; colesteroesterasa (*Pseudomonas* esp.) $\geq 0,5$ U/mL (8,33 μ kat/L); colesteroxidasa (*E.coli*) $\geq 0,15$ U/mL (2,5 μ kat/L); peroxidasa (rábano) $\geq 0,25$ U/mL (4,17 μ kat/L); estabilizadores; conservante.

El presente método ha sido estandarizado tanto por dilución de isótopos/espectrometría de masa como frente al método Abell-Kendall. Así se cumple con los requerimientos del National Institute of Standard and Technology (NIST). Los calibradores utilizados para el reactivo en el analizador son S1 (NaCl al 0,9%) y S2(C.f.a.s. (Calibrator for automated systems, Ref. 10759350)). Para el control de calidad se emplea Precinorm U (Ref. 10171743) y Precipath U (Ref. 10171778).

El intervalo de ensayo es 0.08-20.7 mmol/L (3-800 mg/dL).

4.1.3 Métodos automatizados en analizador Elecsys 2010 (Roche Diagnostics España).



Analizador para inmunoensayos heterogéneos, multicanal selectivo. Se basa en una metodología de electroquimioluminiscencia. Posee técnicas para marcadores cardíacos, óseos,... con tiempos de ensayos cortos (inferior a 1 hora).

Los reactivos utilizados son:

*** NT-proBNP II (Ref. 0201020504).**

El reactivo proBNP II se utiliza para la determinación del propéptido natriurético N-terminal de tipo B (NT-proBNP) en suero mediante un inmunoensayo tipo sandwich de electroquimioluminiscencia "ECLIA" (electrochemiluminescence immunoassay). La técnica de detección consta de dos anticuerpos policlonales dirigidos contra los segmentos del aminoácido 1 al 21 y del 39 al 50 del NT-proBNP.

El reactivo viene listo para su uso:

- R1: fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con anticuerpos monoclonales de oveja antiNT-proBNP segmentos 1 al 21 y del 39 al 50 de aminoácidos, en solución tampón, rutenio.

Se calibra con el calibrador de Roche CalSet pro-BNP (Ref.04842472190) y como control se utiliza PreciControl Cardiac Elecsys® (Ref.04917049922).

El intervalo de ensayo es 5-35.000 pg/ml (definido por el límite de detección y el máximo de la curva principal). Valores superiores al intervalo de medición se diluyen al medio, hasta 70000 pg/mL (8277 pmol/L). Las diluciones hasta 1:10 pueden provocar desviaciones de hasta un 25 % del valor teórico, según ensayos de la empresa productora.

4.1.4 Métodos automatizados en analizador Dimension RXL (Dade Behring, Newark, DE).



El sistema integrado Max® Dimension® de la química de Dimension® RXL incluye módulo de inmunoquímica además del módulo espectrofotométrico y la medida de iones mediante electrodos selectivos.

Los reactivos utilizados son:

*** Creatín quinasa (CK, Ref DF29A).**

Test para la determinación in vitro de CK sérica. Su determinación es una modificación de la medida enzimática descrita por Oliver y Rosalki y presentada en un procedimiento general por Tietz. La CK cataliza la transfosforilación del fosfato de creatina a la adenosina-difosfato (ADP) produciendo adenosina-trifosfato (ATP). El ATP así formado se usa para fosforilar glucosa en una reacción catalizada por la hexoquinasa (HK); la glucosa-6-fosfato resultante es oxidada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) con la reducción simultánea del fosfato de nicotinamida-adenina dinucleótido (NADP). El cambio de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH es directamente proporcional a la actividad de CK, ya que otros reactivos están presentes en cantidades no limitantes y es medido utilizando una técnica cinética dicromática (340, 405 nm). Se utilizan muestras de suero.

Los reactivos incluidos en el cartucho son:

- R1-R6 (6 pocillos): Hexoquinasa 4500 U/L (obtenido de levadura); G-6-PDH 2800 U/L (origen bacteriano); ADP 1.88 mM, fosfocreatina 18.1 mM; Glucosa 11.65 mM; NADP 2.88 mM; tampón; inhibidores AK; activadores.

Los materiales de referencia utilizados son verificadores secundarios tal como el Verificador de creatina quinasa (Cat.No.DC26) y como controles Monitrol 1 (Ref.B5106-110) y 2 (Ref. B5106-210).

El intervalo de ensayo, a 37 °C, es de 0 a 800 U/L.

*** Isoenzima MB de la creatín quinasa (CK-MB, Ref.03012468 122).**

Prueba de inmunoinhibición para la determinación cuantitativa in vitro de la actividad sérica de la isoenzima MB de la creatín quinasa en suero humano. Mediante anticuerpos específicos dirigidos contra la subunidad M de la CK, la actividad catalítica de estas subunidades en la muestra se inhibe a un 99.6 % sin afectar a las subunidades CK-B. La actividad restante de CK-B, que equivale a la mitad de la actividad de la CK-MB, se determina al igual que la actividad total de la CK. La actividad catalítica resultante se multiplica por 2, ya que la isoenzima CK-BB aparece muy raramente en suero y la actividad catalítica de las subunidades CK-M y CK-B apenas pueden distinguirse en su procedencia.

Los reactivos utilizados vienen listos para su uso:

- R1. Tampón imidazol: 123 mmol/L, pH 6,5 (37 °C); EDTA: 2,46 mmol/L, Mg^{2+} :12,3 mmol/L; ADP:2,46 mmol/L; AMP: 6,14 mmol/L; diadenosina pentafofato: 19 μ mol/L; NADP (levadura): 2,46 mmol/L; N-acetilcisteína: 24,6 mmol/L; HK (levadura): $\geq 36,7$ μ kat/L (25 °C); G6P-DH (E.coli): $\geq 23,4$ μ kat/L (25 °C); conservante; estabilizador; aditivo.
- R2. Tampón ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propansulfónico: 20 mmol/L, pH 8,8 (37 °C); glucosa: 120 mmol/L; Mg^{2+} :11 mmol/L; EDTA: 2,46 mmol/L; fosfato de creatina: 184 mmol/L; 4 anticuerpos monoclonales anti-CK-M (ratón), capacidad de inhibición de la subunidad CK-M:>99,6 % hasta 66,68 μ kat/L (4000 U/L) (37 °C); conservante; estabilizador; aditivo.

Antes de efectuar el test de CK-MB, se determina la actividad total de la CK ya que los anticuerpos pueden inhibir hasta 4000 U/L de la subunidad CK-M (37°C). Si las muestras tienen una actividad de la CK total superior a 4000 U/L, se repite el análisis diluyendo o con un volumen reducido, pues de lo contrario no se garantiza la inhibición completa.

El presente método ha sido estandarizado frente al método original y los procedimientos recomendados por la IFCC (235) con la adición del anticuerpo inhibitorio utilizando pipetas calibradas y un fotómetro manual que proporciona valores absolutos. Se calibra a dos puntos con S1 (NaCl 0,9%) y S2 (C.f.a.s CK-MB (Ref.11447394, Roche Diagnostics)). Los controles utilizados son Precinorm y Precipath CK-MB (Ref. 11447378 y 04358210).

El intervalo de ensayo es de 0.05-38.400 μ kat/L (3-2300 U/L).

*** Mioglobina (Cat.No.RF422A).**

El método MYO (mioglobina) es un análisis de diagnóstico in vitro que tiene por objeto la determinación cuantitativa de mioglobina en suero. Este método emplea una reacción inmunturbidimétrica con anticuerpos monoclonales para la molécula de mioglobina. La turbidez formada en presencia de mioglobina en la muestra se mide a 570 y 900 nm.

El reactivo utilizado viene listo para su uso:

- R1-R6: anticuerpos antimioglobina y anti-anticuerpos unidos a moléculas de látex, etanodiol 13 %, mezcla de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no. 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no.220-239-6] (3:1).

La técnica es calibrada con el estándar de proteínas cardíacas (Special Protein Calibrator, Ref.DC51) y como control de calidad interno se utiliza Dade® TRU-Liquid Cardiac Control cardíaco 1 (Ref.B5960-1), 2 (Ref.B5960-2) y 3 (Ref.B5960-3).

El intervalo de ensayo es 10.0-500.0 ng/mL.

*** Proteína C reactiva de intervalo ampliado (Cat.No.DF34).**

Análisis de diagnóstico in vitro que tiene por objeto la determinación cuantitativa de PCR en suero. Es un inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) que utiliza partículas de látex recubiertas con un anticuerpo anti-Proteína C-Reactiva (AbPR) que se agregan en presencia de esta molécula en la muestra. El aumento de turbidez que acompaña a la agregación es proporcional a la concentración de PCR y se mide a 340 nm.

Los reactivos utilizados, listos para su uso, son:

- Pocillos 1-3 (líquido): partículas recubiertas con anti-PCR, glicina, SDS, inhibidores microbianos (0,3 mg/ml-origen cabra).
- Pocillos 4-6, (líquido): tampón, PEG, inhibidores microbianos-98 mM.

Para la calibración se utiliza como material de referencia el calibrador de RCRP (Cat.No.DC34). Como control de calidad interno se utiliza Dade® TRU-Liquid Cardiac Control cardíaco 1 (Ref.B5960-1), 2 (Ref.B5960-2) y 3 (Ref.B5960-3).

El intervalo del ensayo es (0.5-250.0 mg/L) 0.05-25.00 mg/dL.

*** Troponina I cardíaca (Ref. RF421C).**

Análisis de diagnóstico in vitro que tiene por objeto la determinación cuantitativa de troponina I cardíaca en suero humano. Es un enzimoimmunoensayo colorimétrico de elevada sensibilidad de una etapa que se basa en un principio “sándwich”.

Los reactivos utilizados, listos para su uso, son:

Pocillos	Forma	Ingrediente	Concentración	Origen
1-	Tabletas	FADP, D-prolina	0.056 mg/mL, 68.8 mg/mL	
2-	Tabletas	Apo-D-aminoácido oxidasa, peroxidasa de rábano, DCHBS, 4-AAP	0.23 mg/mL, 0.19 mg/mL, 3.9 mg/mL, 1.18 mg/mL	Riñón de cerdo, rábano
3-	Tabletas	Anticuerpo-CrO ₂	1.6 mg/mL	Ratón
4-	Líquido	Anticuerpo-fosfatasa alcalina		Ratón
5-	Líquido	Tampón y estabilizantes		
6-	Líquido	Diluyente de tabletas de cromo y estabilizantes		

Para la calibración del método de cTnI se utiliza como material de referencia el calibrador de la troponina I cardíaca (Cat.No.RC421C). Como control de calidad interno se utiliza Dade® TRU-Liquid Cardiac Control cardíaco 1 (Ref.B5960-1), 2 (Ref.B5960-2) y 3 (Ref.B5960-3).

El intervalo de ensayo es 0.04-40.00 ng/mL (µg/L).

*** Creatinina (Cat.No.DF33A).**

Análisis de diagnóstico in vitro que tiene por objeto la determinación cuantitativa de creatinina en suero. Este método emplea una modificación de la reacción cinética de Jaffé descrita por Larsen en 1972. Se basa en que en presencia de una base fuerte como el NaOH, el picrato reacciona con la creatinina para formar un cromóforo rojo. El aumento de absorbancia a 510 nm, debido a la formación de este cromóforo, es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra y es medida utilizando una técnica cinética dicromática (510 nm, 600 nm).

El reactivo viene preparado para su uso y contiene:

- Hidróxido de sodio 7 % y sales de ácido pícrico (picratos) >3 %.

Como calibrador se utiliza Chem I (Ref. DC18A) y como controles Monitrol 1 (Ref.B5106-110) y 2 (Ref. B5106-210)

El intervalo de ensayo es 0-20.0 mg/dL (0-1768 $\mu\text{mol/L}$). A resultados mayores que 20.0 mg/dL (1768 $\mu\text{mol/L}$), se hace la dilución apropiada con agua purificada para obtener un resultado dentro del intervalo de ensayo.

4.1.5 Métodos automatizados en analizador AxSYM (Abbott Diagnostics USA).



AxSYM incluye en un mismo instrumento metodología para MEIA (enzimoinmunoensayo de micropartículas) y FPIA (fluoroimmunoensayo). Este sistema analítico de inmunoensayos de tercera generación combina acceso continuo, acceso aleatorio y procesamiento de muestras urgentes con un amplio menú de pruebas.

Los reactivos utilizados son:

*** Homocisteína (Ref. 5F51-20).**

El método AxSYM® Homocysteine utiliza un inmunoanálisis de polarización de fluorescencia (FPIA) para la determinación cuantitativa de L-homocisteína total en plasma humano con el analizador AxSYM. La homocistina y las formas de homocisteína presentes en la muestra se reducen y forman homocisteína libre utilizando el ditioneitol (DTT). La homocisteína libre se convierte en SAH (S-adenosil-L-homocisteína) utilizando la SAH hidrolasa y exceso de adenosina. La S-adenosil-L-homocisteína (SAH) y una molécula marcada con fluoresceína compiten por los sitios de unión de las moléculas del anticuerpo monoclonal. La intensidad de la luz polarizada fluorescente se mide con el sistema óptico FPIA.

El reactivo viene preparado para su uso y contiene:

- Reactivo 1: trazador (molécula marcada con fluoresceína), ditioneitol, glicerol, aziduro de sodio.
- Reactivo 2: SAH hidrolasa bovina y adenosina en exceso, glicerol.
- Reactivo 3: anticuerpo monoclonal, glicerol.
- Reactivo 4: solución de pretratamiento de homocisteína.

Para calibrar se utiliza Homocysteine Calibrators (Ref.9F84-01) y como control Homocysteine Controls L, M y H (Ref.9F84-10).

Intervalo de ensayo de 0 a 50 $\mu\text{mol/L}$. Los valores superiores a 50 $\mu\text{mol/L}$, se diluyen con ClNa al 0,9 % y se vuelven a medir, multiplicando el resultado por el factor de dilución correspondiente.

4.2 Métodos no automatizados.



Se utiliza el espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 UV / visible está diseñado como aparato de mesa en el laboratorio ya que es plano y capaz de soportar su peso y el peso de todos los accesorios. Este aparato mide absorbancias en longitudes de onda en el campo del ultravioleta y el visible.

*** Técnica de peroxidasa leucocitaria (mieloperoxidasa) de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid) (Ref.M6908).**

El reactivo de peroxidasa leucocitaria (Mieloperoxidasa, MPO) es un kit de reactivos para la medida histoquímica de peroxidasa leucocitaria. Estos reactivos son para uso diagnóstico in vitro con muestras de plasma usando como anticoagulante EDTA tripotásico.

Para la determinación de la MPO se siguió el método de Andrews y Krinsky con modificaciones. Se utiliza 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (sigma) 1.4 mM y peróxido de hidrógeno (0.3 mM concentración final) para la incubación de 10 minutos a 37°C con el plasma del paciente. Se centrifuga y el sobrenadante se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 655 nm, siendo la lectura directamente proporcional a la concentración de MPO en la muestra del paciente.

Como calibradores se utilizan soluciones patrón liofilizadas incluidas en el kit y como control una solución también incluida en el kit.

La recogida de la muestra, sangre total, se lleva a cabo de acuerdo con las directrices de la NCCLS. Se reduce al mínimo la exposición a la luz ya que la peroxidasa leucocitaria es fotosensible.

El intervalo de ensayo es 0-4666 pM. Con la medida de absorbancia y la ley de Lambert-Beer, se calcula la concentración de mieloperoxidasa en sangre en pM. Los resultados mayores de 4666 pM deben repetirse después de diluir con agua purificada para obtener una concentración dentro de los límites de ensayo.

*** Técnica para la determinación de albúmina modificada por isquemia.**

Los reactivos para la determinación de albúmina modificada por isquemia producen una reacción medible espectrofotométricamente. Este test bioquímico se basa en la unión entre la albúmina sérica y el metal de transición cobalto. Se realiza un pretratamiento de la muestra con Cl_2Co , sin mezclar y centrifugando, para eliminar posibles quelantes del cobalto en la muestra del paciente. A continuación, se mezclan 95 μL de la muestra pretratada y 5 μL de cloruro de cobalto y se incuba en la cubeta 5 minutos.

Durante la incubación, el cobalto (concentración final, 0.58 mmol/L) se une al grupo amino terminal de la albúmina inalterada en la muestra. Después de la incubación, se agrega a la mezcla 25 μL de ditiotreitól (concentración final, 1.67 mmol/L) que forma un complejo coloreado con el cobalto (Co^{2+}) que no esté unido al grupo NH_2 terminal de la albúmina. Este complejo se puede medir espectrofotométricamente a 500 nm. Con la ley de Lambert-Beer se calcula la concentración del complejo formado y, a partir de él, la concentración de albúmina modificada por isquemia.

Los reactivos utilizados son:

- Cloruro de cobalto. $\text{Cl}_2\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pm=273,03. Merck.
- DL-Dithiothreitól. Lot 60K0862. 1cg. Riqueza 99 % (titración), 98 % (TLC). $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{S}_2$. Pm=154,2 g/mol).

Como calibradores se utilizan soluciones patrón valoradas en analizador de Roche (C.f.a.s Calibrator) y como control Precinorm U (Ref. 10171743) y Precipath U (Ref. 10171778).

El intervalo de ensayo es 6–186 unidades/mL. Si la lectura de absorbancia es muy elevada, diluir la muestra con solución salina.

4.3 Métodos de análisis para técnicas de biología molecular.

Técnicas en el secuenciador ABI Prism (Applied Biosystems USA).



El secuenciador automático ABI Prism 377 es un sistema de electroforesis y detección de fluorescencia, controlado por microprocesador, que se utiliza para secuenciación automática o análisis de fragmentos de ADN empleando el método de secuenciación automática en geles desnaturizantes. Las muestras se cargan en la vertical del sistema de gel (que actúa como vehículo), que se someten a electroforesis, detección láser y análisis de datos. La separación electroforética se pueden ver en pantalla a tiempo real, y los datos se pueden obtener en variedad de formatos.

Los genes estudiados en la población seleccionada son:

*** Gen codificante de leucotrienos.**

El gen codificante ALOX5AP (proteína activadora del araquidonato 5-lipoxigenasa) se encuentra en el cromosoma 13 y es el principal regulador de la enzima 5-lipoxigenasa. Esta molécula tiene un papel fundamental en la vía inflamatoria de leucotrienos y está implicado en la aterosclerosis. En un estudio (254) se asocia un haplotipo formado por 4 SNPs (single nucleotide polymorphisms) con el riesgo de SCA. El haplotipo susceptible es conocido como HapA en pacientes caucásicos. Los pacientes que poseen este haplotipo tienen una producción mucho mayor de LTB₄, evidenciando que la actividad proinflamatoria forma parte de un SCA. Existe otro tipo de haplotipo menos asociado con el SCA llamado HapB. El predominio de uno de los haplotipos está relacionado con un aumento de leucotrieno B₄ (LTB₄).

Para su genotipado se obtiene y purifica el DNA genómico de sangre total con anticoagulante EDTA de cada paciente (Puregene DNA Isolation Kit, Gentra Systems, Minneapolis, MN). La concentración de DNA se determina por espectrofotometría ultravioleta. A continuación, se utilizan las sondas TaqMan para la reconstrucción del gen. Se utiliza un SNPs, que es el asociado en la literatura con el SCA rs9508835 [SG13S35/37], que fue scaneado en un Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos de genotipo eran analizados usando el programa PHASE v2.0.2 (Stephens, Smith & Donnelly, 2001).

La localización del SNP en el genoma del paciente se podría asociar a susceptibilidad de padecer SCA.

* **Gen codificante de β -miosina (MYH7).**

MYH7 es el gen que codifica la cadena pesada beta de la miosina (MHC- β), isoforma lenta que se expresa principalmente en el corazón. Los cambios en la cantidad relativa de MHC- β y MHC- α (MYH6, isoforma rápida de la cadena pesada de la miosina cardíaca) se correlacionan con la velocidad contráctil del músculo cardíaco.

Se ha estudiado desde el exón 1 al 40 del gen en muestras de DNA de los pacientes. La extracción de DNA se realiza a partir de leucocitos presentes en muestras de sangre total con EDTA tripotásico mediante kit comercial DNA IQ system (Ref.DC 6700). Las condiciones de la PCR utilizada son: 1 ciclo a 94 °C, 2 min; 30 ciclos a 94 °C, 30 seg-54 °C, 30 seg-72 °C, 1 min y 1 ciclo a 72 °C, 10 min. Los “primers” utilizados fueron diseñados para cada exón, tomando como fuente la base de datos Cardiogenomics.

La secuenciación de los productos de PCR se hacen con el 3.1 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems (PN 4336948) y un secuenciador ABI Prism 377 DNA sequencer de Applied Biosystems.

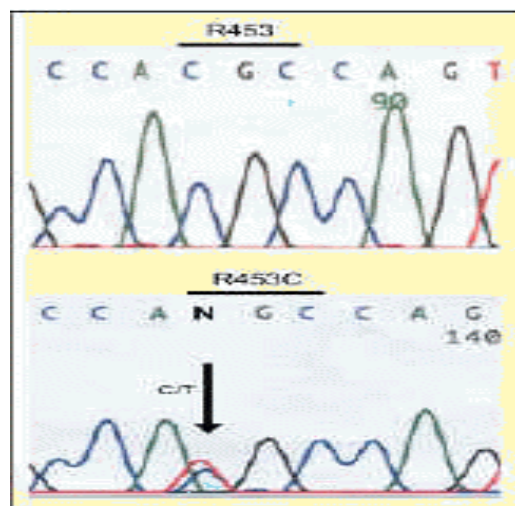


Figura 12. Fragmento de la secuencia del gen *MYH7*, correspondientes a un codón que presenta la mutación. Se indica con una flecha el nucleótido mutado, que aparece como un solo pico en la secuencia normal o dos en la secuencia de los portadores de la mutación (una copia normal y una copia mutada).

*** Gen codificante de troponina T2 (TNNT2).**

La troponina T es una de las proteínas que forman parte del complejo de la troponina. Se une a la tropomiosina en las fibras musculares manteniendo unidas la actina y la miosina. Existen tres subtipos principales de la troponina T, localizados en diferentes tejidos:

- La isoforma troponina T en el músculo liso de contracción lenta, denominada *TNNT1* y localizada en el cromosoma 19q13.4 (OMIM 191041).
- La isoforma troponina T cardíaca, denominada *TNNT2* y localizada en el cromosoma 1q32 (OMIM 191045).
- La isoforma troponina T en el músculo liso de contracción rápida, denominada *TNNT3* y localizada en el cromosoma 11p15.5 (OMIM 600692)

El gen responsable de muchas muertes súbitas, se encuentra en el cromosoma 1q32, que es la misma ubicación del gen de la troponina T cardíaca *TNNT2*.

Se han estudiado desde el exón 1 al 16 del gen en muestras de DNA de los pacientes. La extracción de DNA se realiza a partir de leucocitos presentes en muestras de sangre total con EDTA mediante kit comercial DNA IQ system (Ref. DC 6700). Las condiciones de la PCR utilizada son: 1 ciclo a 94 °C, 2 min; 30 ciclos a 94 °C, 30 seg-54 °C, 30 seg-72 °C, 1 min y 1 ciclo a 72 °C, 10 min. Los “primers” utilizados fueron diseñados para cada exón.

La secuenciación de los productos de PCR se hacen con el 3.1 Big Dye terminador Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems (PN 4336948) y un secuenciador ABI Prism 377 DNA sequencer de Applied Biosystems.

*** Gen codificante de troponina I tipo 3 (TNNI3).**

La Troponina I existe en tres formas moleculares distintas (isoformas), que son codificadas por tres genes distintos y corresponden a isotipos específicos encontrados en fibras de músculo rápidas (tipo 1), fibras de músculo lentas (tipo 2) y corazón (tipo 3). El gen responsable de muchas patologías cardíacas es el codificante de troponina I tipo 3.

Se han estudiado desde el exón 1 al 8 del gen en muestras de DNA de los pacientes. La extracción de DNA se realiza a partir de leucocitos presentes en muestras de sangre total con EDTA tripotásico mediante kit comercial DNA IQ system (Ref. DC 6700).

Las condiciones de la PCR utilizada son: 1 ciclo a 94 °C, 2 min; 30 ciclos a 94 °C, 30 seg -54 °C, 30 seg-72 °C, 1 min y 1 ciclo a 72 °C, 10 min. Los “primers” utilizados fueron diseñados para cada exón.

La secuenciación de los productos de PCR se hacen con el 3.1 Big Dye terminador Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems (PN 4336948) y un secuenciador ABI Prism 377 DNA sequencer de Applied Biosystems.

*** Gen codificante del enzima convertidor de la angiotensina: ACE-17q.**

Hay 2 alelos principales de este gen: D e I. La diferencia entre ambos se debe a la presencia (inserción: I) o ausencia (delección: D) de una secuencia repetitiva de 287 pb (pares de bases) dentro del intrón 16 del gen. Existen, por tanto, 3 posibles genotipos (DD, DI e II) cuyas frecuencias en nuestra población son del 34, 45 y 21%, respectivamente. La presencia del alelo D (aún mayor en homocigotos) condiciona una mayor concentración y actividad de la ECA y angiotensina II lo cual se ha asociado con un mayor riesgo de patología cardíaca.

A las muestras de DNA de los pacientes, extraídas a partir de sangre total con el kit comercial DNA IQ system (Ref. DC 6700), se les realiza una PCR con primers para el exón 16. En el caso del polimorfismo I/D de la ECA amplificamos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de 490 bases (alelo I) o de 190 bases (alelo D). La mezcla de reacción contenía los cebadores CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT y GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT, y tras 32 ciclos de amplificación de 95 °C-30 s, 58 °C-45s y 90s-72 °C 10 µl de cada reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% para visualizar los alelos y determinar el genotipo de cada paciente (DD, ID o II).

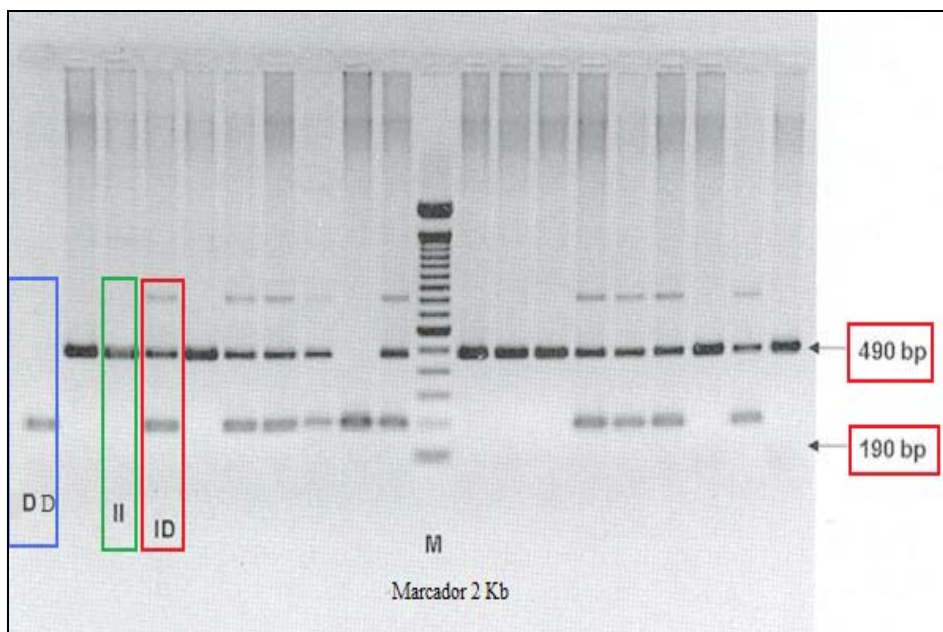


Figura 13. Ejemplo de gel de agarosa con muestras de pacientes con el polimorfismo I/D en el gen de la enzima ECA.

*** Gen codificante del receptor α_2 -adrenérgico.**

El gen del adrenoceptor α_{2B} presenta polimorfismo (D/D) que ha sido asociado con el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Una variante de este gen codifica una delección de tres residuos glutamato localizado en el tercer “loop” intracelular del polipéptido receptor. Esta delección provoca una alteración en la funcionalidad del receptor.

Para su estudio se extrae DNA a partir de muestras de sangre total en EDTA tripotásico de los pacientes mediante el kit DNA IQ System (Ref. DC 6700) y se realiza una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el fragmento deseado. Los “primers” utilizados fueron 5'-AGGTGTTTGTGGGGCATCT-3' y 5'-CAAGCTGAGGCCGGAGACACT-3' (Oligold, Eurogentec, Seraing, Belgium). Las condiciones de la PCR son un ciclo de desnaturalización a 94°C 2 minutos, 35 ciclos de amplificación a 96°C 40 segundos, 69°C 30 segundos y 72°C 30 segundos; y un ciclo de extensión a 72°C 6 minutos. Por último, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con bromuro de etidio, pudiendo diferenciar el tamaño de los fragmentos (112 (I) y 103 pdb (D)).

5. Análisis estadístico.

Tamaño de muestra. Aceptando un riesgo alfa (entendido como el porcentaje de falsos positivos) de 0,05 y un riesgo beta (porcentaje de falsos negativos) de 0,20 en un contraste bilateral, se precisan 238 casos y 238 controles para detectar una odds ratio mínima de 2. Se asume que la tasa de expuestos - valores de cTnI mayores de 1,5 ng/mL- en el grupo de pacientes sin SCA, será de 0,15. Se ha estimado con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables iniciales para conocer las características generales de las dos poblaciones de estudio. Los datos se presentan utilizando estadísticos de tendencia central y de dispersión: media, mediana, desviación típica y valores extremos. Las variables CK, cTnI y LD se normalizaron calculando sus logaritmos. Se representó la edad mediante un gráfico de barras de error y la enfermedad de base con un gráfico de sectores.

El estudio de la normalidad de las distribuciones se realizó con el test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre los dos grupos se realizó con el contraste t de Student para muestras independientes y la prueba de Mann-Whitney no paramétrica para variables continuas, y el test χ^2 y χ^2 corregido por continuidad, para variables discretas.

Mediante un ANOVA de medidas repetidas se compararon las variables CK, cTnI y LD en las primeras 48 horas, entre los grupos, y considerando el efecto de la interacción tiempo por grupo. Las medidas de frecuencia (prevalencia) se estimaron mediante el cálculo de sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Para la estimación del riesgo se empleó la odds ratio (OR) con los IC del 95%.

Las variables que en el análisis univariante se asociaron a la presencia de SCA se analizaron conjuntamente y la OR se estimó ajustada mediante regresión logística múltiple usando estimación de máxima verosimilitud no condicional. A excepción del cálculo del IC de las medidas de frecuencia, el análisis se realizó mediante el programa de análisis estadístico estadístico SPSS v14.0. Todas las pruebas se realizaron en contraste bilateral.

✓ **RESULTADOS.**

1.- Sujetos.

De la información recogida sobre los pacientes con y sin SCA, los posibles errores preanalíticos (muestras insuficientes, hemolizadas, lipémicas,...), analíticos y postanalíticos que pudieran influir en la determinación de marcadores, son asumidos en el análisis estadístico.

Las características basales de la población de estudio se resumen en la tabla 1.

	Pacientes n=238	Controles n=238	p	OR (95 %IC)
<u>Variables demográficas</u>				
Sexo masculino	147 (61,8 %)	140 (58,8 %)	0,512	
Edad (años)	69,03 ± 16,00	68,61 ± 16,26	0,692	
<u>Variables clínicas previas al momento del ingreso</u>				
Tóxicos (fumadores)	103 (43,3 %)	86 (36,1 %)	0,134	1,35(0,93-1,95)
Hiper glucemia	76 (31,9 %)	86 (36,1 %)	0,333	0,83(0,57-1,21)
Dislipemia	71 (29,8 %)	23 (9,7 %)	0,000	3,97(2,38-6,63)
HTA	159 (66,8 %)	129 (54,2 %)	0,005	1,70(1,17-2,47)
<u>Variable de procedencia</u>				
Urgencias	167 (70,2 %)	156 (65,5 %)		
Cirugía cardíaca	50 (21,0 %)	64 (26,9 %)		
Transplante C-UCI	21 (8,8 %)	18 (7,6 %)		
			0,313	0,92(0,63-1,36)

* p (probabilidad) y OD 95 % (odds ratio con 95 % de intervalo de confianza).

Tabla 1. Características basales en el momento de ingreso de los pacientes.

2.- Descripción de variables clínicas y bioquímicas.

Para cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, se han determinado 23 variables clínicas y bioquímicas. Estos datos se han obtenido a partir de las historias clínicas (informes de alta, quirúrgicos, de preanestesia y de laboratorio), de la base de datos del laboratorio (Omega, Roche Diagnostics®) y de pruebas bioquímicas adicionales hechas a las muestras de sangre anonimizadas. Los valores no reflejados explícitamente en la historia se han considerado como factores de riesgo ausentes en el momento de realizar la inclusión del paciente.

Las variables incluidas en el estudio se describen en la tabla 1 de datos demográficos y en la tabla 2 de marcadores bioquímicos.

MARCADOR	MEDIANA (PERCENTIL 25-75)		P
	Casos	Controles	
Ck 0 h	160,50 (70,75 - 388,25)	120,00 (55,75 - 246,75)	0,006
cTnI 0 h	1,15 (0,30 - 6,33)	0,39 (0,14 - 0,90)	0,001
LD 0 h	541 (377 - 883)	229 (101 - 400)	0,001
AST	48 (28 - 92)	42 (25 - 53)	0,003
Creatinina	1,2 (1,0 - 1,7)	0,8 (0,7 - 0,9)	0,001
Mioglobina	77 (55 - 100)	64 (45 - 77)	0,001
Albúmina modificada por isquemia	81 (37 - 148)	48 (29 - 74)	0,001
Dímero D	0,95 (0,46 - 1,70)	0,32 (0,17 - 0,55)	0,001
Plasminógeno	47 (23 - 92)	85 (63 - 107)	0,001
Homocisteína	22 (10 - 34)	9 (6 - 13)	0,001
Mieloperoxidasa	78 (32 - 122)	58 (32 - 111)	0,001
NT-proBNP	3198 (1060 - 7938)	156 (96 - 276)	0,001
Fibrinógeno	3,45 (2,71 - 4,15)	3,12 (2,46 - 3,45)	0,001
Colesterol total	161 (111-210)	197 (154-236)	0,000
HDL-Colesterol	54 (38-70)	67 (45-89)	0,000
LDL-Colesterol	88 (48-128)	117 (84-150)	0,000

Tabla 2. Variables incluidas en el estudio tomadas en el momento inicial del proceso agudo expresadas como mediana, percentil 25 y 75, valores de p.

De las características basales (tabla 1), los dos grupos (pacientes con SCA y sin SCA) son similares en cuanto a sexo y edad. De los factores de riesgo estudiados (tabaquismo, hiperglucemia, dislipemia e hipertensión arterial (HTA)), hay diferencia entre los grupos en HTA y dislipemia, siendo más prevalente en pacientes con SCA. En cuanto a la variable de procedencia, no hay relación con un mayor número de pacientes con SCA.

Por otro lado, como se observa en la tabla 2, entre el grupo de pacientes control y el de casos, existen diferencias ($p < 0,05$) en todos los marcadores bioquímicos, teniendo concentraciones o actividades enzimáticas más elevadas en el grupo de casos. Hay dos excepciones que son el colesterol total y su fracción LDL-colesterol; estas moléculas presentan concentraciones séricas superiores en el grupo de controles (pacientes sin SCA), por lo que no demuestran utilidad. El HDL-colesterol, considerado como protector de aterogénesis, sí presenta mayores concentraciones séricas en los pacientes sin SCA.

En el trabajo se realiza el estudio de las mutaciones genéticas más frecuentes en seis genes relacionados ampliamente en la bibliografía con el SCA: gen productor de leucotrieno B4, gen de la proteína β -miosina (MYH7), TNNT2, TNNT3, ECA y del receptor $\alpha 2$ -adrenérgico. Todos estos genes han demostrado en diversos estudios una implicación en la fisiopatología cardíaca. La búsqueda de marcadores genéticos establece una nueva vía de investigación que puede proporcionar utilidad clínica en pacientes con SCA y sus familiares. En la población estudiada, de estos genes sólo presenta relación clara con la presencia de SCA las mutaciones en el gen productor de leucotrieno B4, con mayor prevalencia en el grupo de los pacientes con SCA ($p < 0,005$).

3. Relación de los marcadores con el sexo en el grupo de pacientes.

Una vez analizado que no hay diferencias en cuanto al sexo entre el grupo de pacientes con SCA y el de pacientes sin SCA ($p=0,512$), como se indica en la tabla 1, se estudia si existe distinta distribución de las variables con respecto al sexo (hombres y mujeres) en el grupo de casos (pacientes con SCA diagnosticado). El objetivo es decidir las variables en las que el tratamiento de datos se hará de forma conjunta o separada en hombres y mujeres.

Como ejemplo del análisis realizado, se resumen las medias y medianas de creatinina, PCR, CK 0h (en el momento de presentación del proceso agudo), cTnI 0h, LD 0 h y NT-proBNP en hombres y mujeres en el grupo de pacientes con SCA.

Marcador	Media-Mediana (Hombres)	Media-Mediana (Mujeres)	P
Creatinina	1,66-1,20	1,61-1,30	0,779
PCR	39,58-23,00	38,54-33,90	0,910
Log CK 0h	2,34-2,27	2,15-2,12	0,015
Log cTnI 0h	0,19-0,04	0,09-0,11	0,477
Log LD 0h	2,81-2,75	2,75-2,72	0,095
Log NT-proBNP	3,29-3,29	3,63-3,68	0,056

Tabla 3. Marcadores bioquímicos con respecto al sexo.

De las variables CK, cTnI, LD y NT-proBNP se calculan los logaritmos para hacer más fácil el tratamiento de datos ya que no tienen una distribución normal.

Ninguno de los marcadores presenta diferencias con respecto al sexo salvo la enzima CK que tiene mayor actividad en hombres que en mujeres. Esta diferencia está demostrada ampliamente en la literatura científica; al ser un enzima de localización fundamentalmente muscular su concentración sérica es mayor en hombres al tener constitucionalmente más masa muscular. Por ello, se tratan todos los marcadores sin diferenciar por sexo excepto CK donde se asigna distinto punto de corte para hombres y mujeres. En la bibliografía se demuestra que la concentración sérica de NT-proBNP es superior en mujeres que en hombres; en este estudio se corrobora esta tendencia pero sin influencia como para continuar el resto del análisis separando por sexo.

A continuación se establecen los límites de normalidad para cada variable con el fin de delimitar los puntos de corte.

4. Límites de referencia.

Los límites de referencia o normalidad utilizados son los establecidos por el laboratorio en función de la población del Area 6 que asiste y de la metodología utilizada. Estos límites se resumen en la tabla 4:

Marcador	Valores de referencia
Dímero D	<0,5 µg/ml
Fibrinógeno	2,0-4,0 g/l
Plasminógeno	80-120 %
Lactato Deshidrogenasa	230-460 U/L a 37 °C
AST	10-50 U/L a 37 °C
CK	24-195 U/L para hombres y 24-170 U/L para mujeres a 37 °C
CK-MB	7-25 U/L a 37 °C
Mioglobina	19-92 ng/mL
PCR	<30 mg/L
cTnl	0,3-1,5 ng/mL daño cardíaco menor y >1,5 ng/mL IAM
Creatinina	0,6-1,2 mg/dL
Mieloperoxidasa	97-146 pM a 37 °C
Albúmina modificada por isquemia	<75 unidades/mL
NT-proBNP	<125 pg/mL
Homocisteína	5-15 µmol/L.
Gen codificante de leucotrieno B4	Ausencia del SNP
Gen MYH7	Sin mutaciones
Gen TNNT2	Sin mutaciones
Gen TNNT3	Sin mutaciones
Gen ECA	Alelos II e ID
Gen α2-adrenérgico	Alelos II e ID

Tabla 4. Valores de referencia para los distintos marcadores.

A partir de estos valores de referencia y, con la colaboración de los cardiólogos y médicos de urgencias del hospital, se establecen los puntos de corte para cada marcador (Tabla 5).

Marcador	Punto de corte	Casos (n=238)	Controles (n=238)	OR (95 % IC)
CK	> 195 hombres > 170 mujeres	102 (42,9 %)	73 (30,7 %)	1,7 (1,2-2,5)
cTnI	> 1,5	108 (45,4 %)	40 (16,8 %)	4,1 (2,7-6,3)
LD	> 460	148 (62,2 %)	49 (20,6 %)	6,3 (4,2-9,56)
AST	> 50	131 (55,0 %)	99 (41,6 %)	1,7 (1,2- 2,5)
Creatinina	> 1,5	133 (55,9 %)	21 (8,8 %)	13,1 (7,8- 21,9)
Mioglobina	> 92	102 (42,9 %)	48 (20,2 %)	3,0 (2,0-4,5)
Albúmina modif. por isquemia	> 75	126 (52,9 %)	59 (24,8 %)	3,4 (2,3-5,0)
Dímero D	> 0,5	170 (71,4 %)	66 (27,7 %)	6,5 (4,4-9,7)
Plasminógeno	< 80	31 (13 %)	3 (1,3 %)	11,7 (3,5-38,9)
Homocisteína	> 15	153 (64,3 %)	8 (3,4 %)	51,8 (24,4-109,9)
Mieloperoxidasa	> 146	24 (10,1 %)	1 (0,4 %)	26,6 (3,6-198,2)
NT-proBNP	> 125	61 (93,8 %)	36 (55,4 %)	12,3 (4,0-37,8)
Fibrinógeno	> 4	60 (41,7 %)	25 (10,0 %)	6,4 (2,4-17,3)
PCR	> 3	115 (96,1 %)	49 (48,3 %)	26,2 (6,2-110,2)
Gen MYH7	Mutación	23 (9,7 %)	18 (7,6 %)	1,3 (1,2-1,3)
Gen TNNT2	Mutación	7 (3,1 %)	5 (2,1 %)	1,3 (1,2-1,4)
Gen Receptor α 2adrenérgico (DD)	Mutación	70 (29,4 %)	55 (23,1 %)	1,3 (1,2-1,3)
Gen ECA	Alelo DD	82 (34,4 %)	64 (26,9 %)	1,3 (1,2-1,4)
Gen leucotrieno B4	Hap A y B	137 (57,6 %)	100 (42 %)	1,4 (1,3-1,45)

Tabla 5. Número de pacientes con valores de marcadores por encima o debajo del punto de corte en los grupos de pacientes con SCA (casos) y sin SCA (controles) y OR (odd ratio).

En la tabla anterior se describen el número de eventos con valor de marcadores por encima o debajo del punto de corte tanto en el grupo de pacientes con SCA como en el de pacientes con distinta patología. Las OR (odds ratio) indican que todos los marcadores tienen mayor razón de probabilidad de tener valores por encima del punto de corte en el grupo de casos que en el de controles ($OR > 1$). Para algunos marcadores como el plasminógeno, homocisteína y la mieloperoxidasa el intervalo de referencia es muy amplio debido al escaso número de eventos, por lo que no es muy valorable. En el caso de los marcadores genéticos, la existencia de mutación es muy escasa en los dos grupos por lo que las diferencias no son muy importantes; en el caso del gen productor de leucotrieno B4 el número de mutaciones existentes es mayor, por lo que la diferencia entre grupos (mayor número en el grupo con SCA) adquiere valor clínico y estadístico.

En esta misma tabla se observa que pacientes con concentración sérica de cTnI por encima del punto de corte tiene 4 veces más probabilidad de tener SCA. En el caso de la enzima LD es de 6 veces, para la mioglobina es de 3 veces, 6 veces para el dímero D,...

Una vez analizados los marcadores en ambos grupos, se estudia el comportamiento de la concentración sérica de algunos de ellos en el tiempo por la existencia de bibliografía que apoya su determinación seriada.

5. Estudio de las variables a distintos tiempos de muestreo tras el proceso agudo.

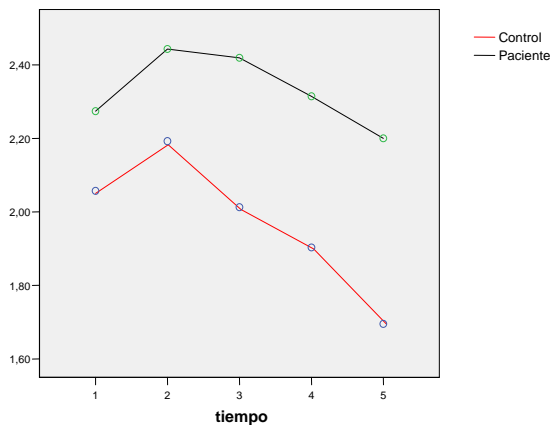
Durante el proceso isquémico se produce la liberación de moléculas intracelulares del tejido cardíaco. Para algunas de ellas resulta interesante su determinación a distintos tiempos desde el momento de inicio del proceso agudo, bien por su cinética de liberación más lenta o bien por su relación con la extensión del tejido afectado. A continuación se estudian los marcadores cuya evolución en el tiempo han demostrado tener valor clínico.

**** CK en el tiempo.**

Se estudia la evolución de la enzima CK a lo largo del tiempo y se compara el grupo de pacientes sin SCA y el grupo de los pacientes con SCA. (Tabla 6)

Se realiza extracción de sangre tanto en el grupo de casos como en el de controles en el momento del proceso agudo y a las 8, 12, 24 y 48 horas según protocolo establecido por los cardiólogos y el servicio de Bioquímica para el SCA.

Medias de log(ck)



	GRUPO	Media	Desv. típ.
Log ck0	Control	2,06	,40
	Paciente	2,27	,54
Log ck8	Control	2,19	,41
	Paciente	2,44	,56
Log ck12	Control	2,01	,36
	Paciente	2,42	,58
Log ck24	Control	1,90	,34
	Paciente	2,31	,57
Log ck48	Control	1,70	,32
	Paciente	2,20	,58

Figura 14. Gráfico de evolución de CK en el tiempo.

Tabla 6. Media de los logaritmos de los valores de CK a las 0, 8, 12, 24 y 48 horas en el grupo de casos y controles.

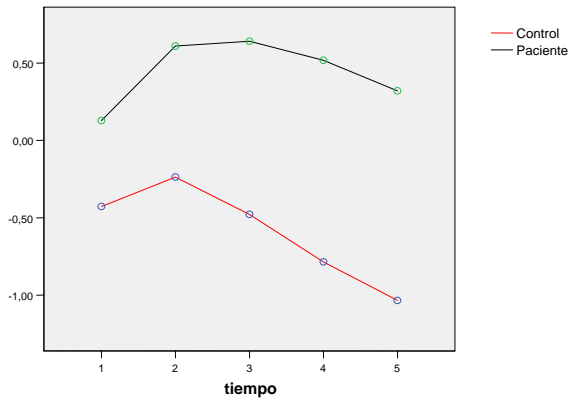
En la figura 14 y la tabla 6 se puede observar:

- Existe un cambio en la concentración de CK a lo largo del tiempo ($p=0,002$), con una subida y posterior bajada de su concentración sérica para ambos grupos de pacientes.
- Existe diferencia entre el grupo de pacientes sin SCA y el grupo con SCA ($p<0,001$), con concentraciones distintas en el tiempo, mayor en el grupo de pacientes con SCA en todos los tiempos.
- La interacción tiempo-grupo es significativa ($p<0,001$). Es decir, además de tener concentraciones superiores en el grupo de pacientes con SCA, tampoco existe el mismo comportamiento en la concentración sérica de esta enzima: la bajada de concentración es más acusada entre 8-12 y 24-48 horas en el grupo de pacientes con distinta patología que en el de con SCA.

**** cTnI en el tiempo.**

Se estudia la evolución de la concentración sérica de la proteína cTnI a lo largo del tiempo de muestreo y se compara el grupo control y los pacientes con SCA.

Medias de log(ctni)



	GRUPO	Media	Desv. típ.
logctni0	Control	-,43	,62
	Paciente	,13	,98
logctni8	Control	-,24	,56
	Paciente	,61	,87
logctni12	Control	-,48	,53
	Paciente	,64	,77
logctni24	Control	-,79	,48
	Paciente	,52	,76
logctni48	Control	-1,03	,37
	Paciente	,32	,81

Figura 15. Gráfico de evolución de cTnI en el tiempo.

Tabla 7. Media de los logaritmos de los valores de cTnI a las 0, 8, 12, 24 y 48 horas en el grupo de pacientes con SCA y sin SCA.

En la figura 15 y la tabla 7 se puede observar:

- Existe un cambio en la concentración de cTnI a lo largo del tiempo ($p < 0,001$), con una subida y posterior bajada de su concentración sérica en ambos grupos.
- Existe diferencia entre el grupo control y el grupo de casos ($p < 0,001$) que tienen concentraciones distintas en el tiempo, superiores siempre en los casos.
- La interacción tiempo-grupo es significativa ($p < 0,001$). Los pacientes no tienen el mismo comportamiento: la bajada de concentración es más acusada entre 8-12 y 12-24 horas en el grupo de controles que en el de casos. Entre las 24-48 horas, la bajada de concentración sérica no es diferente entre los dos grupos.

**** LD en el tiempo.**

Se estudia la evolución de la concentración sérica de la enzima LD a lo largo del tiempo de muestreo y se compara el grupo con distinta patología y el grupo de los pacientes con SCA.

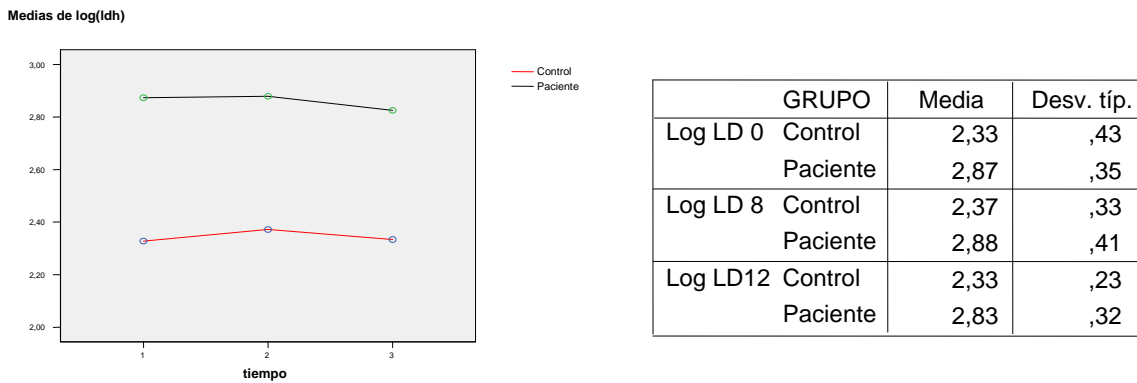


Figura 16. Gráfico de evolución de LD en el tiempo.

Tabla 8. Media de los logaritmos de los valores de LD a las 0, 8 y 12 horas en el grupo de pacientes y controles.

No se incluye las determinaciones a las 24 y 48 horas por no aportar valor clínico ni estadístico.

En la figura 16 y la tabla 8 se puede observar:

- No existe un cambio con valor estadístico ni clínico en la concentración de LD a lo largo del tiempo ($p = 0,530$).
- Existe diferencia entre el grupo sin SCA y el grupo de pacientes con SCA ($p < 0,001$) que tienen concentraciones distintas en el tiempo, mayor en el grupo con SCA.
- La interacción tiempo-grupo no es significativa ($p = 0,422$). Tienen comportamiento similar en la evolución de sus concentraciones séricas con respecto al tiempo.

Con el análisis anterior se concluye que la enzima CK y la proteína cTnI tienen interés clínico y también su determinación seriada en el momento de presentación del proceso agudo y a las 8, 12, 24 y 48 horas. En el caso de la enzima LD, se demuestra que tiene similar utilidad una única determinación que su determinación seriada.

A continuación, se analizan las características de sensibilidad y especificidad de cada variable con respecto al SCA y con los puntos de corte establecidos. El objetivo de este análisis es comprobar la validez de los puntos de corte establecidos en la población estudiada.

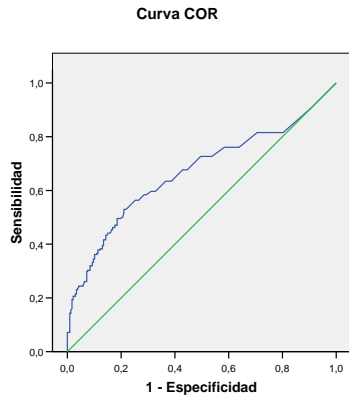
6. Cálculo de las curvas ROC.

Mediante el programa Epidat se calcula la sensibilidad y especificidad de los distintos marcadores cuantitativos para el diagnóstico de SCA. Se representan las curvas ROC de cada uno de ellos y mediante el área de la curva se determina si los puntos de corte establecidos son los más adecuados. Para los que no tienen un área aceptable se calcula un nuevo punto de corte.

A continuación se representan algunos ejemplos de curvas ROC: (Figura 17)

CK 0h

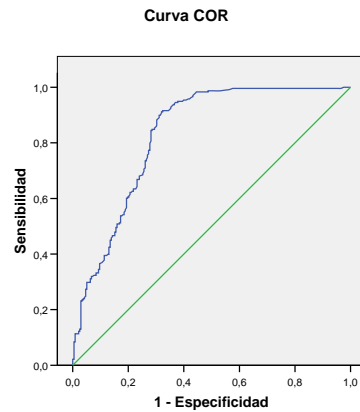
Area= 0,589 (0,538-0,642); p=0,001



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

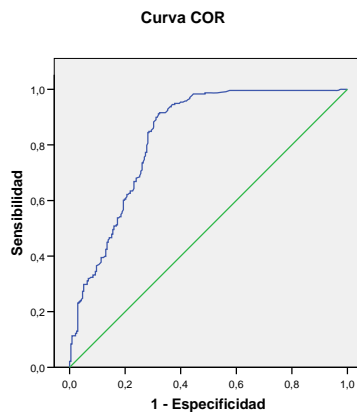
cTnI 0h

Area= 0,666 (0,617-0,716); p=0,000



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

LD 0 h



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Area= 0,830 (0,793-0,867); p=0,000

Figura 17. Ejemplos de curvas ROC para CK, cTnI y LD.

MARCADOR	AREA	IC	P
CK-MB	0,69	0,53-0,85	0,037
AST	0,63	0,58-0,68	0,000
NT-proBNP	0,92	0,87-0,97	0,000
CREATININA	0,86	0,82-0,89	0,000
FIBRINOGENO	0,68	0,58-0,77	0,001
MIOGLOBINA	0,66	0,61-0,70	0,000
MIELOPEROXIDASA	0,52	0,47-0,57	0,481
ALBUMINA modificada por isquemia	0,68	0,64-0,73	0,000
DIMERO D	0,81	0,77-0,85	0,000
PLASMINOGENO	0,54	0,49-0,58	0,158
HOMOCISTEÍNA	0,78	0,73-0,82	0,000
PCR	0,88	0,83-0,91	0,000
CK 0H	0,59	0,54-0,64	0,001
cTnI 0H	0,67	0,62-0,72	0,000
LD 0H	0,83	0,79-0,87	0,000

Tabla 9. Areas de las curvas ROC de los principales marcadores, intervalos de confianza (IC del 95 %) y valor p.

En la tabla 9 se listan las áreas de las curvas ROC para los distintos marcadores. Cuanto más cercano a 1 mejor es el área y mayor sensibilidad y especificidad tendrá el marcador. Mieloperoxidasa y plasminógeno no tienen un área aceptable ($< 0,55$). CK-MB tiene un área significativa pero con un amplio rango de confianza debido al bajo número de eventos. Con los valores de sensibilidad y especificidad se deciden nuevos puntos de corte que proporcionen mejores áreas (Tabla 10).

Marcador	Antiguo punto de corte	Nuevo punto de corte	OR pacientes/controles (95 % IC)
CK 0 h	195	90	1,2 (1,1-1,3)
cTnI	1,5	0,7	2,0 (1,9-2,1)
AST	50	44,5	1,1 (1-1,2)
NT-proBNP	125	100	1,3 (1,2-1,4)
Creatinina	1,2	0,95	1,3 (1,2-1,4)
LD	460	360	2,9 (2,8-3,0)
Fibrinógeno	4	3,44	1,2 (1,1-1,3)
Mioglobina	92	75,5	1,2 (1,1-1,3)
Albúmina modificada por isquemia	75	61,5	1,2 (1,1-1,3)
Dímero D	0,5	0,43	1,2 (1,1-1,3)
Plasminógeno	80	75	1,0 (0,9-1,1)
Homocisteína	15	12,5	1,2 (1,1-1,3)
Mieloperoxidasa	146	140	1,0 (0,9-1,1)

Tabla 10. Cálculo de nuevos puntos de corte.

Con los nuevos puntos de corte no se obtienen mejoras importantes para los marcadores (siempre se disminuye el valor del punto de corte). Estas mejoras sólo tienen valor clínico y estadístico en el caso de CK, NT-proBNP, creatinina, fibrinógeno, mioglobina, albúmina modificada por isquemia, dímero D, homocisteína y, sobre todo, en cTnI y LD.

Con las variables seleccionadas, como marcadores para el diagnóstico del SCA, y sus nuevos puntos de corte propuestos para una sensibilidad y especificidad aceptables, se diseña un modelo logístico para la creación de una fórmula de probabilidad de SCA con posible utilidad clínica.

7. Construcción de un modelo matemático con finalidad predictiva. Creación y validación del SCORE.

En el campo de los marcadores bioquímicos de SCA, tanto en Europa como en Estados Unidos, la publicación periódica de informes de resultados está muy extendida pero poco consensuada. Para ello se han desarrollado diversos modelos matemáticos que, a partir de un grupo de factores de riesgo y variables bioquímicas correspondientes a un paciente concreto, son capaces de predecir la probabilidad con la que un determinado evento, como el SCA, puede suceder en ese individuo. El objetivo del estudio también es crear y validar el modelo SCORE con los pacientes de este estudio del Hospital Universitario Puerta de Hierro y posible SCA.

A partir de las 11 variables de riesgo seleccionadas (hipercolesterolemia previa, hipertensión arterial, mutaciones en el gen del leucotrieno B4, proteína cTnI, CK, AST, LD, creatinina, mioglobina, albúmina modificada por isquemia y dímero D) y con un coeficiente beta asociado a cada una de ellas, se llega al modelo final en tres pasos con 9 variables finales (en el segundo paso sale CK y en el tercero AST) que proporciona la probabilidad de SCA en cada individuo. SCORE es una puntuación obtenida de modelo logístico para estimar la probabilidad de SCA en pacientes con sintomatología y/o electrocardiograma dudosos de esta patología. Es un instrumento útil para evaluar la calidad asistencial.

En la siguiente tabla se representa el porcentaje correctamente clasificado según el modelo logístico, 83,2% aciertos en pacientes, y 87,4% en controles, por lo que aseguramos que no existan falsos SCA, con el ahorro de recursos que esto implica. (Tabla 11)

Observado	Pronosticado			
	grupo		Porcentaje correcto	
	Control	Paciente		
Paso 1 grupo	Control	208	30	87,4
	Paciente	38	200	84,0
	Porcentaje global			85,7
Paso 2 grupo	Control	208	30	87,4
	Paciente	37	201	84,5
	Porcentaje global			85,9
Paso 3 grupo	Control	208	30	87,4
	Paciente	40	198	83,2
	Porcentaje global			85,3

Tabla 11. Porcentaje correctamente diagnosticado por el modelo logístico elegido.

A continuación se detalla la obtención de la fórmula por el modelo logístico

Variables	B	Sig.	OR=exp(B)	IC 95% para Exp (B)	
				Inferior	Superior
Hipercolesterolemia	1,137	0,002	3,12	1,53	6,36
HTA	0,612	0,047	1,84	1,01	3,37
Gen leucotrieno	0,964	0,002	2,62	1,42	4,86
cTnI	0,916	0,005	2,50	1,33	4,71
LDH 0h	1,953	0,000	7,05	3,90	12,73
Creatinina	2,511	0,000	12,32	6,11	24,84
Mioglobina	1,044	0,001	2,84	1,51	5,36
Albúmina modificada por isquemia	1,901	0,000	6,69	3,51	12,77
DD	1,773	0,000	5,89	3,31	10,49
Constante	-4,746	0,000	0,01		

Tabla 12. Resultados del modelo logístico.

Con estos coeficientes se establece la fórmula teórica para el modelo logístico:

$$\text{Probabilidad (SCA)} = e^Z / (1 + e^Z).$$

$$Z = -4,746 + 1,37*\text{Hipercolesterolemia} + 0,612*\text{HTA} + 0,964*\text{Gen leucotrieno B4} + 0,196*\text{cTnI} + 1,953*\text{LD} + 2,511*\text{Creatinina} + 1,044*\text{Mioglobina} + 1,901*\text{Albúmina modificada por isquemia} + 1,773*\text{Dímero D}$$

Los valores de las OR (odds ratio) se establecen con las exponenciales de los coeficientes. De esta fórmula, teniendo en cuenta las OR, se establece la fórmula para la puntuación de SCA redondeando los coeficientes, haciéndola de uso más sencillo en la práctica clínica y tras comprobar que los resultados obtenidos no se alteran de forma considerable:

$$\text{SCORE} = 3*\text{Hipercolesterolemia} + 2*\text{HTA} + 3*\text{Gen leucotrieno B4} + 2*\text{cTnI} + 7*\text{LD} + 12*\text{Creatinina} + 2*\text{mioglobina} + 7*\text{albúmina modificada por isquemia} + 6*\text{DímeroD}$$

El modelo se ha validado a partir de su capacidad de calibración (prueba de Hosmer-Lemeshow). La prueba de Hosmer-Lemeshow ($\chi^2=5,30$; $p=0,725$) estima un estadístico C a partir de la diferencia entre valores de SCA observados en la realidad y los esperados por el modelo en distintos grupos de riesgo. Un valor de $p > 0,05$ indica que el modelo ajusta bien los datos y, por lo tanto, predice bien la probabilidad de SCA de los pacientes.

Con esta fórmula se calcula la puntuación o índice pronóstico para cada paciente del estudio, y se establecen los quintiles 20, 40, 60 y 80 de su valor. A continuación se calcula la probabilidad de SCA asociada con cada quintil, pudiendo tener así un SCORE con el que validar a futuros pacientes. (Tabla 13) (Figura 18)

Quintiles de Score	Nº de SCA Casos/Controles	% SCA	IC (95 %)
≤ 7	2/101	1,9	(0,2-6,8)
8-13	15/74	16,9	(9,7-26,3)
14-19	51/47	52	(41,7-62,2)
20-28	83/12	87,4	(79-93,3)
≥ 29	87/4	95,6	(89,1-98,8)

Tabla 13. Número de pacientes en el grupo caso y en el grupo control en cada SCORE

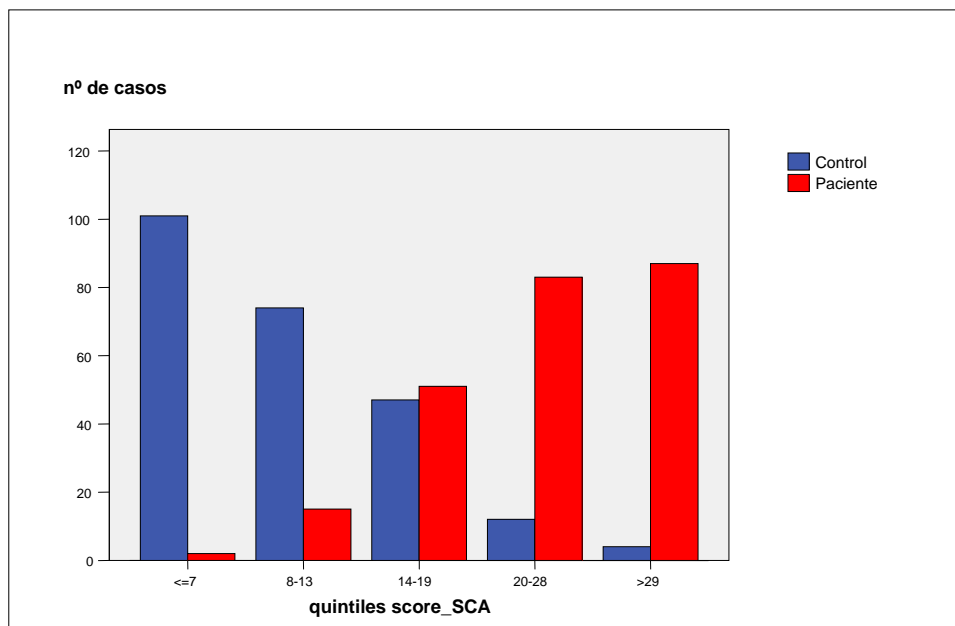


Figura 18. Número de casos de cada grupo de pacientes en los 5 grupos de SCORE.

Por último, se estudia la relación entre la mortalidad-grupo (casos-controles) y mortalidad-grupo de puntuación (quintil).

8. Mortalidad en los grupos de población y en los de puntuación.

		muerte		Total
		N	S	
GRUPO Control	Recuento	179	59	238
	% de GRUPO	75,2%	24,8%	100,0%
Paciente	Recuento	157	81	238
	% de GRUPO	66,0%	34,0%	100,0%
Total	Recuento	336	140	476
	% de GRUPO	70,6%	29,4%	100,0%

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para GRUPO (Control / Paciente)	1,565	1,051	2,331
Para la cohorte muerte = N	1,140	1,014	1,281
Para la cohorte muerte = S	,728	,549	,967
N de casos válidos	476		

Tablas 14 y 15. Mortalidad en el grupo de casos y en el grupo de controles. Razón de mortalidad entre ambos grupos.

Como se observa en las tablas anteriores, la diferencia en la mortalidad entre ambos grupos no tiene importancia ni clínica ni estadística OR = 1,56 (1,05-2,33).

Tabla de contingencia quintiles de P_LOGIT * muerte

		muerte		Total
		N	S	
quintiles de P_LOGIT <=7	Recuento	78	25	103
	% de quintiles de P_LOGIT	75,7%	24,3%	100,0%
8-13	Recuento	64	25	89
	% de quintiles de P_LOGIT	71,9%	28,1%	100,0%
14-19	Recuento	77	21	98
	% de quintiles de P_LOGIT	78,6%	21,4%	100,0%
20-28	Recuento	68	27	95
	% de quintiles de P_LOGIT	71,6%	28,4%	100,0%
>29	Recuento	49	42	91
	% de quintiles de P_LOGIT	53,8%	46,2%	100,0%
Total	Recuento	336	140	476
	% de quintiles de P_LOGIT	70,6%	29,4%	100,0%

Tabla 16. Mortalidad en las distintas puntuaciones del SCORE.

No hay cambios en la mortalidad entre los distintos quintiles hasta llegar a puntuaciones mayores de 29 (tabla 16), donde la mortalidad aumenta considerablemente. Estos datos podrán servir para futuros estudios de mortalidad en el SCA por grupos de estratificación.

9. Validación de la fórmula en otro grupo de pacientes.

El SCORE ha sido validado adecuadamente en los pacientes incluidos en esta tesis y puede utilizarse para medir los resultados de la práctica asistencial en un nuevo grupo de pacientes.

El uso extenso y uniforme de un único modelo probabilístico permite realizar comparaciones temporales internas y externas y puede ayudar a minimizar la conducta adversa al riesgo fomentada por las comparaciones de resultados no ajustadas.

Un objetivo del estudio es validar este modelo predictor de SCA en un entorno determinado, a partir de sus capacidades de calibración y de discriminación y, de este modo, poder asegurar que el modelo predice bien el SCA en los pacientes atendidos en un contexto como el de un hospital docente concertado dentro de la sanidad pública.

Para la validación del score se selecciona una población de 103 pacientes, seleccionados aleatoriamente durante un período de 4 meses, con los mismos criterios de inclusión que la población objeto de esta tesis. De este segundo grupo de población, 46 sufren un verdadero SCA y 57 otras patologías. Se aplica la fórmula a cada paciente eliminando la hipertensión arterial, puesto que solamente mejora el área en un 0,2%. Se calcula su validez mediante la curva ROC.

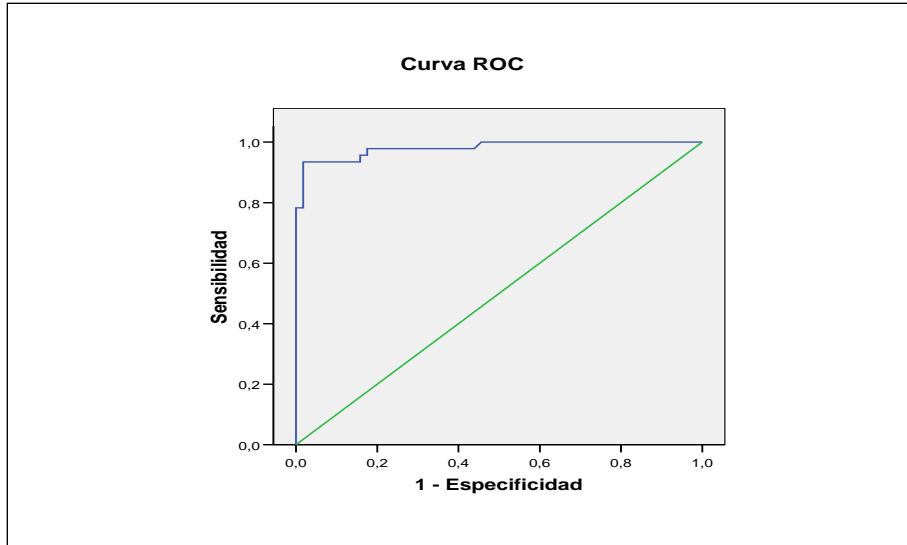


Figura 19. Curva ROC tras la aplicación de la fórmula a la nueva población seleccionada.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: P_SCA

Área	Error típ.	Sig. asintótica	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,980	,012	,000	,957	1,004

Tabla 17. Area bajo la curva de la curva ROC probabilidad de SCA en la nueva población seleccionada.

El área bajo la curva (0,980) expresa la validez de la fórmula en la nueva población. El porcentaje correctamente diagnosticado con la fórmula original en la nueva población es del 97,8 % y el porcentaje de patología distinta al SCA correctamente diagnosticado es del 75,4 %.

Como resumen de esquematizan todas las posibilidades encontradas en la nueva población con la probabilidad de SCA para uso en la práctica clínica. El significado de la tabla siguiente se expresa en probabilidades (%) de SCA; por ejemplo, para un paciente sin ninguna variable pronóstica, la probabilidad de SCA es 1,29 % de riesgo. Para un paciente con valores de concentración sérica por encima del punto de corte para creatinina, albúmina modificada por isquemia y troponina, la probabilidad de SCA es de 67, 3%.

	Cr	LD	DD	IMA	Myo	Col ↑	Leuc	cTni	Probabilidad de SCA
1	no	no	no	no	no	no	no	no	,012
2	no	no	no	no	no	no	no	si	,029
3	no	no	no	no	si	no	no	no	,038
4	no	no	no	si	no	no	no	no	,070
5	no	no	si	no	no	no	no	no	,075
6	no	si	no	no	no	no	no	no	,081
7	no	no	no	no	si	no	no	si	,085
8	si	no	no	no	no	no	no	no	,129
9	no	no	no	si	no	no	no	si	,150
10	no	si	no	no	no	no	no	si	,171
11	no	no	no	si	si	no	no	no	,192
12	no	si	no	no	si	no	no	no	,217
13	no	no	si	si	no	no	no	no	,327
14	no	si	no	si	no	no	no	no	,346
15	no	si	si	no	no	no	no	no	,362
16	no	si	no	no	si	no	no	si	,393
17	si	no	no	si	no	no	no	no	,469
18	si	si	no	no	no	no	no	no	,508
19	no	si	si	no	no	no	no	si	,569
20	no	si	si	no	no	si	no	no	,632
21	no	no	si	no	si	si	no	si	,643
22	no	no	no	si	si	si	si	no	,659
23	si	no	no	si	no	no	no	si	,673
24	no	si	no	no	si	si	si	no	,693
25	si	no	no	si	no	si	no	no	,728
26	si	no	no	si	si	no	no	no	,735
27	si	no	si	no	si	no	no	no	,748
28	no	no	si	si	no	si	no	si	,775
29	no	no	si	si	si	no	no	si	,780
30	no	no	si	si	si	no	si	no	,803
31	no	si	si	no	no	si	si	no	,822
32	si	no	si	si	no	no	no	no	,850
33	si	si	no	no	no	si	no	si	,880
34	no	si	si	si	no	no	no	si	,888
35	no	si	si	si	si	no	no	no	,914
36	no	si	no	si	si	si	no	si	,922
37	no	no	si	si	si	si	si	no	,925
38	no	si	si	si	no	si	no	si	,960
39	no	si	si	si	si	no	no	si	,961
40	no	si	si	si	si	no	si	no	,966
41	no	no	si	si	si	si	si	si	,967
42	no	si	no	si	si	si	si	si	,969
43	si	si	si	si	no	no	no	no	,975
44	si	no	si	si	si	no	no	si	,976
45	si	si	no	si	si	no	no	si	,978
46	si	no	si	si	si	no	si	no	,979
47	si	si	si	no	si	no	no	si	,980
48	si	si	no	si	si	no	si	no	,981
49	si	no	si	si	si	si	no	no	,982
50	no	si	si	si	si	no	si	si	,985
51	si	si	si	si	no	no	no	si	,989
52	si	si	si	si	si	no	no	si	,997
53	si	si	si	si	si	si	si	no	,999

Siglas: Cre: creatinina; LD: lactato deshidrogenasa; DD: dímero D; IMA: albúmina modificada por isquemia; Col↑: hipercolesterolemia; Leuc: gen productor de leucotrieno B4; cTnI: troponina I cardíaca.

Con estos datos es posible concluir que el modelo SCORE ha quedado validado en este centro y que se trata de un instrumento fiable. Las predicciones de probabilidad de SCA que se obtienen son válidas y ajustadas al riesgo real que presentan los pacientes. Se recomiendan validaciones más contextualizadas antes de poder utilizar con seguridad un modelo de regresión.

✓ DISCUSIÓN.

Las enfermedades cardiovasculares son una de las primeras causas de mortalidad en España y, en general, en todos los países industrializados. Debido a la mortalidad, la morbilidad y al impacto sobre la salud de la población que producen, actualmente supone uno de los principales problemas sanitarios.

Dentro de este grupo de enfermedades, el síndrome coronario agudo (SCA) continúa siendo el de mayor importancia, por lo que es objetivo de un gran número de investigaciones. La Comisión Conjunta de las Sociedades Científicas de Cardiología europea y americana publicó, en Septiembre del año 2000, un documento en el que se daba una nueva definición del síndrome coronario agudo (SCA) como un proceso complejo. En la fisiopatología del síndrome participan múltiples moléculas que han sido, son o serán objeto de estudio como posibles marcadores bioquímicos del SCA:

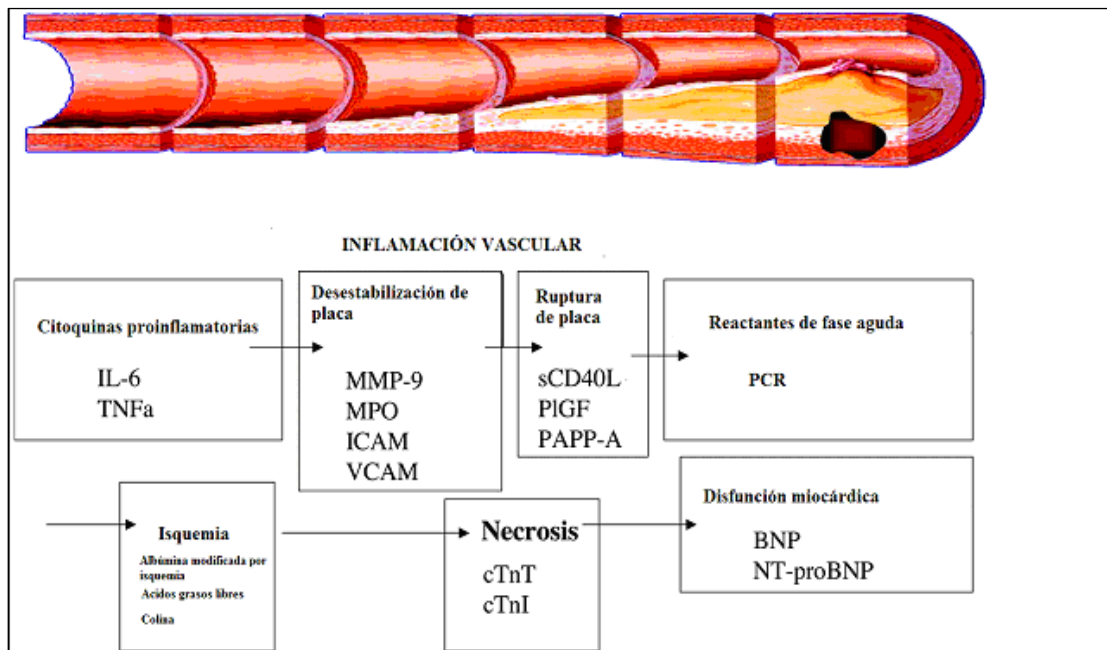


Figura 20. Bioquímica en pacientes con SCA: inflamación vascular con ruptura de placa, isquemia, muerte celular y disfunción miocárdica (236).

1. Citoquinas proinflamatorias, como son IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Cada vez se publican más estudios que relacionan estas moléculas con el SCA, aunque su utilidad clínica aún es dudosa, sobre todo debido a su baja especificidad (237-246). A nivel práctico, existe dificultad para obtener los reactivos necesarios para la técnica ELISA, siendo poco automatizados y costosos.
2. Partículas implicadas en la desestabilización de placa (inflamación vascular). Se estudia la utilidad de moléculas como metaloproteinasa 9 (MMP-9), mieloperoxidasa (MPO), ICAM y VCAM (partículas de adhesión intercelular y vascular). De estas moléculas, la mieloperoxidasa es la que ha demostrado, hasta la actualidad, mayor utilidad en el diagnóstico del SCA. Un aumento de su concentración sérica no parece específico de enfermedad cardíaca; aún así, parece ser un marcador prometedor que ya está siendo objetivo de laboratorios comerciales. (247) Los ensayos disponibles para MMP-9, VCAM e ICAM son técnicas de ELISA poco automatizables y costosas. Los ensayos de mieloperoxidasa son técnicas fotométricas sencillas y más económicas.
3. Partículas implicadas en la ruptura de placa (inflamación vascular). Se incluyen moléculas como el ligando soluble de CD40, PAPP-A y PIGF. En la literatura existente sobre estas moléculas no está clara su utilidad en el diagnóstico del SCA pero si parece haber una relación con dicha patología. (248-249) Los ensayos incluyen ELISA (CD40) e inmunoensayo (PAPP-A y PIGF), que están disponibles en diversas empresas comerciales aunque son costosos y no está muy instauradas en los laboratorios de los hospitales de Madrid.
4. Reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva. Muchos son los estudios que demuestran su utilidad en el diagnóstico y pronóstico del SCA, sobre todo a bajas concentraciones. En la actualidad hay varios ensayos disponibles para esta molécula a un coste razonable; y puede proporcionar información muy útil de dicha patología (250-252), por lo que es objetivo de diversos trabajos.

5. Moléculas implicadas en el proceso isquémico. Actualmente se estudia el uso de moléculas como la albúmina modificada por isquemia, ácidos grasos libres y la colina. La albúmina modificada por isquemia parece tener validez para el diagnóstico del SCA, sobre todo complementado por marcadores más específicos. (253) La implicación directa de los ácidos grasos libres parece menos clara y la utilidad clínica de la colina, debido a su pequeño tamaño (con un aclaramiento sanguíneo rápido) y poca especificidad, no parece muy buena. Los ensayos comercializados para la determinación de estas moléculas son escasos.

6. Moléculas de necrosis.

6.1 Las moléculas más utilizadas por su cardioespecificidad son las proteínas troponinas I y T cardíacas. La troponina I cardíaca (cTnI) es una molécula ampliamente utilizada en la clínica y con abundante bibliografía aunque poco consensuada. En múltiples trabajos se demuestra su utilidad en el diagnóstico del SCA, aunque, apoyado por un marcador más sensible, mejora su función. Es considerado el “gold estándar” en las últimas recomendaciones de la NACB (año 2000).

Otras moléculas que han sido estudiadas en los últimos años han sido:

6.2 La enzima aspartato aminotransferasa. Durante mucho tiempo su determinación ha resultado útil en el diagnóstico del infarto de miocardio, por su alta presencia en músculo cardíaco y por su corta vida media. Debido a su gran inespecificidad cada vez se usa menos.

6.3 La enzima lactato deshidrogenasa. Su determinación ha sido utilizada mucho tiempo en el diagnóstico del SCA, aunque actualmente existen marcadores más específicos. Aún así, sigue siendo usada, sobre todo, si existe determinación simultánea de marcadores cardioespecíficos.

- 6.4 La enzima creatín quinasa. Aunque no es cardioespecífica se utiliza en la diagnosis del SCA, sobre todo, su isoenzima CK-MB. A partir de la última reunión de las Sociedades Científicas de Cardiología europea y americana, en el año 2000, es sustituida por la troponina por ser más cardioespecífica.
- 6.5 Isoenzima BB de la glucógeno fosforilasa (GPBB). En la mayoría de pacientes con SCA, GPBB aumenta entre 2 y 4 horas tras el inicio del dolor torácico y tiene su máximo entre las 6 y las 20 horas. Añadido a la escasa disponibilidad de reactivos, hace cuestionar actualmente su validez como indicador de daño miocárdico irreversible
- 6.6 Mioglobina. Debido a su liberación en las primeras horas tras un SCA y a su alta concentración en músculo cardíaco, es un marcador muy utilizado desde hace años y hasta la actualidad en el SCA, aunque existe controversia al no ser cardioespecífico.
7. Moléculas de disfunción cardíaca: BNP y NT-proBNP. Estas moléculas se elevan en sangre de pacientes con SCA por incrementos tanto del diámetro de la cámara ventricular, como de la presión dentro del ventrículo izquierdo, durante la remodelación tras infarto transmural o como consecuencia de un daño isquémico primario. Por ello hay muchos estudios en la actualidad sobre su utilidad en el SCA.

Por otro lado, existen factores de riesgo ampliamente relacionados en la bibliografía con el SCA, como son el tabaquismo, la función renal y la hipercolesterolemia. En diversos trabajos se ha relacionado la presencia de estos factores de riesgo con una mayor incidencia de SCA. El tabaquismo participa en la formación de la placa aterosclerótica, la formación de trombo y la isquemia celular. Una función renal disminuida provoca una mayor sobrecarga cardíaca y, en caso de formación de un trombo, participa del empeoramiento de la función cardíaca. El colesterol participa de la formación de placas ateroscleróticas de forma directa, sobre todo la fracción LDL-colesterol.

Otros marcadores ampliamente relacionados con el SCA, son proteínas de la coagulación como el fibrinógeno, plasminógeno y dímero D. La trombosis coronaria es el principal mecanismo de transición de una enfermedad coronaria aterosclerótica estable a un síndrome coronario agudo (SCA). La trombosis, como expresión de disfunción endotelial, es el resultado de una compleja interrelación entre estímulos ambientales, inflamatorios y trombóticos que contribuyen a la extensión, persistencia del trombo y a eventos cardiovasculares adversos. Estos hallazgos sugieren que en la fase aguda y en el seguimiento de un SCA, marcadores de coagulación y fibrinólisis tienen una relación directa e independiente con procesos cardiovasculares adversos.

Las últimas innovaciones incluidas en la búsqueda de marcadores para el SCA se basan en la genética. Son muchos los estudios que intentan buscar relación entre genes y esta patología, pero ninguno de ellos es concluyente. En pequeños trabajos se ha demostrado que las variantes de un gen (ALOX5AP) contribuyen al riesgo de enfermedad aumentando la producción de una molécula proinflamatoria llamada leucotrieno B4 (LTB4). Estos resultados han dado un acercamiento terapéutico, directo y potencial de gran alcance para prevenir el SCA: inhibir la síntesis de LTB4. Se han estudiado otros genes que no han demostrado utilidad en esta patología como son MYH7, TNNT2, TNNT3, ACE-17q y gen del receptor α 2-adrenérgico. Se necesitan más estudios para comprobar la utilidad de cada gen en el SCA.

En las últimas recomendaciones se establece el uso de varios marcadores bioquímicos del SCA para un diagnóstico más certero de dicha patología. En este trabajo se estudia el comportamiento de varios marcadores en pacientes con SCA y en pacientes con otras patologías, con el fin de determinar cuál tiene interés clínico en el diagnóstico. Se incluyen en el estudio marcadores de casi todos los procesos implicados en el SCA. Por último, se intenta relacionar estas variables en una fórmula que permita estratificar a los pacientes que pueden sufrir un SCA con una probabilidad y, así, dirigir el tratamiento médico.

De las partículas implicadas en la desestabilización de placa (inflamación vascular), la mieloperoxidasa y la homocisteína, como ya se ha comentado, necesitarían mayor número de pacientes para demostrar su utilidad en la diagnosis del SCA. Son moléculas poco específicas que no presentan mejoras con respecto al resto de marcadores en este trabajo.

La proteína C reactiva es una molécula que a bajas concentraciones puede servir para el diagnóstico y/o pronóstico de un SCA. Los estudios existentes no demuestran de forma evidente esta utilidad y el trabajo aquí valorado, tampoco lo corrobora. Es una molécula de fase aguda poco específica y con una sensibilidad no superior a otras moléculas. Se necesitaría un estudio más amplio a distintos puntos de corte, para establecer su uso en el protocolo para SCA.

De las moléculas implicadas en el proceso isquémico, la albúmina modificada por isquemia ha mostrado una gran utilidad en el diagnóstico para SCA. Presenta como desventaja que es una molécula que eleva su concentración sanguínea en todos los procesos isquémicos (sepsis, traumas,...), siendo poco específico, pero si se determina de forma simultánea con otro marcador más específico, resulta un marcador muy útil y fácilmente determinable en el laboratorio. El ensayo comercial no está muy extendido, pero existe y, en poco tiempo, será más accesible.

De las moléculas de necrosis celular, la troponina, tanto en la bibliografía como en este trabajo, demuestra ser una molécula muy específica de SCA, aún así se mejora su utilidad si se determina de forma simultánea con otro marcador más sensible. El problema que presenta esta molécula es la falta de estandarización tanto de su ensayo comercializado como de su uso, por lo que este trabajo contribuye a protocolizar su función clínica. Las enzimas AST y LD, se elevan a las pocas horas tras un SCA, son marcadores muy sensibles aunque muy poco específicos. En este trabajo se concluye que estas moléculas, junto con la determinación de moléculas más específicas, siguen siendo válidas para el diagnóstico de dicha patología. La enzima CK posee unas características similares a las enzimas anteriores, pero su isoenzima CK-MB es bastante más específica por lo que está incluida en las recomendaciones de las sociedades internacionales. Esta isoenzima no llega a ser tan específica como la troponina y sus ensayos comercializados (tanto la medida de actividad enzimática como el inmunoensayo de CK-MB masa) presentan limitaciones. En este trabajo demuestra su utilidad pero ésta no es muy superior a la de las enzimas anteriores y, sobre todo, a la de la troponina por lo que no recomienda su uso en solitario. Por último, la mioglobina es una proteína con una escasa especificidad pero muy sensible y fácilmente determinable. En los resultados aquí obtenidos, se demuestra que es una molécula útil si se determina simultáneamente con un marcador más específico como la troponina.

De las moléculas de disfunción cardíaca, el NT-proBNP resulta ser una molécula relativamente sensible y específica de patología cardíaca que por sí sola no presenta mejoría con respecto al resto de moléculas estudiadas, por lo que no se recomienda su uso en la práctica clínica para el diagnóstico del SCA, según los resultados aquí obtenidos.

De los factores de riesgo incluidos en el estudio, tanto la función renal, valorada con las concentraciones de creatinina sérica, como la presencia de hipercolesterolemia previa, tienen influencia en la presentación de SCA. El tabaquismo y la hiperglucemia no tienen una influencia tan clara en dicha patología. La hipertensión arterial es el factor de riesgo de mayor influencia en la probabilidad de desarrollo de un SCA, por lo que es incluido en la fórmula del SCORE diseñado.

De las proteínas de la coagulación, tanto fibrinógeno como plasminógeno y dímero D demuestran tener valor en el diagnóstico del SCA. Son moléculas poco específicas y por sí solas no presentan ventajas con respecto al resto de marcadores. Sin embargo, en compañía de moléculas más específicas, sí añaden gran valor al diagnóstico, sobre todo en el caso del dímero D, donde la relación es más clara que para las otras dos proteínas.

En el caso de los genes relacionados con el SCA, no existe una relación tan evidente como con el resto de moléculas. El gen productor de leucotrieno B4 parece ser el único que presenta relación con la presencia de dicha patología tanto en la bibliografía como en este trabajo. Se ha estudiado la presencia de un SNP en este gen que ha sido asociado con una mayor prevalencia de SCA. El trabajo se podría completar diseñando un haplotipo formado por más SNPs que se presente mayoritariamente en pacientes con SCA. Esto daría un gran avance en la prevención, diagnóstico o pronóstico de este grupo de patologías.

Para conseguir en lo posible las recomendaciones de la NACB y conseguir así el diagnóstico certero y rápido del SCA, este trabajo tiene como último objetivo la validación de un modelo probabilístico SCORE para la estratificación del riesgo en pacientes con sospecha de SCA. Mediante una fórmula obtenida a partir de los resultados, se adjudica a cada paciente una puntuación asociada a una probabilidad de SCA. La fórmula utilizada es:

Puntuación SCA = 3*Hipercolesterolemia + 2*HTA + 3*Gen leucotrieno B4 + 2*cTnI+ 7*LD + 12*Creatinina + 2*Mioglobina + 7*Albúmina modificada por isquemia + 6*Dímero D.

En caso de que el marcador sea positivo o superior al punto de corte, toma como valor 1, de lo contrario toma el valor 0. En esta fórmula se incluyen moléculas partícipes de los distintos procesos que tienen lugar en el SCA.

Se incluyen marcadores genéticos, de necrosis, de isquemia, de la cascada de coagulación y factores de riesgo. La combinación de los marcadores implicados en distintas rutas metabólicas facilita el correcto diagnóstico de pacientes con posible SCA.

Con el diseño del SCORE y la asignación de una puntuación asociada a una probabilidad de SCA, se consigue una buena clasificación de los pacientes en la práctica clínica, como se observa en el siguiente gráfico.

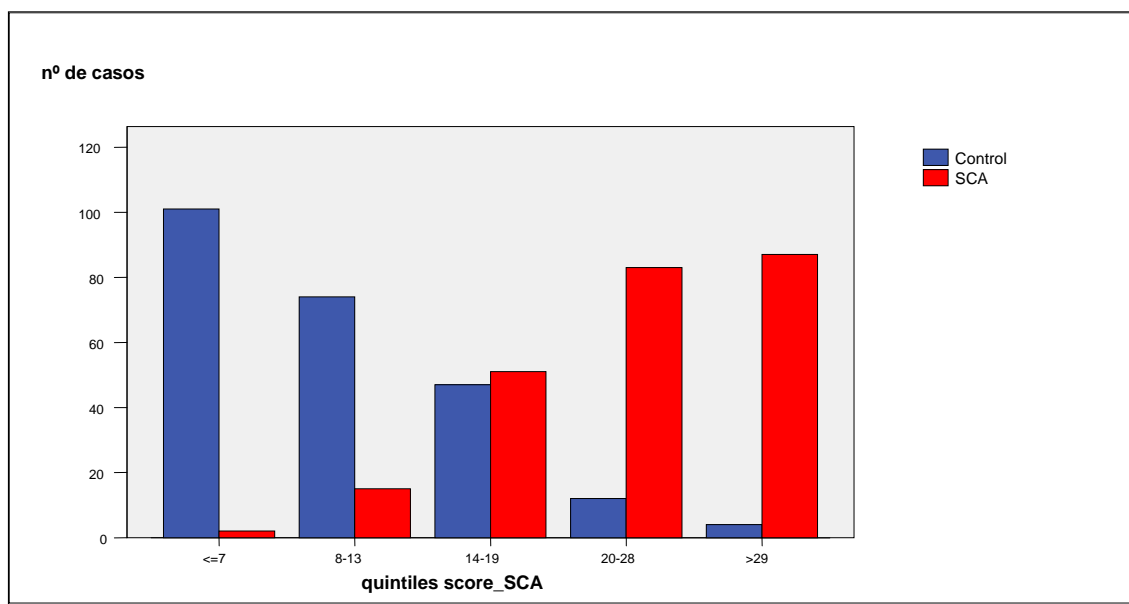


Figura 21. Representación en gráfico de barras de la clasificación de los casos y controles según la fórmula.

Este modelo es validado con otro grupo de pacientes admitidos con los mismos criterios de inclusión que los pacientes del estudio inicial. Con estos datos es posible concluir que el modelo SCORE se trata de un instrumento fiable. Las predicciones de probabilidad de SCA que se obtienen son válidas y ajustadas al riesgo real que presentan los pacientes.

Un estudio con un mayor tamaño de la muestra y, por lo tanto, más eventos registrados (muertes) proporcionaría resultados más potentes, ya que la prueba de Hosmer-Lemeshow se basa en eventos esperados respecto a observados. Por lo que este estudio sirve de base para estudios más robustos que perfeccionen la fórmula obtenida hasta llegar a una de uso común y único en un área sanitaria.

El uso extenso y uniforme de un único modelo probabilístico permite realizar comparaciones temporales internas y externas y puede ayudar a minimizar la conducta adversa al riesgo fomentada por las comparaciones de resultados no ajustadas.

*** CONCLUSIONES.**

- No existe ningún marcador que cumpla las características de idealidad para el diagnóstico del SCA, según las recomendaciones de las sociedades europeas y americanas (año 2000).
- La combinación de marcadores proporciona mejoras. Se incluyen marcadores que participan en los distintos procesos implicados en el SCA, consiguiendo un diagnóstico más certero. Por otro lado, el protocolo multimarcador permite disminuir los puntos de corte aumentando la sensibilidad en el diagnóstico.
- De los múltiples marcadores existentes actualmente, la cTnI es la más específica de forma demostrada. Como desventaja demuestra la falta de consenso tanto en sus ensayos como en su interpretación de resultados.
- Moléculas como la mioglobina, LD, Dímero D y albúmina modificada por isquemia son marcadores sensibles, tanto o más como la enzima CK. LD lleva siendo utilizada mucho tiempo. El resto de moléculas deberían ser incluidas en el protocolo para SCA, puesto que añaden ventajas a marcadores menos sensibles como la troponina.
- El estudio genético facilita la certeza. Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico del SCA se basaba únicamente en marcadores proteicos (proteómica). Actualmente se está demostrando la utilidad del estudio de genes implicados en estas patologías (genómica). Esto amplía el campo de estudio ofreciendo grandes ventajas a la práctica clínica.

- Continúa la búsqueda de marcadores que aventajen a los existentes. El estudio de nuevas moléculas que presenten mejoras con respecto a las establecidas no debe frenarse siendo un campo de investigación con gran interés en la actualidad.
- Los factores de riesgo tienen una influencia importante en la presentación del SCA. Su consideración a la hora de diagnosticar un SCA posee gran valor.
- Sería interesante estratificar por sexo y edad para ver la influencia de los factores de riesgo así como del resto de marcadores que van emergiendo.
- El comportamiento de CK, cTnI y LD en el tiempo da idea de la evolución del SCA, sobre todo para el caso de los dos primeros marcadores (CK y cTnI). Sería importante relacionarlas con el pronóstico de los pacientes.
- Con la creación de un SCORE se puede estratificar a los posibles casos de SCA, asignándoles una probabilidad y dirigiendo el diagnóstico de forma precoz y con el menor coste. Con una fórmula sencilla se mejora la práctica clínica.

✓ **Bibliografía (siguiendo la norma de Vancouver).**

- (1) Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th edition Berkshire: Edit. McGraw-Hill Book Company. 2004; 1073-1194.
- (2) Bombardini T. Myocardial contractility in the echo lab: molecular, cellular and pathophysiological basis. *Cardiovasc Ultrasound* 2005; 3: 27.
- (3) Psaty BM, Arnett D and Burke G. A new era of cardiovascular disease epidemiology. *JAMA* 2007; 298(17):2060-2.
- (4) Wittwer CT. Proceedings of the Australasian Association of Clinical Biochemists' 44th Annual Scientific Conference. *Clin Biochem Rev* 2006; 27(4): S11-S45.
- (5) Newby LK, Alpert JS, Ohman EM, Thygesen K and Califf RM. Changing the diagnosis of acute myocardial infarction: implications for practice and clinical investigations. *Am Heart J* 2002; 144; 957-980.
- (6) Luepker RV, Apple FS, Christenson RH, Crow RS, Fortmann SP, Goff D, et al. Case definitions for acute coronary heart disease in epidemiology and clinical research studies. *Circulation* 2003; 108: 2543-2549.
- (7) Kennon S, Price CP, Mills PG, MacCallum PK, Cooper J, Hooper J, et al. Cumulative risk assessment in unstable angina: clinical, electrocardiographic, autonomic, and biochemical markers. *Heart*. 2003; 89(1): 36-44.
- (8) Ferguson J, Beckett G, Stoddart M, Walker S and Fox K. Myocardial infarction redefined: the new ACC/ESC definition, based on cardiac troponin, increases the apparent incidence of infarction. *Heart* 2002; 88(4): 343-347.
- (9) Alpert JS, Malasky BR and Thygesen K. Redefining Myocardial Infarction for the 21st Century. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2004; 115: 79-96.
- (10) Hammermeister KE, DeRouen TA and Dodge HT. World Health Organization. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. *Circulation* 1979; 59: 607-609.
- (11) French JK and Harvey W. Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. *Heart* 2004; 90(1): 99-106.
- (12) Apple FS, Wu AHB and Jaffe AS. European Society of Cardiology and American College of Cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: how to use existing assays clinically and for clinical trials. *Am Heart J* 2002; 144: 981-986.
- (13) Christenson R. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Utilization of Biochemical Markers in Acute Coronary Syndromes and Heart Failure. *Clin Chem* 2007; 53: 545-546.

- (14) Wu AH, Valdes R Jr and Hawker CD. Guidelines and recommendations in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002; 48(7): 1135-1136.
- (15) Geluk CA, Tio RA, Tijssen JGP, van Dijk RB, Dijk WA, et Col. Clinical characteristics, cardiac events and coronary angiographic findings in the prospective PREVENT cohort: an observational study. *Neth Heart J* 2007; 15(4): 133-141.
- (16) Williams SB. Cardiac Markers. *Tex Heart Inst J* 2004; 31(1): 103.
- (17) Turer AT, Mahaffey KW, Gallup D, Weaver WD, Christenson RH, Cada NR, et al. Enzyme estimates of infarct size correlate with functional and clinical outcomes in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2005; 6: 12.
- (18) Kaplan LA, Pesce AJ and Kazmierczak S. *Clinical Chemistry - Theory, Analysis, Correlation* 4th edition New York City: Edit. Mosby. 2002; 750-821.
- (19) Jaffe AS, Babuin L and Apple FS. Biomarkers in acute coronary disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1-11.
- (20) Mair J, Morandell D, Genser N, Lechleitner P, Dienstl F and Puschendorf B. Equivalent sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB Mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1995; 9: 1266-1272.
- (21) Soler JJ. *Guía práctica: marcadores bioquímicos cardíacos*. Alcoy: Colegio Oficial de Farmacéuticos de la provincia de Alicante; 2007.
- (22) Yoneda K. Aspartate aminotransferase (glutamic oxalacetic transaminase) and alanine aminotransferase (glutamic pyruvic transaminase). *Rinsho Byori* 2001; Suppl 116:72-80. Japanese.
- (23) Hjortshøj S, Otterstad JE, Lindahl B, Danielsen R, Pulkki K and Ravkilde J. Biochemical diagnosis of myocardial infarction evolves towards ESC/ACC consensus: experiences from the Nordic countries. *Scand Cardiovasc J* 2005; 39(3):159-66.
- (24) Juárez U, Trejo W, Whente M, Contreras G, Cárdenas M and Reyes PA. The usefulness of determining myoglobin, creatine phosphokinase MB isoenzyme, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of acute myocardial infarct. *Arch Inst Cardiol Mex* 1998; 68(3): 214-7. Spanish.
- (25) Rotenberg Z, Weinberger I, Davidson E, Fuchs J, Sperling O and Agmon J. Does determination of serum aspartate aminotransferase contribute to the diagnosis of acute myocardial infarction?. *Am J Clin Pathol* 1989; 91(1):91-4.

- (26) McKenzie D and Henderson AR. Electrophoresis of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Selected Methods. Clin Chem* 1983; 10: 59-67.
- (27) Canalias F. Isoenzimas y formas múltiples de las enzimas en bioquímica clínica. Barcelona: Edit. Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular. 1996; 61-67.
- (28) Lott JA. Serum enzyme determinations in the diagnosis of acute myocardial infarction: an update. *Human Pathol* 1984; 15: 706-716.
- (29) Ewen LM. Lactate dehydrogenase isoenzyme-1: Its usefulness as a screening test in diagnosis of myocardial infarction. *Clin Biochem* 1983; 16: 306-309.
- (30) Canalias F. Isoenzimas y formas múltiples de las enzimas en bioquímica clínica. Barcelona: Edit. Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular. 1996; 33-42.
- (31) Jones MG and Swaminathan R. The clinical biochemistry of Creatine kinase. *J Int Fed Clin Chem* 1990; 2: 108-114.
- (32) Neumier D. Tissue specific distribution of Creatine kinase isoenzymes. Berlín: edit. Springer-Verlag. 1981; 85-9.
- (33) Wu AHB, Wang XM, Gornet TG and Ordoñez-Llanos J. Creatine kinase isoforms in patients with skeletal muscle injury: ramifications for early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 38: 2396-2400.
- (34) Heinecke JW. The role of myeloperoxidase in HDL oxidation and atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep* 2007; 9(4): 249-251.
- (35) Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R and Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol.* 2008; 23(3): 381-390.
- (36) Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108: 1440-1445.
- (37) Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishebor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1595-1604.

- (38) Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107: 499-511.
- (39) Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, Bossi I, Ottini E, Vezzoli M, et al. Increased concentrations of inflammatory mediators in unstable angina: correlation with serum troponin T. *Heart* 2001; 85(5): 571-575.
- (40) Krause EG, Rabitzsch G, Noll F, Mair J and Puschendorf B. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischaemic injury and infarction. *Mol Cell Biochem* 1996; 160-161:289-295.
- (41) Mair J. Glycogen phosphorylase. *The encyclopaedia of molecular medicine*. New York: edit. Creighton TE. 2002: 1489-1491.
- (42) Richter F, Böhme HJ and Hofmann E. Developmental changes of glycogen phosphorylase b isozymes in rat tissues. *Biomed Biochim Acta* 1983; 42(10): 1229-1235.
- (43) Apple FS, Wu AH, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J, et al. Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2005; 51(5): 810-824.
- (44) Orn S, Manhenke C, Squire IB, Ng L, Anand I and Dickstein K. Plasma MMP-2, MMP-9 and N-BNP in long-term survivors following complicated myocardial infarction: relation to cardiac magnetic resonance imaging measures of left ventricular structure and function. *J Card Fail* 2007; 13(10): 843-849.
- (45) Kalela A, Koivu TA, Sisto T, Kanervisto J and Hoyhtya M. Serum matrix metalloproteinase-9 concentration in angiographically assessed coronary artery disease. *Scand Clin Lab Invest* 2002; 62: 337-342.
- (46) Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-1585.
- (47) Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases; structure, function and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
- (48) Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM and Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail* 2004; 10: 328-333.

- (49) Vilen ST, Nyberg P, Hukkanen M, Sutinen M, Ylipalosaari M, Bjartell A, et al. Intracellular co-localization of trypsin-2 and matrix metalloprotease-9: Possible proteolytic cascade of trypsin-2, MMP-9 and enterokinase in carcinoma. *Exp Cell Res* 2008; 314(4): 914-926.
- (50) Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, et al. Lymphocyte/macrophage interactions: Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. *J Biomed Mater Res A* 2008; [Epub ahead of print].
- (51) Rodríguez JA, Orbe J and Páramo JA. Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes. *Rev Esp Cardiol*. 2007; 60(9): 959-967. Spanish.
- (52) Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L and Kristenson M. Circulating Matrix Metalloproteinase-9 Is Associated with Cardiovascular Risk Factors in a Middle-Aged Normal Population. *PLoS ONE* 2008; 3(3): 1774.
- (53) Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol* 2005; 563: 23–60.
- (54) Wilson MT and Reeder BJ. Oxygen-binding haem proteins. *Exp Physiol* 2008; 93(1):128-132.
- (55) Rolstad OJ, Strømme JH and Mangschau A. New cardiac markers--clinical benefits in early diagnosis of acute heart disease. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2001; 121(4): 415-420. Norwegian.
- (56) Chandra M, Tschirgi ML, Ford SJ, Slinker BK and Campbell KB. Interaction between myosin heavy chain and troponin isoforms modulate cardiac myofiber contractile dynamics. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(4): 1595-1607.
- (57) Murakami K, Yumoto F, Ohki SY, Yasunaga T, Tanokura M and Wakabayashi T. Structural basis for calcium-regulated relaxation of striated muscles at interaction sites of troponin with actin and tropomyosin. *Adv Exp Med Biol* 2007; 592: 71-86.
- (58) Coulton AT, Koka K, Lehrer SS and Geeves MA. Role of the head-to-tail overlap region in smooth and skeletal muscle beta-tropomyosin. *Biochemistry* 2008; 47(1): 388-397.
- (59) Sharma S, Jackson PG, and Makan J. Cardiac troponins. *J Clin Pathol*. 2004; 57(10): 1025–1026.
- (60) Wu AHB, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, et al. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum following acute myocardial infarction, and comparison of assays for troponin T and I. American Association for Clinical Chemistry Subcommittee on cTnI Standardization. *Clin Chem* 1998; 44:1198–1208.
- (61) Babuin L and Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ*. 2005; 173(10): 1191–1202.

- (62) Wong GC, Morrow DA, Murphy S, Kraimer N, Pai R, James D, et al. Elevations in troponin T and I are associated with abnormal tissue level perfusion: a TACTICS-TIMI 18 substudy. *Treat Angina with Aggrastat and Determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis in Myocardial Infarction*. *Circulation* 2002; 106: 202-207.
- (63) Labugger R, Simpson JA, Quick M, Brown HA, Collier CE, Neverova I, et al. Strategy for Analysis of Cardiac Troponins in Biological Samples with a Combination of Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2003; 49(6): 873 - 879.
- (64) Nørgaard BL, Andersen K, Dellborg M, Thygesen K, Ravkilde J, Abrahamsson P, et al. Long term risk stratification of patients with acute coronary syndromes: characteristics of troponin T testing and continuous ST segment monitoring. *Heart* 2004; 90(7): 739–744.
- (65) Kaul P, Newby LK, Fu Y, Hasselblad V, Mahaffey KW, Christenson RH, et al. Troponin T and quantitative ST-segment depression offer complementary prognostic information in the risk stratification of acute coronary syndrome patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 371-380.
- (66) Diderholm E, Andrén B, Frostfeldt G, Genberg M, Jernberg T, Lagerkvist B, et al. Clinical performance of three cardiac troponin assays in patients with unstable coronary artery disease (a FRISC II substudy). *Am J Cardiol* 2002; 89: 1035-1041.
- (67) Morrow DA, Rifai N, Sabatine MS, Ayanian S, Murphy SA, de Lemos JA, et al. Evaluation of the AccuTnI cardiac troponin I assay for risk assessment in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2003; 49: 1396-1398.
- (68) Kontos MC, Shah R, Fritz LM, Anderson FP, Tatum JL, Ornato JP, et al. Implication of different cardiac troponin I levels for clinical outcomes and prognosis of acute chest pain patients. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 958-965.
- (69) James S, Armstrong P, Califf R, Simoons ML, Venge P, Wallentin L, et al. Troponin T levels and risk of 30-day outcomes in patients with the acute coronary syndrome: prospective verification in the GUSTO-IV trial. *Am J Med* 2003; 115: 178-184.
- (70) Berkwits M, Localio MAR, and Kimmel SE. The Effect of Cardiac Troponin Testing on Clinical Care in a Veterans Population: A Randomized Controlled Trial. *J Gen Intern Med* 2005; 20(7): 584–592.
- (71) Jarva H, Janulczyk R, Hellwage J, Zipfel PF, Björck L and Meri S. *Streptococcus pneumoniae* evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the pspC locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8-11 of factor H. *J Immunol* 2002; 168(4): 1886-1894.
- (72) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP and Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973–979.
- (73) Elkind MSV, Coates K, Tai W, Paik MC, Boden-Albala B, and Sacco RL. Levels of acute phase proteins remain stable after ischemic stroke. *BMC Neurol* 2006; 6: 37.

- (74) Sanchís J, Bodí V, Yacer A, Facila L, Martínez-Brotons A, Insa L, et al. Relación de los valores de proteína C reactiva con los hallazgos angiográficos y los marcadores de necrosis en el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57: 382-387.
- (75) Berton G, Cordiano R, Palmieri R, Pianca S, Pagliara V and Palatini P. C-reactive protein in acute myocardial infarction: association with heart failure. *Am Heart J* 2003; 145: 1094-1101.
- (76) Alonso-Martínez JL, Llorente-Diez B, Echegaray-Agara M, Olaz-Preciado F, Urbieto-Echezarreta M and González-Arencibia C. C-reactive protein as a predictor of improvement and readmission in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002; 4: 331-336.
- (77) James SK, Armstrong P, Barnathan E, Califf E, Lindahl B, Siegbhan A, et al. Troponin and C-reactive protein have different relations to subsequent mortality and myocardial infarction after acute coronary syndrome. A GUSTO-IV substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 916-924.
- (78) Blancke F, Claeys MJ, Jorens P, Vermeiren G, Bosmans J, Wuyts FL, et al. Systemic Inflammation and Reperfusion Injury in Patients With Acute Myocardial Infarction. *J Vrints Mediators Inflamm* 2005; 6: 385–389.
- (79) Libby P, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
- (80) Blake GJ and Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 37S-42S.
- (81) Mueller C, Buettner HJ, Hodgson JM, Marsch S, Perruchoud AP, Roskamm H, et al. Inflammation and long-term mortality after non-ST elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation* 2002; 105: 1412-1415.
- (82) Chung I, Choudhury A, Lip GY. Platelet activation in acute, decompensated congestive heart failure. *Thromb Res* 2007; 120: 709-713.
- (83) Nilsson S, Scheike M, Engblom D, Karlsson LG, Mölsted S, Akerlind I, et al. Chest pain and ischaemic heart disease in primary care. *Br J Gen Pract* 2003; 53(490): 378–382.
- (84) Silver MA, Chairman MD, Alan Maisel MD, Yancy CW, McCullough PA, Burnett JC et al. BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostics, prognostics, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Congestive Heart Failure* 2004; 10 (5) supplement 3: 1-39.
- (85) Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, Martin M, Fogarty A, Morehead A, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 416-422.
- (86) Maisel AS, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Wu AH, Duc P, et al. Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2010-2007.

- (87) Masson S, Vago T, Baldi G, Salio M, De Angelis N, Nicolis E, et al. Comparative measurement of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in ambulatory patients with heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 761-763.
- (88) Wu AH, Smith A, Wiecek S, Mather JF, Duncan B, White CM, et al. Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 628-631.
- (89) Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 161-167.
- (90) Wright SP, Doughty RN, Pearl A, Gamble GD, Whalley GA, Walsh HJ, et al. Plasma amino-terminal pro- brain natriuretic peptide and accuracy of heart-failure diagnosis in primary care: a randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1793-1800.
- (91) Packer M. Should B-type natriuretic peptide be measured routinely to guide the diagnosis and management of chronic heart failure? *Circulation* 2003; 108: 2950-2953.
- (92) Vasan RS, Benjamin EJ, Larson MG, Leip EP, Wang TJ, Wilson PW, et al. Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham heart study. *JAMA* 2002; 288: 1252-1259.
- (93) Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, et al. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004; 350: 655-663.
- (94) Silver MA and Pisano C. High incidence of elevated B-type natriuretic peptide levels and risk factors for heart failure in an unselected at-risk population (stage A): implications for heart failure screening programs. *Congest Heart Fail* 2003; 9: 127-132.
- (95) Groenning BA, Raymond I, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M and Pedersen F. Diagnostic and prognostic evaluation of left ventricular systolic heart failure by plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations in a large sample of the general population. *Heart* 2004; 90: 297-303.
- (96) James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003; 108: 275-281.
- (97) Pfister R, Tan D, Thekkanal J, Erdmann E, Schneider CA. Predictive value of NT-pro-BNP for the non-cardiologist. A study on 573 hospitalized patients with cardiovascular disease. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008; 133(12): 564-569. German.
- (98) Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106: 2913-2918.

- (99) de Lemos JA and Morrow DA. Combining natriuretic peptides and necrosis markers in the assessment of acute coronary syndromes. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4 Suppl 4: S37-S46.
- (100) Gardner RS, Ozal F, Murday AJ, Robb SD and McDonagh TA. N-terminal pro-brain natriurético peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2003; 24: 1735-1743.
- (101) Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, Murphy SA, Demopoulus LA, DiBattiste PM, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST elevation MI: BNP and prognosis in TACTICS-TIMI 18. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1264-1272.
- (102) Jernberg T, Stridsberg M, Venge P and Lindahl B. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 437-445.
- (103) Jernberg T, Lindahl B, Siegbahn A, Andren B, Frostfeldt G, Lagerqvist B, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide in relation to inflammation, myocardial necrosis, and the effect of an invasive strategy in unstable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1909-1916.
- (104) Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, et al. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 2003; 107: 2786-2792.
- (105) Omland T, de Lemos JA, Morrow DA, Antman EM, Cannon CP, Hall C, et al. Prognostic Value of N-terminal Pro-Atrial and Pro- Brain Natriuretic Peptide in Patients with Acute Coronary Syndromes: A TIMI 11B substudy. *Am J Cardiol* 2002; 89: 463-465.
- (106) Cowiea MR, Jourdain P, Maisel A, Dahlstrom U and Follathe F. Revisión de los Usos clínicos del péptido natriurético tipo B (BNP). *Eur Heart J* 2003; 24: 1710-1718.
- (107) de Lemos JA, McGuire DK and Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362: 316-322.
- (108) de Lemos JA and Morrow DA. Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application? *Circulation* 2002; 106: 2868-2870.
- (109) San Miguel A, Inglada-Galiana L, García R, Alonso N and Martín FJ. Soluble CD40 ligand: a potential marker of cardiovascular risk. *Rev Clin Esp.* 2007; 207(8): 418-421. Spanish.
- (110) André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK and Phillips DR. Platelet-derived CD40L. The switch hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 896-899.
- (111) Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, et al. Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 2003; 108: 2776-2782.

- (112) Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, et al. Soluble CD40L risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108: 1049-1052.
- (113) Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348: 1104-1111.
- (114) Blake GJ, Ostfeld RJ, Yucel EK, Varo N, Schönbeck U, Blake MA, et al. Should soluble CD40 ligand be measured from serum or plasma samples?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1130-1131.
- (115) Chung I, Choudhury A, Patel J and Lip GY. Soluble CD40L, platelet surface CD40L and total platelet CD40L in congestive heart failure: relationship to platelet volume, mass and granularity. *J Intern Med* 2008; 263(3): 313-321.
- (116) Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ and Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000; 100(4): 441-448.
- (117) Santilli F, Basili S, Ferroni P and Davi G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med* 2007; 2(4): 256-268.
- (118) Luomala M, Päivä H, Laaksonen R, Thelen K, Lütjohann D, Peltonen N, et al. Plasma-soluble CD40 is related to cholesterol metabolism in patients with moderate hypercholesterolemia. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40(5): 280-284.
- (119) Li J, Zhao SP, Peng DQ and Zhou HN. Changes and relations of soluble plasma CD40L and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with coronary heart disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004; 29(5): 517-520.
- (120) Tanne D, Haim M, Goldbourt U, Boyko V, Reshef T, Adler Y, et al. CD40 ligand and risk of ischemic stroke or coronary events in patients with chronic coronary heart disease. *Int J Cardiol* 2006; 107(3): 322-326.
- (121) Boldt HB and Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17(1): 10-18.
- (122) Sivanandam AS, Mohan S, Kapur S, Kita H, Lau KH, Bagi G, et al. Covalent interaction between proform of eosinophil major basic protein (proMBP) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a cell-mediated event and required for proMBP inhibition of the catalytic activity of PAPP-A. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423(2): 343-350.
- (123) Lund J, Qin QP, Ilva T, Pettersson K, Voipio-Pulkki LM, Porela P, et al. Circulating pregnancy-associated plasma protein A predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation. *Circulation* 2003; 108: 1924-1926.

- (124) Heesch C, Fichtlscherer S and Hamm CW. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) plasma level independently predict outcome in troponin negative patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2003; 108 Suppl 4: 470.
- (125) Khosravi J, Diamandi A, Krishna RG, Bodani U, Mistry J and Khaja N. Pregnancy associated plasma protein-A: ultrasensitive immunoassay and determination in coronary heart disease. *Clin Biochem* 2002; 35: 531-538.
- (126) Li X, Liu Q, Zhou T, Zhao S and Zhou S. PAPP-A: a possible pathogenic link to the instability of atherosclerotic plaque. *Med Hypotheses* 2008; 70(3): 597-599.
- (127) Fialova L, Kalousova M, Soukupova J, Sulkova S, Merta M, Jelinkova E, et al. Relationship of pregnancy-associated plasma protein-A to renal function and dialysis modalities. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27: 88-95.
- (128) Beaudoux JL, Burc L, Imbert-Bismut F, Giral P, Bernard M, Bruckert E, et al. Serum plasma pregnancy-associated protein A. A potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e7-e10.
- (129) Stulc T, Malbohan I, Malik J, Fialova L, Soukupova J and Ceska R. Increased levels of pregnancy associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Am Heart J* 2003; 146: e21.
- (130) Qin QP, Christiansen M and Petterson K. Point-of-care time-resolved immunofluorimetric assay for human pregnancy-associated plasma protein A: use in first-trimester screening for Down's syndrome. *Clin Chem* 2002; 48: 473-483.
- (131) Iversen KK, Teisner AS, Teisner B, Kliem A, Bay M, Kirk V, et al. Pregnancy-associated plasma protein A in non-cardiac conditions. *Clin Biochem* 2008; [Epub ahead of print]
- (132) Leung TY, Sahota DS, Chan LW, Law LW, Fung TY, Leung TN, et al. Prediction of birth weight by fetal crown-rump length and maternal serum levels of pregnancy-associated plasma protein-A in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31(1): 10-14.
- (133) Qin QP, Laitinen P, Majamaa-Voltti K, Eriksson S, Kumpula EK and Petterson K. Release patterns of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in patients with acute coronary syndromes. *Scand Cardiovasc J* 2002; 36(6): 358-361.
- (134) Stejskal D, Lacnák B, Juráková R, Adamovská S, Prosková J, Ochmanová R, et al. First experience with the cobalt binding capacity (ACB) test in the diagnosis of acute coronary syndrome (a pilot study). *Vnitr Lek.* 2004; 50(10): 734-739.
- (135) Emerson JF, Ngo G, and Emerson SS. Screening for Interference in Immunoassays. *Clin Chem* 2003; 49(7): 1163-1169.
- (136) Can M, Demirtas S, Polat O and Yildiz A. Evaluation of effects of ischaemia on the albumin cobalt binding (ACB) assay in patients exposed to trauma. *Emerg Med J* 2006; 23(7): 537-539.

- (137) Wu AHB, Crosby P, Fagen G, Danne O, Frei U, Mockel M, et al. Ischemia modified albumin, free fatty acids, whole blood choline, B-type natriuretic peptide, glycogen phosphorylase BB, and cardiac troponin. *Cardiac markers*, 2nded Totowa: Humana Press; 2003. p. 259-278.
- (138) Aslan D and Apple FS. Ischemia modified albumin: clinical and analytical update. *Lab Med* 2004; 35:1-5.
- (139) Wu AHB. The ischemia-modified albumin biomarker for myocardial ischemia. *MLO Med Lab Obs* 2003; 6: 36-40.
- (140) Aparci M, Kardesoglu E, Ozmen N, Ozcan O, Cebeci BS, Cingozbay BY et al. Prognostic significance of ischemia-modified albumin in patients with acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis* 2007; 18(5): 367-373.
- (141) Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO and Kaski JC. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2003; 107: 2403-2405.
- (142) Quiles J, Roy D, Gaze D, Garrido IP, Avanzas P, Sinha M, et al. Relation of ischemia modified albumin (IMA) levels following elective angioplasty for stable angina pectoris to duration of balloon-induced myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 2003; 92: 322-324.
- (143) Garrido IP, Roy D, Calvino R, Vázquez-Rodríguez JM, Aldama G, Cosin-Sales J, et al. Comparison of ischemia-modified albumin levels in patients undergoing percutaneous coronary intervention for unstable angina pectoris with versus without coronary collaterals. *Am J Cardiol* 2004; 93: 88-90.
- (144) Roy D, Quiles J, Sinha M, Aldama G, Gaze D, Collinson P, et al. Effect of direct-current cardioversion on ischemia-modified albumin levels in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2004; 93: 366-368.
- (145) Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO and Kaski J-C. Role of ischemia modified albumin a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004; 21: 29-34.
- (146) Zapico-Muniz E, Santalo-Bel M, Mercé-Muntanola J, Montiel JA, Martínez-Rubio A and Ordonez-Llanos J. Ischemia-modified albumin during skeletal muscle ischemia. *Clin Chem* 2004; 50: 1063-1065.
- (147) Liyan C, Jie Z, Yonghua W and Xiaozhou H. Assay of ischemia-modified albumin and C-reactive protein for early diagnosis of acute coronary syndromes. *J Clin Lab Anal* 2008; 22(1): 45-49.
- (148) Pollack CV, Peacock FW, Summers RW, Fesmire FM and Holroyd BR. Ischemia-modified albumin (IMA) is useful in risk stratification of emergency department chest pain patients. *Acad Emerg Med* 2003; 10: 555-556.
- (149) Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H, et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem* 2003; 49(4): 581-585.

- (150) Apple FS, Quist HE, Otto AP, Mathews WE and Murakami MM. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. *Clin Chem* 2002; 48: 1097-1100.
- (151) Johnson N, Jernberg T, Lindahl B, LindBäck J, Stridsberg M, Larsson A, et al. Biochemical indicators of cardiac and renal function in a healthy elderly population. *Clin Biochem* 2004; 37: 210-216.
- (152) You GY, Zhu Y, Yu JY and Liu XJ. Detection of plasma level of placental growth factor from patients with coronary artery disease. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 38(3): 466-467. Chinese.
- (153) Murakami MM, Doyle PJ and Quist HE. Risk assessment in end stage patients using cardiac troponin T and I, proBNP, and hsCRP measurements. *Clin Chem* 2003; 49: A66.
- (154) Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; 8: 841-849.
- (155) Heeschen C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Berger J, Simoons ML, et al. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *JAMA* 2004; 291: 435-441.
- (156) Barillari G, Albonici L, Franzese O, Modesti A, Liberati F, Barillari P, et al. The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form: implications for tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 152(5): 1161-1166.
- (157) Napoleão P, Santos MC, Selas M, Viegas-Crespo AM, Pinheiro T and Ferreira RC. Variations in inflammatory markers in acute myocardial infarction: a longitudinal study. *Rev Port Cardiol* 2007; 26(12): 1357-1363.
- (158) Persell SD, Lloyd-Jones DM, and Baker QW. Implications of Changing National Cholesterol Education Program Goals for the Treatment and Control of Hypercholesterolemia. *J Gen Intern Med* 2006; 21(2): 171-176.
- (159) Gruñid SM, Cleeman JI, Merz CNB, Bryan CH and Clark LT. Informe de NCEP. Implicaciones de los ensayos clínicos recientes para las pautas nacionales del panel III del tratamiento del adulto del programa de la educación del colesterol. American Heart Association. *J Circulation* 2004; 110: 227-239.
- (160) Siqueira AF, Abdalla DS and Ferreira SR. LDL: from metabolic syndrome to instability of the atherosclerotic plaque. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50(2): 334-343. Portuguese.
- (161) Gazi IF, Tsimihodimos V, Tselepis AD, Elisaf M and Mikhailidis DP. Clinical importance and therapeutic modulation of small dense low-density lipoprotein particles. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7(1): 53-72.
- (162) Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A, et al. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(9): 715-723.

- (163) Lourida ES, Papathanasiou AI, Goudevenos JA and Tselepis AD. The low-density lipoprotein (LDL)-associated PAF-acetylhydrolase activity and the extent of LDL oxidation are important determinants of the autoantibody titers against oxidized LDL in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75(2): 117-126.
- (164) Carlquist JF, Muhlestein JB and Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A₂: a new biomarker for cardiovascular risk assessment and potential therapeutic target. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7(5): 511-517.
- (165) Corsetti JP, Rainwater DL, Moss AJ, Zareba W and Sparks CE. High lipoprotein-associated phospholipase A₂ is a risk factor for recurrent coronary events in postinfarction patients. *Clin Chem* 2006; 52(7): 1331-1338.
- (166) Tselepis AD and Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002; 3: 57-68.
- (167) Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 421-430.
- (168) Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2004; 109: 837-842.
- (169) Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischel G and Meisinger C. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population. Results from the 14-year follow-up of a large cohort from Southern Germany. *Circulation* 2004; 110: 1903-1908.
- (170) Brilakis ES, McConnell JP, Lennon RJ, Elesber AA, Meyer JG and Berger PB. Association of lipoprotein-associated phospholipase A₂ levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J* 2005; 26: 137-144.
- (171) Iribarren C, Gross MD, Darbinian JA, Jacobs DR, Jr, Sidney S and Loria CM. Association of lipoprotein-associated phospholipase A₂ mass and activity with calcified coronary plaque in young adults. The CARDIA study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 216-221.
- (172) Winkler K, Winkelmann BR, Scharnagl H, Hoffmann MM, Grawitz AB, Nauck M, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity indicates angiographic coronary artery disease independently of systemic inflammation and other risk factors. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2005; 111: 980-987.
- (173) Oei HS, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MMB, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke. The Rotterdam study. *Circulation* 2005; 111: 570-575.
- (174) Sato Y, Kita T, Takatsu Y, and Kimura T. Biochemical markers of myocyte injury in heart failure. *Heart* 2004; 90(10): 1110-1113.

- (175) Danne O, Lueders C, Storm C, Frei U and Möckel M. Whole blood choline and plasma choline in acute coronary syndromes: prognostic and pathophysiological implications. *Clin Chim Acta* 2007; 383(1-2): 103-109.
- (176) O'Brien KD, Pineda C, Chiu WS, Bowen R and Deeg MA. Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D is expressed by macrophages in human atherosclerosis and colocalizes with oxidation epitopes. *Circulation* 1999; 99(22): 2876-2882.
- (177) Danne O, Möckel M, Lueders C, Mügge C, Zschunke GA, Lufft H, et al. Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2003; 91: 1060-1067.
- (178) Wu AH. Markers for early detection of cardiac diseases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2005; 240: 112-121.
- (179) Isaacsohn J, Black D, Troendle A and Orloff D. The impact of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines on drug development. *Am J Cardiol* 2002; 89: 45C-49C.
- (180) Fragasso G, Spoladore R, Bassanelli G, Cuko A, Montano C, Salerno A, et al. New directions in the treatment of heart failure: targeting free fatty acid oxidation. *Curr Heart Fail Rep* 2007; 4(4): 236-242.
- (181) Enoksson S, Hagström-Toft E, Nordahl J, Hultenby K, Pettersson N, Isaksson B, et al. Marked reutilization of free fatty acids during activated lipolysis in human skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2): 1189-1195.
- (182) Kleinfeld AM, Kleinfeld KJ and Adams JE. Serum levels of unbound free fatty acids reveal high sensitivity for early detection of acute myocardial infarction in patient samples from the TIMI II trial. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 312.
- (183) Adams JE, Kleinfeld A, Roe M, Yang H, Christenson RH, Davies R, et al. Measurement of levels of unbound free fatty acid allows the early identification of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106 Suppl II: 532.
- (184) Helgadóttir A, Manolescu A, Helgason A, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Gudbjartsson DF, et al. A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. *Nat Genet* 2006; 38(1): 68-74.
- (185) Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(21): 8161-8166.
- (186) Bäck M, Sultan A, Ovchinnikova O and Hansson GK. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ Res* 2007; 100(7): 946-949.

- (187) Schönberger J and Ertl G. Monogenic Heart Disease. *Med Klin* 2008; 103(3): 166-174. German.
- (188) Weber M and Hamm C. Redefinition of Myocardial Infarction - Relevance of Biomarkers. *Herz* 2008; 33(2): 115-121. German.
- (189) Nessler J, Nessler B, Kitliński M, Gackowski A, Piwowarska W and Stepniowski M. Concentration of BNP, endothelin 1, pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-6) and exercise capacity in patients with heart failure treated with carvedilol. *Kardiol Pol* 2008; 66(2): 144-151.
- (190) Khan SQ, Kelly D, Quinn P, Davies JE and Ng LL. Myotrophin is a more powerful predictor of major adverse cardiac events following acute coronary syndrome than N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112(4): 251-256.
- (191) Ng LL, Loke I, O'Brien RJ, Squire IB and Davies JE. Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* 2002; 106: 2877-2880.
- (192) Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S and Yandle TG. Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* 2002; 360: 545-546.
- (193) Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N and Giaid A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002; 359: 1990-1997.
- (194) Nishida H, Horio T, Suzuki Y, Iwashima Y, Kamide K, Kangawa K, et al. Plasma adrenomedullin as an independent predictor of future cardiovascular events in high-risk patients: Comparison with C-reactive protein and adiponectin. *Peptides* 2008; 29(4): 599-605.
- (195) Ng LL, O'Brien RJ, Demme B and Jennings S. Non-competitive immunochemiluminometric assay for cardiotrophin-1 detects elevated plasma levels in human heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 411-416.
- (196) Ng LL, Loke IW, O'Brien RJ, Squire IB and Davies JE. Plasma urocortin in human systolic heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106(4): 383-388.
- (197) Yazici M, Demircan S, Durna K, Yasar E and Sahin M. Relationship between myocardial injury and soluble P-selectin in non-ST elevation acute coronary syndromes. *Cir J* 2005; 69: 530-535.
- (198) Wilson WH, Francis GS, Morrow DA, Newby LK, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Utilization of Cardiac Biomarker Testing in Heart Failure. *Circulation* 2007; 116: e99-e109.
- (199) Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction—2002. *Circulation* 2002; 106: 1893-2000.

- (200) Björk J, Forberg JL, Ohlsson M, Edenbrandt L, Öhlin H, and Ekelund U. A simple statistical model for prediction of acute coronary syndrome in chest pain patients in the emergency department. *BMC Med Inform Decis Mak* 2006; 6: 28.
- (201) Resnic FS, Arora N, Matheny M, and Reynolds MR. A Cost-Minimization Analysis of the Angioseal Vascular Closure Device following Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol* 2007; 99(6): 766-770.
- (202) Hochman JS, Lamas GA, Buller CE, Dzavik V, Reynolds HR, Abramsky SJ, et al. Coronary Intervention for Persistent Occlusion after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2006; 355(23): 2395-2407.
- (203) Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Integration of data derived from biological variation into the quality management system. *Clinical Laboratory Handbook for Patient Preparation and Specimen Handling*. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 13-18.
- (204) Cannon CP. Evidence-based risk stratification to target therapies in acute coronary Syndromes. *Circulation* 2002; 106: 1588-1591.
- (205) Licka M, Zimmermann R, Zehelein J, Dengler TJ, Katus HA, Kübler W, et al. Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size. *Heart* 2002; 87: 520-524.
- (206) Jaffe AS and Katus HA. Acute coronary syndrome biomarkers: the need for more adequate reporting. *Circulation* 2004; 110: 104-106.
- (207) Morrow DA and Braunwald E. Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy. *Circulation* 2003; 108: 250-252.
- (208) Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM and Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* 1999; 45(7): 1104-1121.
- (209) Jishi F, Hudson PR, Williams CP, Jones RP, Davies GK, Yousef ZR, et al. Troponin I, laboratory issues, and clinical outcomes in a district general hospital: crossover study with “traditional” markers of myocardial infarction in a total of 1990 patients. *J Clin Pathol* 2004; 57(10): 1027–1032.
- (210) Christenson RH, Cervelli DR, Bauer RS and Gordon M. Stratus CS cardiac troponin I method: performance characteristics including imprecision at low concentrations. *Clin Biochem* 2004; 37: 679-683.
- (211) Christenson RH, Duh SH, Apple FS, Bodor GS, Bunk DM, Panteghini M, et al. Toward standardization of cardiac troponin I measurements. Part II: Assessing commutability of candidate reference materials and harmonization of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2006; 52: 1685-1692.
- (212) Panteghini M. Standardization of cardiac troponin I measurements: The way forward? *Clin Chem* 2005; 51: 1594-1597.

- (213) Grove ML. Raised cardiac troponins: Troponins seem to be sensitive but not specific. *BMJ* 2004; 329: 111.
- (214) Kristiansen J. The Guide to expression of uncertainty in measurement approach for estimating uncertainty: an appraisal. *Clin Chem* 2003; 49(11): 1822-1829.
- (215) Linnet K and Kondratovich M. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection. *Clin Chem* 2004; 50(4): 732-740.
- (216) Panteghini M and Pagani F. AACC Creatine Kinase MB (CK-MB) Standardization Material Used as Manufacturer's Working Calibrator Is Unable to Harmonize CK-MB Results between Two Commercial Immunoassays. *Clin Chem* 2004; 50(9): 1711 - 1712.
- (217) Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP and Murakami MM. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem* 2003; 49: 1331-1336.
- (218) Roberts WC and Proc HF. Facts and principles learned at the 32nd annual Williamsburg Conference on Heart Disease. *Bayl Univ Med Cent* 2005; 18(2): 141-156.
- (219) Apple FS, Parvin CA, Buechler KF, Christenson RH, Wu AHB and Jaffe AS. Validation of the 99th percentile cutoff independent of assay imprecision (%CV) for cardiac troponin monitoring for ruling out myocardial infarction. *Clin Chem* 2005; 51: 2198-2200.
- (220) Collinson PO and Stubbs PJ. Are troponins confusing?. *Heart* 2003; 89(11): 1285-1287.
- (221) Panteghini M, Linsinger T, Wu AHB, Dati F, Apple FS, Christenson RH, et al. Standardization of immunoassays for measurement of myoglobin in serum. Phase I: Evaluation of candidate secondary reference materials. *Clin Chim Acta* 2004, 341: 65-72.
- (222) Law MR, Wald NJ and Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 326: 1423.
- (223) Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA and Animan EM. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation* 2002; 105: 1760-1763.
- (224) Collinson PO, Stubbs PJ and Kessler AC. The Multicentre Evaluation Of Routine Immunoassay Of Troponin T Study (MERIT). Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T, CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. *Heart* 2003; 89(3): 280-286.
- (225) Bhatia L, Clesham GJ, and Turner DR. Clinical implications of ST-segment non-resolution after thrombolysis for myocardial infarction. *J R Soc Med* 2004; 97(12): 566-570.

- (226) Akkerhuis KM, Alexander JH, Tardiff BE, Boersma E, Harrington RA, Lincoff AM, et al. Minor myocardial damage and prognosis: are spontaneous and percutaneous coronary intervention-related events different? *Circulation*. 2002; 105: 554-556.
- (227) Wu AH, Boden WE and McKay RG. Long-term follow-up of patients with increased cardiac troponin concentrations following percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2002; 89: 1300-1302.
- (228) Devereaux PJ, Goldman L, Yusuf S, Gilbert K, Leslie K and Guyatt GH. Surveillance and prevention of major perioperative ischemic cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery: a review. *CMAJ* 2005; 173(7): 779–788.
- (229) Pearse RM, Dawson D, Fawcett J, Rhodes A, Grounds RM and Bennett ED. The incidence of myocardial injury following post-operative. *Goal Directed Therapy*. *BMC Cardiovasc Disord* 2007; 7: 10.
- (230) Lim W, Qushmaq I, Cook DJ, Crowther MA, Heels-Ansdell D, Devereaux PJ, et al. Elevated troponin and myocardial infarction in the intensive care unit: a prospective study. *Crit Care* 2005; 9(6): R636–R644.
- (231) Forberg JL, Henriksen LS, Edenbrandt L, and Ekelund U. Direct hospital costs of chest pain patients attending the emergency department: a retrospective study. *BMC Emerg Med* 2006; 6: 6.
- (232) Manolio T. Novel risk markers and clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 349: 1587-1589.
- (234) The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined: A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; 21:1502-13.
- (235) Neumeier D, Prellwitz W, Würzburg U et al. Determination of creatine kinase isoenzyme MB activity in serum using immunological inhibition of creatine kinase M subunit activity- Activity kinetics and diagnostic significance in myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1976; 73: 445-451.
- (236) Apple F, Wu A, Mair J, Panteghini M, Tate J et al. Biomarkers for Detection of Ischemia and Risk Stratification in Acute Coronary Syndrome. *Clinical Chemistry*. 2005; 51: 810-824.
- (237) Tan J, Hua Q, Gao J and Fan ZX. Clinical implications of elevated serum interleukin-6, soluble CD40 ligand, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Cardiol*. 2008 Sep;31(9):413-8.

- (238) Empana JP, Canoui-Poitaine F, Luc G, Juhan-Vague I, Morange P et al; PRIME Study Group. Contribution of novel biomarkers to incident stable angina and acute coronary syndrome: the PRIME Study. *Eur Heart J*. 2008 Aug;29(16):1966-74.
- (239) Souza JR, Oliveira RT, Blotta MH and Coelho OR. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. *Arq Bras Cardiol*. 2008 Feb;90(2):86-90. English, Portuguese.
- (240) Kavsak PA, Lee A, Hirte H, Young E and Gaudie J. Cytokine elevations in acute coronary syndrome and ovarian cancer: a mechanism for the up-regulation of the acute phase proteins in these different disease etiologies. *Clin Biochem*. 2008 May;41(7-8):607-10.
- (241) Alwi I, Santoso T, Suyono S, Sutrisna B and Kresno SB. The cut-off point of interleukin-6 level in acute coronary syndrome. *Acta Med Indones*. 2007 Oct-Dec;39(4):174-8.
- (242) Kavsak PA, Ko DT, Newman AM, Palomaki GE, Lustig V et al. Risk stratification for heart failure and death in an acute coronary syndrome population using inflammatory cytokines and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Clin Chem*. 2007 Dec;53(12):2112-8.
- (243) Hartford M, Wiklund O, Mattsson Hultén L, Persson A et al. C-reactive protein, interleukin-6, secretory phospholipase A2 group IIA and intercellular adhesion molecule-1 in the prediction of late outcome events after acute coronary syndromes. *J Intern Med*. 2007 Nov;262(5):526-36.
- (244) Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramires JA et al. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):245-50.
- (245) Pasqui AL, Di Renzo M, Bova G, Maffei S, Pompella G et al. Pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in acute coronary syndromes. *Clin Exp Med*. 2006 Mar;6(1):38-44.
- (246) Pasqui AL, Di Renzo M, Auteri A and Puccetti L. Cytokines in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2005 Dec 7;105(3):355-6.
- (247) Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Aug;32(2):368-72.
- (248) Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y et al. Inflammation and plaque instability. Malpartida F, Vivancos R, Urbano C, Mora J. *Arch Cardiol Mex*. 2007 Oct-Dec;77 Suppl 4:S4-16-22. Spanish.

(249) Tousoulis D, Kampoli AM, Stefanadi E, Antoniadis C, Siasos G et al. New biochemical markers in acute coronary syndromes. *Curr Med Chem*. 2008;15(13):1288-96.

(250) Nakachi T, Kosuge M, Hibi K, Ebina T, Hashiba K et al. C-Reactive Protein Elevation and Rapid Angiographic Progression of Nonculprit Lesion in Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome. *Circ J*. 2008 Dec;72(12):1953-9.

(251) Correale M, Brunetti ND, De Gennaro L and Di Biase M. Acute phase proteins in atherosclerosis (acute coronary syndrome). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008 Oct; 6(4):272-7.

(252) Kosuge M, Ebina T, Hibi K, Ishikawa T, Endo M et al. Value of serial C-reactive protein measurements in non ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Clin Cardiol*. 2008 Sep; 31(9):437-42.

(253) Bali L, Cuisset T, Giorgi R, Monserrat C, Quilici J et al. Prognostic value of ischaemia-modified albumin in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008 Oct; 101(10):645-51.

(254) Shu-Fen Wung and Bradley E. Aouizerat. Candidate genes of the 5-lipoxygenase pathway in acute coronary syndrome: a pilot study. *Biological Research For nursing*. Volume 9 number 4 April 2008, 280-292.