

Biomarcadores en la medicina cardiovascular

José L. Martín-Ventura^a, Luis M. Blanco-Colio^a, José Tuñón^b, Begoña Muñoz-García^a, Julio Madrigal-Matute^a, Juan A. Moreno^a, Melina Vega de Céniga^c y Jesús Egido^a

^aLaboratorio de Patología Vascular. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

^bDepartamento de Cardiología. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

^cDepartamento de Angiología y Cirugía Vascul. Hospital de Galdakao-Usansolo. Galdácano. Vizcaya. España.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo occidental. El proceso patológico que subyace a ellas es un engrosamiento de la pared arterial debido a la formación de placas ateroscleróticas, las cuales se complican frecuentemente con un trombo y pueden dar lugar a síndrome coronario agudo o accidente cerebrovascular. Uno de los mayores retos de la medicina cardiovascular es encontrar la manera de predecir el riesgo de un sujeto de sufrir un evento trombótico agudo.

En las últimas décadas, hay un gran interés en la búsqueda de biomarcadores diagnósticos y pronósticos que puedan ser identificados en sangre. Entre ellos, la proteína C reactiva es la más conocida. Otros, como el ligando de CD40 soluble, pueden predecir eventos cardiovasculares. En cambio, hasta el momento no hay un biomarcador aceptado en la práctica clínica. Actualmente, existen diversas técnicas de alto rendimiento como la proteómica, que permite la detección de múltiples biomarcadores potenciales. Estas aproximaciones pueden identificar en un futuro próximo nuevos biomarcadores que, junto con las técnicas de imagen, pueden ayudar a mejorar la predicción de eventos vasculares agudos.

Palabras clave: Biomarcadores. Aterotrombosis. Proteómica.

Biomarkers in Cardiovascular Medicine

Cardiovascular disease is the principal cause of death in developed countries. The underlying pathological process is arterial wall thickening due to the formation of atherosclerotic plaque, which is frequently complicated by thrombus, thereby giving rise to the possibility of acute coronary syndrome or stroke. One of the major challenges in cardiovascular medicine is to find a way of predicting the risk that an individual will suffer an acute thrombotic event. During the last few decades, there has been considerable interest in finding diagnostic and prognostic biomarkers that can be detected in blood. Of these, C-reactive protein is the best known. Others, such as the soluble CD40 ligand, can be used to predict cardiovascular events. However, to date, no biomarker has been generally accepted for use in clinical practice. At present, there are a number of high-performance techniques, such as proteomics, that have the ability to detect multiple potential biomarkers. In the near future, these approaches may lead to the discovery of new biomarkers that, when used with imaging techniques, could help improve our ability to predict the occurrence of acute vascular events.

Key words: Biomarkers. Atherothrombosis. Proteomics.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo occidental¹. De ellas, la aterosclerosis es el principal motivo de esta

enorme morbimortalidad. El proceso patológico que subyace a esta enfermedad es un engrosamiento de la pared arterial debido a la formación de placas ateroscleróticas². Aunque suelen progresar gradualmente, frecuentemente las placas ateroscleróticas se complican con un trombo y ocasionan una obstrucción brusca de la luz vascular. Según su localización, esta oclusión puede dar lugar a síndrome coronario agudo (SCA) o accidente cerebrovascular (ACV), que pueden ocasionar muerte súbita o dejar graves secuelas a quienes lo sufren. Aunque se producen grandes avances en el tratamiento de esta enfermedad, la medicina actual no es capaz de predecir de manera adecuada quiénes tienen riesgo de sufrir estos problemas. Por ello, uno de los mayores retos de la medicina cardiovascular es encontrar la manera de predecir el riesgo de un sujeto de sufrir un evento trombótico agudo.

Fuentes de financiación: Los artículos de los autores citados en el texto se han realizado con ayudas del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2007/63648, SAF2007-60896), CAM (S2006/GEN-0247), Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Redes RECAVA (RD06/0014/0035), Fundación Ramón Areces, FIS 05/0451 CP04/00060 y European Network (HEALTH F2-2008-200647).

Correspondencia: Dr. J. Egido.
Servicio de Nefrología e Hipertensión. Laboratorio de Patología Vascul. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: Jegido@fjd.es

Durante años, se han utilizado los factores de riesgo cardiovascular para predecir el riesgo de eventos cardiovasculares en la población general, complementándolos con otros datos, como la fracción de eyección. En el caso de pacientes con aterosclerosis sintomática, como en la cardiopatía isquémica, podían añadirse técnicas como la coronariografía para conocer la extensión de la enfermedad. Sin embargo, sigue habiendo una elevada incidencia de eventos isquémicos agudos no esperados, tanto en población con aterosclerosis conocida como en sujetos clasificados como sanos en los que la enfermedad estaba cursando de modo subclínico. En este sentido, uno de los campos de investigación más activos en los últimos años es el uso de la resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada (TC) multicorte. Estas técnicas permiten diagnosticar de modo no invasivo la existencia y la extensión de la aterosclerosis y prometen llegar a una adecuada caracterización del tamaño y la composición de las lesiones. Otro de los grandes campos de investigación en esta área, en el cual nos vamos a centrar, es la búsqueda de biomarcadores diagnósticos y pronósticos que puedan ser identificados en sangre³. La pared vascular libera al torrente sanguíneo moléculas que pueden reflejar los procesos patológicos que tienen lugar en ella. Por otra parte, la propia sangre tiene una participación evidente en la formación de trombos. Así, las concentraciones de moléculas que participan en los diferentes procesos patológicos presentes en la aterosclerosis podrían ser biomarcadores en teoría. Sin embargo, no todas estas moléculas son válidas para tal fin, sino que deben reunir ciertas condiciones. Las características de un biomarcador ideal se muestran en la tabla 1. Aunque la mayoría de los biomarcadores estudiados hasta la actualidad se han basado en la posibilidad de que sean útiles desde el punto de vista diagnóstico/pronóstico, conviene recordar que lo ideal sería además que constituyeran una diana terapéutica. Por último algunos, aunque no tengan valor diagnóstico y terapéutico, nos pueden proporcionar información sobre la génesis y la formación de la placa ateromatosa (fig. 1).

BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES

En este apartado se resumen los biomarcadores más estudiados en cuanto a los distintos mecanismos implicados en el desarrollo y la rotura de la placa aterosclerótica, como la disfunción endotelial, la inflamación, el estrés oxidativo, la proteólisis y la trombosis (fig. 2).

Disfunción endotelial

Entre las causas de disfunción endotelial, se encuentran los factores de riesgo cardiovascular y los

TABLA 1. Características de un biomarcador

Específico	Para una enfermedad en particular
Sensible	Fácilmente cuantificable
Predictivo	Relevante para la progresión de la enfermedad y/o el tratamiento
Sólido	Rápido, simple y con análisis económicos
Estable	Iguals concentraciones a cualquier hora del día
No invasivo	Fácil obtención de muestras (sangre, orina, etc.)
Relevancia preclínica y clínica	Válido en modelos animales/celulares y humanos

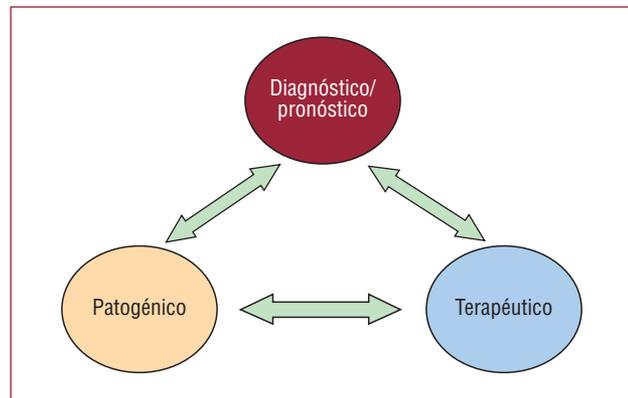


Fig. 1. Tipos de biomarcadores de la enfermedad cardiovascular.

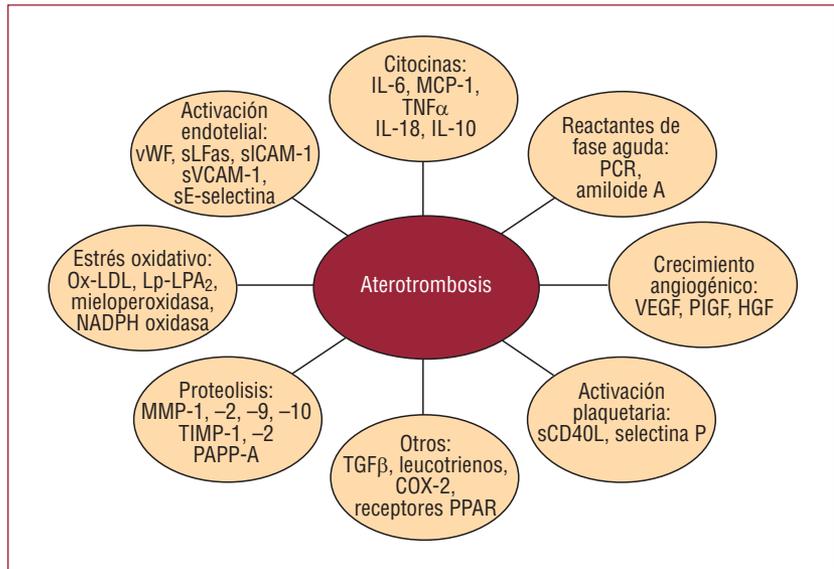
factores hemodinámicos, pues se sabe que el endotelio se daña en los lugares donde hay más turbulencia de la sangre. En particular destaca el papel de los lípidos, ya que el aumento en su concentración plasmática puede llevar a su acumulación en el espacio subendotelial donde, tras sufrir diversas modificaciones, estimulan la expresión de moléculas de adhesión y se inicia el proceso inflamatorio.

Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión son clave en el reclutamiento celular hacia el interior de la pared vascular. Dado que sus formas solubles pueden aparecer en el plasma, diversos trabajos han relacionado sus concentraciones con el riesgo de eventos cardiovasculares.

En poblaciones sanas, la molécula de adhesión ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) muestra mayores concentraciones en sujetos sanos que van a tener un infarto agudo de miocardio (IAM), mientras que con la VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) no se obtuvieron datos similares^{4,5}. En el estudio ARIC (Atherosclerosis in Risk Communities), las concentraciones de ICAM-1 predecían eventos coronarios y el desarrollo de aterosclerosis carotídea, y además, había asociación entre ésta y las concentraciones de selectina E soluble⁶.

Fig. 2. Marcadores circulantes relacionados con la aterosclerosis. COX-2: ciclooxigenasa 2; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IL: interleucina; Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; MMP: metaloproteinasas de matriz; NADPH oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; ox-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; PCR: proteína C reactiva; PIGF: factor de crecimiento placentario; PPAR: receptores de los activadores de la proliferación de peroxisomas; sE-selectina: selectina E soluble; sLFas: ligando de Fas soluble; sICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1 soluble; sVCAM-1: molécula de adhesión a células vasculares-1 soluble; TGF β : factor de crecimiento transformador beta; TIMP: inhibidor de metaloproteinasas de matriz; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; vWF: factor de von Willebrand.



En cuanto a la selectina P, el Women's Health Study mostró que era predictora de eventos cardiovasculares⁷.

En poblaciones con enfermedad coronaria, el estudio Atherogene mostró que las concentraciones de selectina E, ICAM-1 y VCAM-1 eran mayores en los pacientes que sufrieron eventos cardiovasculares⁸. Mulvihill et al⁹ determinaron que la VCAM-1, junto con la proteína C reactiva (PCR), era predictora de eventos cardiovasculares futuros en pacientes con SCA, mientras que ICAM-1 y las selectinas E y P no mostraban ninguna correlación.

Por último, los resultados obtenidos por Malik et al¹⁰ en el British Regional Heart Study son poco alentadores en cuanto al valor pronóstico de las moléculas de adhesión. De los 5.661 varones del estudio, se analizaron muestras de 643 que desarrollaron enfermedad coronaria y 1.278 que permanecieron estables. Basalmente había evidencia de enfermedad coronaria en el 36% de los que tuvieron eventos y el 20% de los que permanecieron estables. Las concentraciones de ICAM-1, VCAM-1 y selectinas E y P no añadieron valor pronóstico al que proporcionaban los factores de riesgo clásicos.

Los datos obtenidos hasta la actualidad acerca del efecto del tratamiento con fármacos hipolipemiantes sobre la concentración plasmática de diferentes moléculas de adhesión son variados. Así, el tratamiento con fluvastatina (80 mg/día) disminuyó las concentraciones plasmáticas de ICAM-1 y selectina P en 26 pacientes hiperlipémicos¹¹. Sin embargo, otros estudios no han confirmado estos resultados. Jilma et al¹² analizaron las concentraciones circulantes de ICAM-1, VCAM-1 y selectina E en 75 pacientes con hipercolesterolemia tratados con tres estatinas diferentes durante 3 meses, y no observaron cambios en las concentraciones plasmá-

ticas de las proteínas analizadas. Cabe destacar que esos estudios se realizaron en poblaciones pequeñas; recientemente se han publicado los resultados del estudio AIM (Atorvastatin on Inflammatory Markers)¹³, en el que se analizaron las concentraciones plasmáticas de ICAM-1 en 1.078 sujetos con alto riesgo cardiovascular. En ese estudio se observó que el tratamiento durante 3 meses con todas las dosis disponibles de atorvastatina (10-80 mg/día) disminuyó las concentraciones de ICAM-1.

Inflamación

Quimiocinas

Una vez que los leucocitos se han adherido a la pared vascular, su entrada al interior está controlada por quimiocinas. Las dos más numerosas son las quimiocinas alfa y beta. Las primeras son quimiotácticas para neutrófilos o linfocitos y entre ellas están las interleucinas (IL). Las quimiocinas beta atraen monocitos y linfocitos, además de basófilos y eosinófilos, aunque no neutrófilos. A esta familia pertenece el MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*).

Interleucina 6

El valor de la IL-6 como predictor de riesgo fue evaluado en el estudio prospectivo de cohortes ABC¹⁴. En sujetos sin enfermedad vascular, los valores de IL-6 circulante eran predictivos de enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca e ictus. En la angina inestable, Biasucci et al¹⁵ demostraron que los pacientes que presentaron muerte, IAM o angina refractaria durante la hospitalización tenían al ingreso concentraciones de IL-6 más elevadas que

los sujetos que permanecieron estables. En otro estudio de angina inestable, ya con 263 pacientes, las concentraciones de IL-6, junto con las de PCR, predecían la posibilidad de muerte coronaria durante un seguimiento de 17 meses y eran aditivos al valor que proporcionaban los marcadores de daño miocárdico¹⁶. En el estudio FRISC II (Fragmin and Fast Revascularisation During Instability in Coronary Artery Disease II trial)¹⁷, 3.269 pacientes con SCA fueron aleatorizados al ingreso a tratamiento invasivo o estrategia conservadora. Los valores de IL-6 eran predictores independientes de mortalidad tras un seguimiento de 12 meses. Además, los pacientes que tenían IL-6 elevada eran los que mostraban beneficio al ser asignados a tratamiento agresivo, por lo que la IL-6 podría servir para guiar el tratamiento a emplear en esta población.

MCP-1

Esta quimiocina es la principal encargada del reclutamiento de monocitos a los tejidos en que hay respuesta inflamatoria activa, como es la lesión aterosclerótica. El valor diagnóstico y pronóstico de MCP-1 soluble se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios. Las concentraciones plasmáticas de MCP-1 se han asociado con diferentes factores de riesgo cardiovascular, así como con un mayor riesgo de sufrir un evento cardiovascular en el futuro^{18,19}. Así en el estudio OPUS-TIMI 16 se analizó su capacidad pronóstica en 2.270 pacientes con SCA sin elevación del segmento ST (SCASEST), y se observó que las concentraciones de MCP-1 predecían el riesgo de muerte o IAM a 10 meses.

Nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento con atorvastatina sola o en combinación con amlodipino reduce las concentraciones de MCP-1 en pacientes con aterosclerosis carotídea^{20,21}. Además, recientemente hemos publicado los resultados del estudio AIM, en los que se observaba que todas las dosis disponibles de atorvastatina son capaces de disminuir las concentraciones plasmáticas de MCP-1 tras 3 meses de tratamiento en sujetos con alto riesgo cardiovascular¹³.

PCR

Sin duda alguna, es el marcador inflamatorio más conocido^{22,23}. En pacientes con angina inestable, las concentraciones de PCR fueron predictoras de inestabilidad cardíaca recurrente²⁴. De forma similar, la PCR parece ser útil en el manejo diagnóstico y pronóstico de la enfermedad arterial periférica²⁵. En pacientes con enfermedad coronaria, la PCR se ha asociado con el riesgo de recurrencia de eventos cardiovasculares^{26,27}. Por otro lado, en algunos es-

tudios en pacientes con IAM, las concentraciones de PCR se correlacionan con el tamaño y la extensión de la necrosis, así como con el pronóstico²⁸. En prevención primaria, diversos estudios han demostrado que las concentraciones basales de PCR son capaces de predecir eventos vasculares²⁹⁻³¹.

Independientemente de la capacidad de la PCR para predecir el riesgo en prevención primaria y secundaria, el interés sobre la PCR ha aumentado debido a que las estatinas son capaces de disminuir sus concentraciones de forma independiente de su efecto hipolipemiante³². En este sentido, en el estudio PROVE IT-TIMI22 (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22)³³, las concentraciones iniciales de PCR obtenidas tras el tratamiento con estatinas tuvieron igual importancia que las de lipoproteínas de baja densidad (LDL) para predecir eventos cardiovasculares. Cabe destacar los resultados del estudio JUPITER, en el cual se analizó el efecto del tratamiento con rosuvastatina (20 mg/día) en 17.802 sujetos aparentemente sanos que presentaban concentraciones de cLDL < 130 mg/dl y PCR sérica > 2 mg/l, con un seguimiento medio de 1,9 años³⁴. En ese estudio, la rosuvastatina disminuyó significativamente la incidencia de eventos cardiovasculares. Sin embargo, es importante notar que el tratamiento con rosuvastatina disminuyó las concentraciones de cLDL por debajo de 55 mg/dl y, por lo tanto, el efecto observado tras el tratamiento podría deberse a la disminución tan drástica observada en la concentración de LDL. En todo caso, hay un gran debate sobre su potencial uso en la práctica clínica^{35,36}.

Estrés oxidativo

LP-PLA2

La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (LP-PLA2) es una lipasa independiente del calcio secretada por leucocitos y está asociada con las LDL circulantes y los macrófagos en la placa aterosclerótica. Junto con la PCR, es el predictor de riesgo cardiovascular más sólidamente estudiado. Se han publicado más de 25 estudios epidemiológicos prospectivos sobre la LP-PLA2 tanto en prevención primaria como en secundaria. Estos estudios clínicos han demostrado generalmente correlaciones sólidas entre concentraciones de LP-PLA2 circulante y el aumento del riesgo de eventos cardiovasculares, incluso después del ajuste multivariable para los factores de riesgo tradicionales. Además la LP-PLA2 es un factor de riesgo independiente y complementario de la PCR³⁷⁻³⁹. Esos estudios han respaldado las recomendaciones de la American Heart Association que indican que la LP-PLA2 po-

dría ser utilizada en la práctica clínica para afinar la predicción de riesgo en sujetos con riesgo cardiovascular intermedio.

La LP-PLA2 ha suscitado también mucho interés como diana terapéutica en la enfermedad coronaria. La LP-PLA2 se localiza en altas concentraciones en el núcleo lipídico de las placas inflamatorias. La LP-PLA2 es secretada por las células inflamatorias en la lesión o la transportan las partículas de LDL. La LP-PLA2 actúa sobre la fosfatidilcolina oxidada (localizada en la parte externa de las LDL oxidadas) para generar lisofosfatidilcolina y ácidos grasos oxidados. Estos dos productos lipídicos bioactivos inducen la expansión del núcleo lipídico y el adelgazamiento de la capa fibrosa. La inhibición selectiva de la LP-PLA2, mediante el tratamiento con darapladib, inhibe la progresión de las lesiones ateroscleróticas coronarias avanzadas en un modelo experimental⁴⁰. En un estudio realizado en 330 pacientes con enfermedad coronaria documentada angiográficamente, la administración de darapladib durante 12 meses previno la expansión del núcleo necrótico, un determinante clave de la vulnerabilidad de la placa⁴¹. Aunque son precisos estudios adicionales, estos datos indican que la inhibición de la LP-PLA2 puede ser un nuevo abordaje terapéutico.

Proteolisis

El desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular es un fenómeno clave en el debilitamiento y la rotura de las placas ateroscleróticas avanzadas. Mientras que la muerte por apoptosis de las células de músculo liso vascular (CMLV) parece ser el principal mecanismo involucrado en la disminución de la síntesis de componentes de la matriz, el incremento de su degradación se ha asociado al aumento en las concentraciones y la actividad de diversas enzimas proteolíticas. De estas enzimas, las metaloproteinasas (MMP) han sido las más estudiadas.

Metaloproteinasas

La mayoría de los factores de riesgo de enfermedad aterosclerótica se han asociado a un aumento en las concentraciones de diversas MMP circulantes, entre otras, la hipertensión⁴² y la diabetes mellitus⁴³. Asimismo, las concentraciones de MMP-9 y del inhibidor TIMP-1 están significativamente aumentadas en pacientes con aterosclerosis carotídea^{44,45} y en pacientes con enfermedad coronaria⁴⁶. También se ha detectado un aumento en las concentraciones de ambos marcadores en pacientes que han sufrido un SCA⁴⁷. En relación con el posible valor pronóstico de las MMP, en prevención

primaria se ha observado que el aumento en la MMP-9 circulante es capaz de predecir eventos cardiovasculares en sujetos sanos⁴⁸. Asimismo, diversos estudios en prevención secundaria han relacionado las concentraciones de MMP-9 elevadas en pacientes con diversas afecciones cardiovasculares con una mayor mortalidad cardiovascular^{49,50}.

Entre las diferentes estrategias terapéuticas empleadas en la aterosclerosis que son capaces de modular las concentraciones de MMP, cabe destacar dos: los trombolíticos y las estatinas. Mientras que los trombolíticos pueden estimular la expresión de MMP y la degradación del colágeno⁵¹, las estatinas disminuyen las concentraciones de MMP-9⁵².

Trombosis

La presencia de estos procesos inmuno-inflamatorio-proteolíticos en la placa aterosclerótica conduce a la desestabilización, la rotura y la consiguiente formación de trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más severas de la aterosclerosis. En el 70% de los enfermos que presentan un SCA ocurre este proceso de rotura de placa. Normalmente se trata de una placa que no estenosa mucho el vaso, contiene grasa y, al producirse una fisura en ella, pone en contacto el núcleo lipídico, rico en factor tisular, con el torrente circulatorio, lo que da lugar a la formación de un trombo que impide el flujo sanguíneo.

CD40/CD40L

Dada la implicación del sistema CD40/CD40L en la aterotrombosis^{53,54}, también se ha intentado analizar si la determinación de sus valores plasmáticos podría proporcionar información pronóstica. Un aumento de CD40L soluble predice un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en mujeres sanas⁵⁵. Sin embargo, la mayor parte de la población que tuvo eventos tenía concentraciones similares a las de quienes permanecieron estables, y la diferencia se debía a un pequeño subgrupo que sí tuvo valores de CD40L claramente más elevados. Por lo tanto, es posible que en mujeres sanas el CD40L soluble pueda distinguir un grupo con especial riesgo de eventos vasculares, pero no a la mayoría.

En pacientes con SCA se ha visto que las plaquetas muestran un incremento de la expresión de CD40L⁵⁶. En el estudio CAPTURE⁵⁷, en el que se evaluaba el uso de abciximab frente a placebo, se analizaron las concentraciones de CD40L en pacientes con SCASEST que iban a ser sometidos a angioplastia. En primer lugar, se observó que los pacientes del grupo placebo con concentraciones de CD40L elevadas tenían más probabilidad de muerte

o infarto no fatal durante los 6 meses siguientes. En segundo lugar, el valor predictivo de CD40L era independiente de las concentraciones de troponina T, ya que —incluso en los que se elevaba este marcador— los valores de CD40L seguían teniendo valor pronóstico. Por último, el abciximab reducía el riesgo de eventos en los sujetos con concentraciones de CD40L soluble elevadas hasta igualarlos con el del grupo que tenía valores bajos, mientras que éstos no se beneficiaban del uso de este bloqueador de los receptores IIB/IIIA. Estos hallazgos podrían estar relacionados con que el CD40L soluble confiere una mayor estabilidad al trombo cuando se une a los receptores plaquetarios IIB/IIIA⁵⁸, por lo que los pacientes con concentraciones mayores se beneficiarían especialmente de los bloqueadores IIB/IIIA. Datos del estudio OPUS-TIMI16 (Orbofiban in Patients with Unstable coronary Syndromes-Thrombolysis In Myocardial Infarction 16), también en SCASEST, confirman el valor predictivo del CD40L independientemente de las concentraciones de PCR y troponina I⁵⁹.

Diferentes trabajos han analizado el efecto del tratamiento hipolipemiente con estatinas en las concentraciones plasmáticas de CD40L. Así, se ha demostrado que el tratamiento con atorvastatina durante 8 semanas disminuye la expresión de CD40L en plaquetas procedentes de sujetos hiperlipémicos⁶⁰. Además, en el estudio ASAP (Atorvastatin versus Simvastatin on Atherosclerotic Progression Study), el tratamiento con atorvastatina (80 mg/día) o simvastatina (40 mg/día) disminuyó las concentraciones plasmáticas de CD40L independientemente de la reducción que se observó en las de colesterol⁶¹. En el estudio MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering), que reclutó a 2.352 pacientes que habían sufrido un SCA, el tratamiento con atorvastatina (80 mg/día) durante 16 semanas disminuyó las concentraciones de CD40L y redujo el riesgo de padecer un nuevo evento vascular en sujetos que se encontraban en el percentil superior (> 90%)⁶². Finalmente, en el estudio AIM, el tratamiento con todas las dosis disponibles de atorvastatina produjo una disminución de las concentraciones de CD40L circulante en los sujetos con alto riesgo cardiovascular que se encontraban en el cuartil superior⁶³. Todos estos estudios indican que el tratamiento hipolipemiente con estatinas es capaz de disminuir las concentraciones de CD40L, probablemente de manera independiente de su acción hipolipemiente.

NUEVOS BIOMARCADORES POTENCIALES

En la búsqueda de nuevos biomarcadores hay dos aproximaciones posibles. La primera es una

aproximación clásica basada en la selección de proteínas implicadas en la fisiopatología de la aterosclerosis, como en los ejemplos revisados en la primera parte de esta revisión. En la segunda, mediante el uso de técnicas de alto rendimiento como la proteómica, no se necesita un conocimiento previo de las proteínas ni de la función que pueden desempeñar en la enfermedad. Con esta aproximación podemos comparar fluidos o tejidos de un paciente con los de un sujeto sano y, a modo de rastreo, ver qué proteínas se expresan de modo diferente en una y otra muestra. Se generan así listados de proteínas potencialmente involucradas en esta enfermedad, entre las cuales debemos seleccionar aquellas cuyas función y/o propiedades indiquen que tienen más probabilidades de ser buenos biomarcadores.

Aproximación clásica

Un ejemplo de esta aproximación es el estudio del sistema Fas/ligando de Fas, perteneciente a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. Tanto Fas como ligando de Fas poseen formas solubles y, mientras que Fas soluble (sFas) se genera por *splicing* alternativo de un único gen^{64,65}, el ligando de Fas soluble (sLFas) se genera mediante la acción de una MMP⁶⁶.

Las concentraciones de sLFas están incrementadas en pacientes con insuficiencia cardíaca, IAM o angina inestable⁶⁷⁻⁶⁹, situaciones agudas en las que las células inflamatorias están muy activadas y podrían aumentar la secreción de esta proteína. Por el contrario, en situaciones crónicas, se ha observado que los pacientes con hiperlipemia familiar combinada o con aterosclerosis carotídea presentan un marcado descenso de las concentraciones de sLFas circulante⁷⁰. La unión de LFas a su receptor produce la activación de la muerte celular programada o apoptosis de la célula que expresa el receptor. Se ha propuesto que la expresión de LFas en algunos tejidos contribuye a un estado de privilegio inmunitario que previene el infiltrado de células inflamatorias, ya que estas células expresan su receptor y, por lo tanto, sufrirían apoptosis cuando entran en contacto con el tejido. En este sentido, se ha demostrado que LFas se produce en las células endoteliales en circunstancias normales y su expresión puede regular negativamente la extravasación celular⁷¹. Estímulos proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), son capaces de disminuir la expresión de LFas en células endoteliales y facilitar la entrada de células inflamatorias en los estadios tempranos del desarrollo de la lesión aterosclerótica. Nuestra hipótesis es que la disfunción endotelial que tiene lugar en estos pacientes podría ser el motivo de estos hallazgos, probable-

Fig. 3. El ligando de Fas (LFas), un potencial biomarcador de disfunción endotelial. El LFas lo producen y liberan las células endoteliales en circunstancias normales y su expresión puede regular negativamente la extravasación celular mediante la inducción de la apoptosis de leucocitos. Cuando el endotelio es disfuncional, distintos estímulos proinflamatorios son capaces de disminuir la expresión y la liberación de LFas por células endoteliales, lo que facilita la entrada de células inflamatorias en los estadios tempranos del desarrollo de la lesión aterosclerótica.

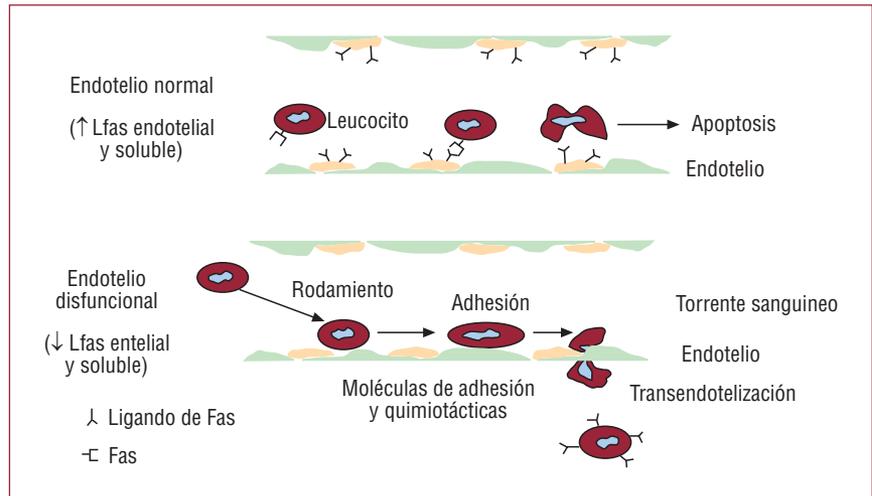
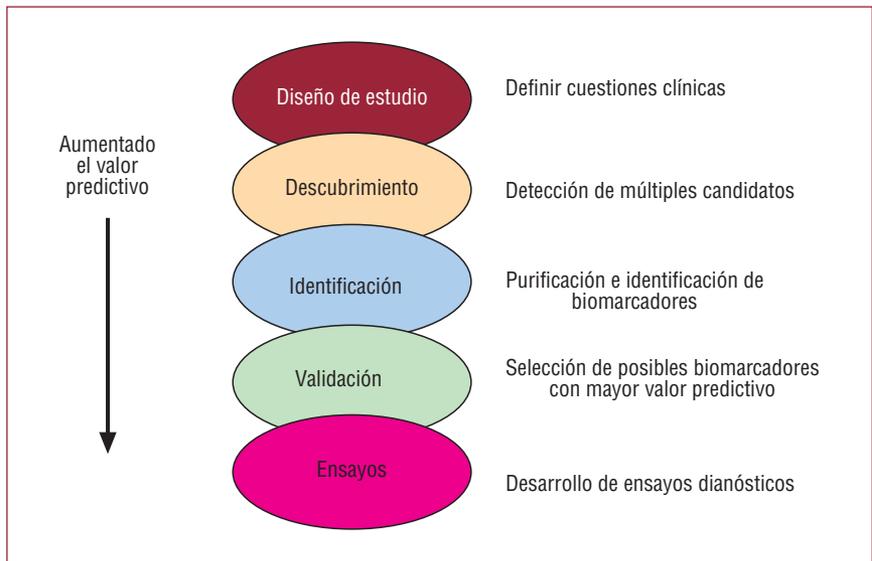


Fig. 4. Cómo identificar un biomarcador.



mente debido a una menor síntesis endotelial y/o una menor liberación a la sangre (fig. 3). Para ello, analizamos las concentraciones de sLFas en 110 pacientes con enfermedad coronaria a los que se determinaba la respuesta vasodilatadora a la hipermia reactiva como un marcador de función endotelial. Observamos que hay una relación lineal entre concentraciones de sLFas e hipermia reactiva, pero no con el flujo en respuesta a la nitroglicerina (respuesta independiente de endotelio), lo que indica que sLFas puede ser un marcador de función endotelial en pacientes con enfermedad coronaria⁷².

Por otro lado, las concentraciones de sFas/sLFas circulantes fueron evaluadas en la población del estudio AIM, el cual reclutó a 1.087 sujetos con alto riesgo cardiovascular. En ese estudio se observó una disminución en las concentraciones de sLFas y un aumento en las de sFas en pacientes con alto

riesgo cardiovascular, lo que indicaría que ambas proteínas pueden ser marcadores tempranos de daño vascular. Desafortunadamente, el estudio no se diseñó para evaluar eventos cardiovasculares debido al corto tiempo de seguimiento, por lo que el valor predictivo de sFas y sLFas debe ser puesto a prueba en estudios futuros⁷³.

La naturaleza compleja del proceso aterotrombótico exige el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan descubrir nuevos mediadores involucrados en dicha enfermedad. Aunque no se revisan aquí por limitaciones de espacio, la genómica y la proteómica pueden ser herramientas clave para la identificación de genes y proteínas que confieran una mayor predisposición a los eventos cardiovasculares. Dentro de esta aproximación, es importante definir cuestiones clínicas concretas para la obtención de biomarcadores específicos de la enfermedad en cuestión (fig. 4).

Aproximación proteómica a la búsqueda de nuevos biomarcadores

A continuación se muestran dos ejemplos de nuevos biomarcadores potenciales obtenidos mediante la aplicación de técnicas proteómicas.

Heat shock proteins (HSP)

Las HSP son una familia de proteínas que están presentes en la mayoría de las células. En el interior celular, las HSP actúan como chaperonas facilitando el ensamblaje correcto de las proteínas, así como la translocación de oligómeros, pero también favoreciendo la eliminación de las proteínas que están dañadas de forma irreversible. Por otro lado, pueden ser secretadas y detectadas en plasma. En distintas enfermedades cardiovasculares, se ha observado que su expresión puede modularse tanto en la lesión como en el plasma^{74,75}. Varios estudios han analizado las cantidades circulantes de distintas HSP. Así, la HSP60 puede ser un marcador de aterosclerosis^{76,77}. Entre las hipótesis del incremento de la HSP60 circulante en aterosclerosis, se ha propuesto su potencial participación en la inmunogenicidad de ciertas bacterias⁷⁸ o en el estrés⁷⁹. Las concentraciones de HSP60 y HSP70 están incrementadas en pacientes que han sufrido un SCA, posiblemente en relación con la necrosis del miocardio^{80,81}. Por el contrario, las de HSP70 se encuentran disminuidas en pacientes con aterosclerosis⁴⁴. Así, un estudio previo analizó el posible valor pronóstico de la HSP70 circulante en pacientes hipertensos, y observó una correlación inversa entre concentraciones de HSP70 y el grosor íntima-media carotídeo⁸². Esos autores propusieron que las concentraciones de HSP70 elevadas podrían reflejar un estado antiaterogénico en los vasos sanguíneos. Posteriormente, se ha observado que el aumento de las concentraciones de HSP70 se asocia con un menor riesgo de enfermedad coronaria y un menor número de vasos afectados⁸³.

Mediante una aproximación proteómica, se ha identificado la HSP27 como una proteína que es secretada en gran cantidad por arterias sanas y cuya secreción disminuye hasta concentraciones casi indetectables a medida que aumenta la complejidad de la placa aterosclerótica. Posteriormente, se ha realizado un estudio en el que se evaluaron las concentraciones de HSP27 en un grupo de pacientes con aterosclerosis carotídea y en sujetos sanos de iguales edad y sexo. Las concentraciones de HSP27 circulante estaban significativamente disminuidas en el grupo de pacientes respecto al grupo control⁸⁴ (fig. 5). Aunque estos datos preliminares deben ser validados en un grupo más amplio de pacientes y en diversos estadios de la enfermedad cardiovascular,

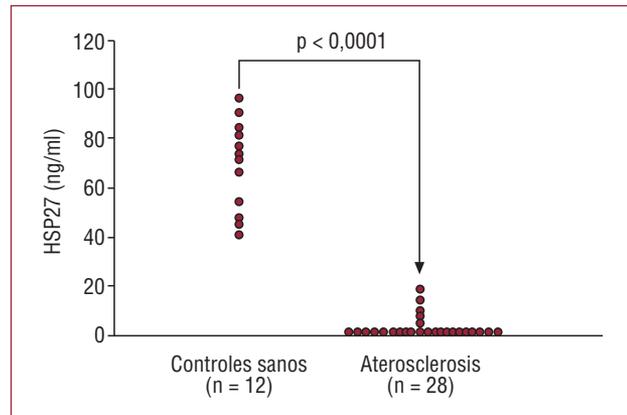


Fig. 5. La HSP27, un potencial biomarcador diagnóstico de aterosclerosis. Concentraciones plasmáticas de HSP27 en pacientes con aterosclerosis carotídea (n = 28) y controles sanos (n = 12). Con permiso de *Circulation*⁸⁴.

indican que las bajas concentraciones de HSP27 podrían servir como un marcador diagnóstico de enfermedad aterosclerótica avanzada. En cambio, su posible valor pronóstico sólo se ha probado en un estudio en el que se compararon las concentraciones basales de HSP27 de 225 mujeres del Women's Health Study que durante un seguimiento de 6 años sufrieron eventos cardiovasculares y 225 mujeres que no los sufrieron. En ese estudio prospectivo, las concentraciones basales de HSP27 no se asociaron con la aparición de eventos cardiovasculares⁸⁵.

TWEAK

El factor de necrosis tumoral inductor débil de apoptosis (*tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* [TWEAK, Apo3L, TNFSF12]) pertenece a la superfamilia del TNF⁸⁶. Se considera que esta superfamilia es una fuente de dianas terapéuticas que pueden ser útiles en el manejo de enfermedades complejas. Estas citocinas están implicadas en múltiples respuestas biológicas como la inflamación, la respuesta inmunitaria y la reparación tisular⁸⁷. Los ligandos de esta familia se expresan como proteínas transmembrana tipo II que, en muchos casos, pueden ser procesadas en proteínas secretadas de menor tamaño con actividad biológica^{88,89}. Cada ligando se puede unir a uno o más miembros de la superfamilia del TNF, muchos de los cuales son proteínas transmembrana tipo I o III^{88,89}. Una vez que el ligando se une al receptor, se activan diferentes cascadas de señalización que promueven múltiples respuestas biológicas.

TWEAK se expresa ampliamente en diferentes tejidos como páncreas, intestino, corazón, cerebro, pulmón, ovario y músculo esquelético, y en menor medida en hígado y riñón⁸⁶⁻⁹⁰. Hay diferentes indicios de que esta proteína puede estar implicada en

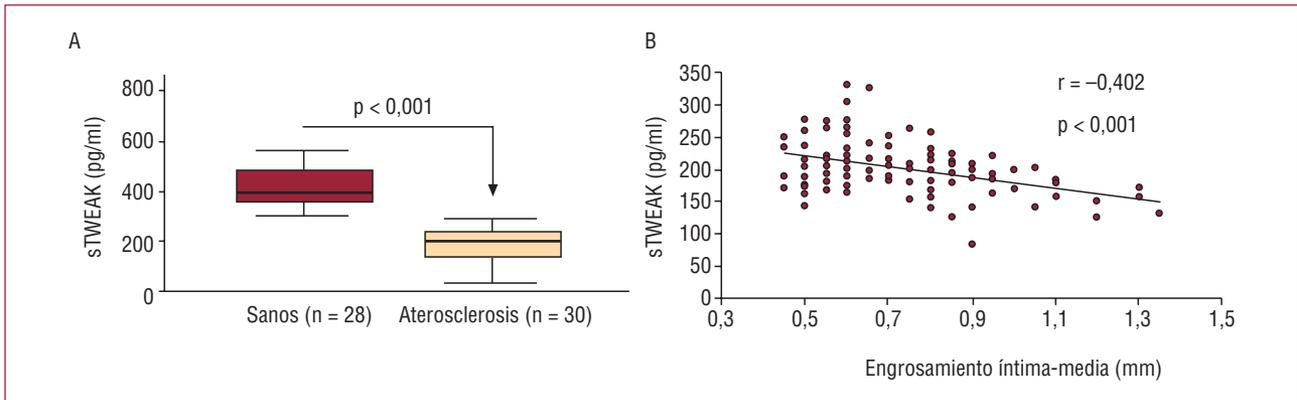


Fig. 6. TWEAK, un biomarcador de aterosclerosis subclínica. Las concentraciones plasmáticas de *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK) están disminuidas en pacientes con aterosclerosis (estenosis carotídea > 70%) (A) y se correlacionan negativamente con el grosor íntima-media carotídeo en sujetos asintomáticos (n = 106) (B). Con permiso de Arterioscler Thromb Vase Biol¹⁰⁰.

la patogenia de diferentes enfermedades como aterosclerosis, ictus, artritis reumatoide, daño renal autoinmunitario, daño renal agudo y cáncer^{91,92}. Dependiendo del tipo celular analizado, TWEAK es capaz de estimular proliferación⁹³, supervivencia⁹⁴, migración⁹⁵, crecimiento celular⁹⁶ y apoptosis⁸⁶. Además, puede promover⁹¹ o inhibir⁹⁷ la diferenciación celular. Finalmente, TWEAK es capaz de inducir la expresión de múltiples proteínas proinflamatorias^{98,99}.

Usando la tecnología de SELDI-TOF, se ha identificado TWEAK soluble (sTWEAK) como un potencial marcador de aterosclerosis que es secretado por arterias sanas en mayor medida que por placas ateroscleróticas¹⁰⁰. La cuantificación de sTWEAK en plasma mostró que sus concentraciones están disminuidas en pacientes con aterosclerosis carotídea respecto a los sujetos sanos. Finalmente, el sTWEAK mostró una correlación inversa con el cociente íntima-media en pacientes asintomáticos, lo que indica que esta proteína puede ser un marcador de aterosclerosis subclínica (fig. 6). Estos resultados han sido confirmados posteriormente por Kralisch et al¹⁰¹, quienes observaron que los sujetos con enfermedad renal crónica o con diabetes mellitus tipo 2, dos cuadros relacionados con alto riesgo de enfermedad cardiovascular, presentaban concentraciones de sTWEAK circulante reducidas.

Además, recientemente se ha demostrado que las concentraciones plasmáticas de sTWEAK predicen mortalidad total y cardiovascular en sujetos sometidos a hemodiálisis¹⁰². Estos resultados fueron más evidentes cuando las concentraciones plasmáticas de sTWEAK se combinaban con un estado inflamatorio del sujeto (aumento en la concentración plasmática de IL-6). Todos estos resultados parecen indicar que sTWEAK puede ser un nuevo biomarcador diagnóstico y pronóstico de aterosclerosis.

CONCLUSIONES

La predicción del riesgo cardiovascular es uno de los grandes desafíos de la medicina moderna. Entre los biomarcadores clásicos revisados, además de los datos de la PCR, los mejores resultados corresponden al ligando de CD40, tanto por su independencia de otras variables como por tratarse de moléculas que participan en la fisiopatología de la aterotrombosis. En este sentido, las concentraciones de CD40L soluble parecen ser más eficaces para valorar el riesgo en situaciones agudas que en prevención primaria. Sin embargo, aún falta estandarización en las determinaciones, y las concentraciones varían claramente de unos estudios a otros. Éste es uno de los factores que hay que solucionar para poder abordar el uso del CD40L como marcador de riesgo en la práctica clínica habitual.

La búsqueda de nuevos biomarcadores mediante técnicas proteómicas permitirá conocer nuevas proteínas que tengan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Esas proteínas deberán tener poca variabilidad y se debe poder analizarlas con técnicas estándar y con bajo coste económico y de tiempo. Finalmente, el uso de un conjunto de biomarcadores (multimarcador) dará más información del grado de afección del individuo, así como de su pronóstico y su respuesta a un tratamiento. La utilización de estos multimarcadores, en combinación con técnicas de imagen no invasivas, podría dar en el futuro la llave para prevenir las enfermedades cardiovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

- Murray CJ, López AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet*. 1997;349:1269-76.

2. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesteolemia and inflammation as partner in crime. *Nat Med.* 2002;11:1211-7.
3. Vivanco F, Martín-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco-Colio L, Dardé VM, et al. Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2005;4:1181-91.
4. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet.* 1998;351:88-92.
5. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-43.
6. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1997;96:4219-25.
7. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation.* 2001;103:491-5.
8. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:1336-42.
9. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules. *Heart.* 2001;85:623-7.
10. Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet.* 2001;358:971-6.
11. Romano M, Mezzetti A, Marulli C, Ciabattini G, Febo F, Di Ienno S, et al. Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide. *J Investing Med.* 2000;48:183-9.
12. Jilma B, Joukhar C, Derhaschnig U, Rassoul F, Richter V, Wolzt M, et al. Levels of adhesion molecules do not decrease after 3 months of statin therapy in moderate hypercholesterolaemia. *Clin Sci.* 2003;104:189-93.
13. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, De Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration. *Am Heart J.* 2007;153:881-8.
14. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation.* 2003;108:2317-22.
15. Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuffi AG, Ginnetti F, et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first two days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation.* 1999;99:2079-84.
16. Koukkunen H, Penttilä K, Kemppainen A, Halinen M, Penttilä I, Rantanen T, et al. C reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med.* 2001;33:37-47.
17. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA.* 2001;286:2107-13.
18. Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto J de P, Morrow DA, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1812-8.
19. De Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;107:690-5.
20. Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Blanco-Colio LM, Martín-Conejero A, Madrigal-Matute J, Vega M, et al. Treatment with amlodipine and atorvastatin has additive effect on blood and plaque inflammation in hypertensive patients with carotid atherosclerosis. *Kidney Int Suppl.* 2008;S71-4.
21. Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gómez-Hernández A, Muñoz-García B, Vega M, Serrano J, et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke.* 2005;36:1796-800.
22. Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47 Suppl:C19-31.
23. Casas JP, Shah T, Hingorani AD, Danesh J, Pepys MB. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med.* 2008;264:295-314.
24. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation.* 1999;99:855-60.
25. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation.* 1998;97:425-8.
26. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet.* 1997;349:462-6.
27. Retterstol L, Eikvar L, Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K. C-reactive protein predicts death in patients with previous premature myocardial infarction—a 10-year follow-up study. *Atherosclerosis.* 2002;160:433-40.
28. Ueda S, Ikeda U, Yamamoto K, Takahashi M, Nishinaga M, Nago N, et al. C-reactive protein as a predictor of cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1996;131:857-60.
29. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003;107:363-9.
30. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation.* 1999;99:237-42.
31. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-65.
32. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol And Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 1999;100:230-5.
33. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med.* 2005;352:20-8.
34. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JP, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated c-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008;359:2195-207.

35. Ridker PM. C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:2129-38.
36. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004;350:1387-97.
37. Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A (2): An independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention. *Am J Cardiol.* 2008;101:F23-33.
38. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *J Am Cardiol.* 2008;10:F51-7.
39. Lerman A, McConell JP. Lipoprotein-associated phospholipase A2: A risk marker or a risk factor. *Am J Cardiol.* 2008;101:F11-22.
40. Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER 3rd, Hamamdizic D, Burgert ME, Li J, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat Med.* 2008;14:1059-66.
41. Serruys PW, García-García HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, et al. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A (2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation.* 2008;118:1172-82.
42. Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: A substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens.* 2004;17:764-9.
43. Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 2004;109:2850-6.
44. Martín-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM, Egido J, Rossignol P, Meilhac O, et al. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis.* 2007;194:334-41.
45. Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Bernard M, Foglietti MJ, Chapman MJ. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2003;169:139-46.
46. Noji Y, Kajinami K, Kawashiri MA, Todo Y, Horita T, Nohara A, et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39:380-4.
47. Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 2001;141:211-7.
48. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *Q J Med.* 2002;95:787-96.
49. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. for the AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;107:1579-85.
50. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation.* 2003;107:598-603.
51. Host NB, Hansen SS, Jensen LT, Husum D, Nielsen JD. Thrombolytic therapy of acute myocardial infarction alters collagen metabolism. *Cardiology.* 1994;85:323-33.
52. Koh KK, Son JW, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Choi YM, et al. Comparative effects of diet and statin on NO bioactivity and matrix metalloproteinases in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:e19-23.
53. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1931-6.
54. Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res.* 2001;89:1092-103.
55. Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation.* 2001;104:2266-8.
56. Garlich CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart.* 2001;86:649-55.
57. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2003;348:1104-11.
58. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med.* 2002;8:247-52.
59. 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;108:1049-52.
60. Hwang YS, Tsai WC, Lu YH, Lin CC, Chen YF. Effect of atorvastatin on the expression of CD40L and P-selectin in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2004;94:364-6.
61. Semb AG, Van Wissen S, Ueland T, Smilde T, Waehre T, Tripp MD, et al. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:275-9.
62. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Sasiela WJ, Szarek M, et al. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study. *Circulation.* 2004;110:386-91.
63. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, De Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. Atorvastatin decreases elevated soluble CD40L in subjects at high cardiovascular risk. Atorvastatin on inflammatory markers study: a substudy of ACTFAST. *Kidney Int.* 2008;74:S60-3.
64. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JC, Braeur MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994;263:1759-62.
65. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991;66:233-43.
66. Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med.* 1995;182:1777-83.
67. Toyozaki T, Hiroe M, Saito T, Iijima Y, Takano H, Hiroshima K, et al. Levels of soluble Fas in patients with myocarditis, heart failure of unknown origin, and healthy volunteers. *Am J Cardiol.* 1998;81:798-800.
68. Yamaguchi S, Yamaoka M, Okuyama M, Nitoube J, Fukui A, Shirakabe M, et al. Elevated circulating levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1999;83:1500-3.

69. Shimizu M, Fukuo K, Nagata S, Suhara T, Okuro M, Fujii K, et al. Increased plasma levels of the soluble form of Fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:585-90.
70. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Sol JM, Díaz C, Hernández G, Egido J. Decreased circulating Fas ligand in patients with familial combined hyperlipidemia or carotid atherosclerosis: normalization by atorvastatin. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1188-94.
71. Sata M, Walsh K. TNF- α regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat Med.* 1998;4:415-20.
72. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Tuñón J, García-Camarero T, Berrazueta JR, Egido J. Soluble Fas ligand plasma levels are associated with forearm reactive hyperemia in subjects with coronary artery disease: a novel biomarker of endothelial function? *Atherosclerosis.* 2008;201:407-12.
73. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, De Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk: Atorvastatin on Inflammatory Markers (AIM) study, a substudy of ACTFAST. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:168-74.
74. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1547-59.
75. Pockley AG. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002;105:1012-7.
76. Pockley AG, Wu R, Lemme C, Kiessling R, De Faire U, Frostegard J. Circulating HSP60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension.* 2000;36:303-7.
77. Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Serum soluble HSP60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation.* 2000;102:14-20.
78. Rothenbacher D, Hoffmeister A, Bode G, Miller M, Koenig W, Brenner H. Helicobacter pylori heat shock protein 60 and risk of coronary heart disease: a case control study with focus on markers of systemic inflammation and lipids. *Atherosclerosis.* 2001;156:193-9.
79. Lewthwaite J, Owen N, Coates A, Henderson B, Steptoe A. Circulating human heat shock protein 60 in the plasma of British civil servants: relationship to physiological and psychosocial stress. *Circulation.* 2002;106:196-201.
80. Zhang X, He M, Cheng L, Chen Y, Zhou L, Zeng H, et al. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk of coronary heart disease in Chinese. *Circulation.* 2008;118:2687-93.
81. Dybdahl B, Slørdahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart.* 2005;91:299-304.
82. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, De Faire U, Frostegard J. Serum HSP70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension.* 2003;42:235-8.
83. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D, Zalles-Ganley A, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1055-9.
84. Martín-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel JB, et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation.* 2004;110:2216-9.
85. Kardys I, Rifai N, Meilhac O, Michel JB, Martín-Ventura JL, Buring JE, et al. Plasma concentration of heat shock protein 27 and risk of cardiovascular disease: a prospective, nested case-control study. *Clin Chem.* 2008;54:139-46.
86. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu Y, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:32401-10.
87. Foster D, Parrish-Novak J, Fox B, Xu W. Cytokine-receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nature Rev Drug Discov.* 2004;3:160-70.
88. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104:487-501.
89. Bodmer J, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2002;27:19-26.
90. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashekenazi A. Identification of a ligand for the death-domain containing receptor Apo3. *Curr Biol.* 1998;8:525-8.
91. Zheng TS, Burkly LC. No end in site: TWEAK/Fn14 activation and autoimmunity associated end-organ pathologies. *J Leukocyte Biology.* 2008 [en prensa].
92. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:173-8.
93. Donohue PJ, Richards CM, Brown SA, Hanscom HN, Buschman J, Thangada S, et al. TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:594-600.
94. Jakubowski A, Browning B, Lukashev M, Sizing I, Thompson JS, Benjamin CD, et al. Dual role for TWEAK in angiogenic regulation. *J Cell Sci.* 2002;115:267-74.
95. Tran NL, McDonough WS, Donohue PJ, Winkles JA, Berens TJ, Ross KR, et al. The human Fn14 receptor gene is up-regulated in migrating glioma cells in vitro and overexpressed in advanced glial tumors. *Am J Pathol.* 2003;162:1313-21.
96. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:241-9.
97. Xu H, Okamoto A, Ichikawa J, Ando T, Tasaka K, Masuyama K, et al. TWEAK/Fn14 interaction stimulates human bronchial epithelial cells to produce IL-8 and GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318:422-7.
98. Kim SH, Kang YJ, Kim WJ, Woo DK, Lee Y, Kim DI, et al. TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J.* 2004;68:396-9.
99. Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S. TWEAK induces NF- κ B p100 processing and long lasting NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 2003;278:36005-12.
100. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Meilhac O, Michel JB, Páramo J, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:916-22.
101. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lössner U, Blüher M, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 2008;199:440-4.
102. Carrero JJ, Ortiz A, Qureshi AR, Martín-Ventura JL, Bárány P, Heimbürger O, et al. Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:110-8.