

# Aterosclerosis: biomarcadores plasmáticos emergentes

## *Atherosclerosis: emerging plasma biomarkers*

► Silvia Benozzi<sup>1\*</sup>, Raúl Ignacio Coniglio<sup>2\*\*</sup>

1. Magister en Bioquímica.
2. Doctor en Bioquímica Clínica (UBA).

\* Cátedra de Bioquímica Clínica I, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.

\*\* Instituto Bioquímico Clínico Integral. Viedma, Río Negro, Argentina.

### Resumen

La aterosclerosis y sus complicaciones trombóticas son causa de un significativo número de muertes cada año. Aunque los factores de riesgo principales son conocidos, éstos no explican la totalidad de los casos en que se presenta la enfermedad y existe considerable interés por introducir nuevos marcadores. Estos podrían ser utilizados en la prevención, diagnóstico, pronóstico, monitoreo del tratamiento y predicción de la recurrencia de la enfermedad. Los objetivos de este trabajo son describir la fisiopatología de la aterosclerosis y los biomarcadores plasmáticos emergentes. Se han identificado biomarcadores plasmáticos de: inflamación, activación de la célula endotelial, estrés oxidativo, crecimiento angiogénico, activación plaquetaria, trombosis y también apolipoproteínas, lipoproteínas y otras moléculas, algunos de los cuales podrían ser útiles en un futuro próximo. Sin embargo, deben conocerse aspectos vinculados con la información pre-analítica, analítica y post-analítica para cada uno de ellos antes de su utilización. La proteína C reactiva y la apolipoproteína B son dos probables incorporaciones para la práctica clínica, aunque todavía se necesitan considerables esfuerzos para lograr un consenso sobre su utilización. Será necesario optimizar el uso de los biomarcadores para evitar el aumento de los costos en la detección y manejo de la enfermedad.

**Palabras clave:** aterosclerosis \* fisiopatología \* biomarcadores \* riesgo coronario \* enfermedad cardiovascular \* predictores

### Summary

*Atherosclerosis and its prothrombotic complications are the cause of a significant number of deaths each year. Although the principal risk factors are known, they do not explain all the cases in which this disease is present, and there is considerable interest to introduce new markers. They could be used in prevention, diagnosis, prognosis, monitoring of treatment, and prediction of recurrence of the disease. The objectives of this work are to describe: a) the physiopathology of atherosclerosis and; b) the emerging plasma biomarkers. Plasma biomarkers of inflammation, activation of endothelial cell, oxidative stress, angiogenic growth, platelet activation, thrombosis have been identified, as well as apolipoproteins, lipoproteins and other molecules, some of them could be useful in the near future. However,*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

*aspects related with pre-analytical, analytical and post-analytical procedures must be known before using them. C-reactive protein and the apolipoprotein B are two likely incorporations for the clinical practice, although it is still necessary to get a consensus about their application. It will be necessary to optimize the use of biomarkers to avoid the increase in cost in the detection and assessment of the disease.*

**Key words:** *atherosclerosis \* physiopathology \* biomarkers \* coronary risk \* cardiovascular disease \* predictors*

## Abreviaturas

CE	Células endoteliales	IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
C-HDL	Colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad	INF- $\gamma$	Interferón gamma
C-LDL	Colesterol transportado por las lipoproteínas de baja densidad	IR	Insulino-resistencia
CML	Células musculares lisas	LDL	Lipoproteína de baja densidad
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	LT	Linfocitos T
EAP	Enfermedad arterial periférica	MC	Macrófagos
EC	Enfermedad coronaria	NF-kB	Factor nuclear kappa B
ECV	Enfermedad cardiovascular	NO	Oxido nítrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad	PGE2	Prostaglandina E2
IAM	Infarto agudo de miocardio	SCA	Síndrome coronario agudo
		VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

## Introducción

La enfermedad aterosclerótica y sus complicaciones trombóticas son la base fisiopatológica de un amplio espectro de enfermedades cardiovasculares. En Argentina y en América latina las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en adultos y su gran incidencia puede ser explicada por la alta prevalencia de factores de riesgo (1). La detección de sujetos en riesgo sin signos o síntomas clínicos, como medida preventiva, disminuye los costos de la atención médica y mejora la calidad de vida. El laboratorio bioquímico-clínico participa activamente en esta tarea y la incorporación de mejores biomarcadores de riesgo contribuirá a aumentar la eficacia del mismo. Los objetivos de este trabajo son: a) describir la fisiopatología de la aterosclerosis; b) describir los biomarcadores plasmáticos emergentes.

## Fisiopatología de la aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inmune inflamatoria crónica de la pared arterial (2) en cuya génesis están involucrados factores genéticos y hábitos de vida. Desde el punto de vista clínico tiene dos fases evolutivas: una etapa inicial de formación del ateroma y otra de trombosis de la placa ya formada.

El desarrollo de la aterosclerosis depende de la acción conjunta de tres tipos celulares localizados en la pared arterial: CE, CML y células inmunes (monocitos/MC, LT) (3).

El primer paso en la formación del ateroma es la disfunción endotelial, caracterizada por la disminución de la biodisponibilidad de NO (4), y es el resultado de la injuria provocada por diversos factores (IR, hiperlipoproteinemia, DM2, hipertensión arterial, flujo turbulento, hipercolesterolemia, hipoxia y otros). El daño ocasionado conduce a la modificación fenotípica de las CE (5) que a través de la activación del factor de transcripción nuclear NF-kB (6) inducen la expresión de genes que codifican un gran número de moléculas activas.

La oxidación de LDL en el subendotelio es clave en la injuria vascular (7). Las partículas de LDL, transportadas en caveolas a través de las CE, se acumulan en la íntima vascular, donde son susceptibles de sufrir oxidación, glicosilación, acetilación, enriquecimiento en triglicéridos, etc., que incrementan su aterogenicidad y favorecen su reconocimiento por los receptores "basureros" (*scavenger*). Las partículas de LDLox tienen gran número de efectos aterogénicos (8), aunque también otras lipoproteínas tales como VLDL, IDL y Lp(a) tienen efectos similares (9) (10). A las partículas de HDL, en cambio, se les asigna un papel protector de la aterogénesis por su participación en el transporte reverso de colesterol y por sus propiedades antiinflamatorias (8).

Las lipoproteínas oxidadas y mínimamente oxidadas infiltradas en el espacio subendotelial, estimulan a las células de la íntima a producir citoquinas pro inflamatorias capaces de activar a los monocitos circulantes y factores quimiotácticos para los mismos; como consecuencia, los monocitos ruedan sobre la superficie laminar del endotelio y se adhieren a las CE activadas. Una vez adheridos

a las CE los monocitos migran, por diapédesis transendotelial mediada por moléculas de adhesión, hacia el subendotelio (11). Atrapados en la pared arterial, los monocitos se transforman en MC y estos comienzan a interactuar con otras células infiltradas a través de la producción de factores quimiotácticos, de crecimiento, del complemento, de la coagulación, citoquinas y enzimas proteolíticas (12).

En el espacio subendotelial los MC se transforman en células espumosas como consecuencia de la activación de la transcripción de receptores "basureros" que promueven la internalización de lipoproteínas modificadas (13) y conducen a la acumulación intracelular de ésteres de colesterol, aunque podría existir un mecanismo alternativo para la acumulación de colesterol en los MC (11).

En un proceso mediado por citoquinas y factores de crecimiento producidos por células presentes en la íntima arterial se induce la migración de las CML desde la media hacia la íntima, donde proliferan y cambian su fenotipo de elástico a secretor, un hecho crucial para la resistencia mecánica del ateroma (14). Por su parte, los LT activados secretan citoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la activación de monocitos, CML y CE (6).

Los procesos descritos conducen a la formación de la estría grasa, compuesta por un núcleo de células espumosas, monocitos y linfocitos, en torno al cual comienzan a multiplicarse las CML que secretan elastina, colágeno y glucosaminoglicanos responsables de la formación de la capa fibrosa. En este ciclo inflamatorio complejo las CE y CML liberan citoquinas para reclutar monocitos y MC, en tanto que los LT secretan citoquinas que favorecen la apoptosis de las células que participan de este proceso, inhiben la secreción de colágeno por CML e inducen a los MC y células espumosas a producir metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (enzimas proteolíticas responsables del remodelado de la matriz extracelular). Las células apoptóticas pueden, a su vez, inducir la activación de genes pro inflamatorios (15). Se asegura así la formación de un ateroma rico en MC que si incrementa su tamaño, puede debilitarse y romperse (16).

La ruptura de la placa es el resultado de la interacción dinámica entre cambios intrínsecos de la placa (vulnerabilidad) y fuerzas extrínsecas impuestas sobre ella (disparadores). La erosión del endotelio o la ruptura y desgarramiento de la cubierta de la placa pone en marcha el mecanismo de trombosis, ligado a los factores de crecimiento secretados por las células de la placa y a los componentes trombogénicos del ateroma: colágeno y el núcleo lipídico, con un alto contenido de factor tisular catalíticamente activo (17).

Simultáneamente con la activación de la vía intrínseca de la coagulación y la exposición del colágeno fibrilar del subendotelio, se produce la adhesión de las plaquetas, que al activarse se agregan y degranulan liberando sustancias vasoconstrictoras, citoquinas y factores de creci-

miento (6). Las plaquetas activadas expresan en su superficie el CD40L, que al unirse con su receptor presente en células B, monocitos, MC y CE, desencadenan múltiples reacciones inflamatorias (12), contribuyendo así al proceso aterotrombótico. La ruptura de la placa es frecuentemente asintomática y no siempre resulta en un evento clínico. No obstante, la ruptura de la placa de ateroma con o sin trombos es común en pacientes que mueren de ECV.

## Biomarcadores plasmáticos emergentes de aterosclerosis

El conocimiento adquirido en la fisiopatología de la aterosclerosis ha estimulado la investigación de numerosos biomarcadores con el fin de utilizarlos en la prevención, diagnóstico, pronóstico, monitoreo del tratamiento y predicción de recurrencia de la enfermedad.

El término "factores de riesgo para la aterosclerosis" fue empleado por primera vez por el Dr. William Kannel en el año 1961 (18). La identificación de parámetros cuantificables que se correlacionan con aterosclerosis es útil para establecer el riesgo del paciente y los blancos terapéuticos (19). La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial en la que los factores de riesgo tienden a agruparse e interactuar en un individuo determinado. Los principales factores de riesgo son: edad (hombres  $\geq 45$  años; mujeres  $\geq 55$  años), historia familiar de EC prematura (antes de los 55 años en padre o hermanos y antes de los 65 años en madre o hermanas), hipercolesterolemia, hipertensión arterial, disminución del colesterol HDL, tabaquismo y diabetes; si bien estos factores constituyen la base de los actuales modelos de predicción de riesgo de ECV, no pueden explicar todos los casos en los que se presenta la enfermedad, por lo que existe un considerable interés por identificar nuevos marcadores de riesgo.

Si bien el término biomarcador (marcador biológico) fue introducido en 1989, recién en el año 2001 el *National Institutes of Health* estandarizó la definición de biomarcador como "una característica objetivamente medible y evaluada como indicadora de procesos biológicos normales, patológicos, o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica" (20). Desde el punto de vista bioquímico son moléculas sistémicas que se pueden determinar en el laboratorio, proteínas, enzimas y/o productos metabólicos que representan directa o indirectamente uno o más procesos biológicos o patológicos activos de un sistema definido o un estado de enfermedad. A fin de comprender la diferencia entre factor de riesgo y biomarcador, es necesario considerar que mientras un factor de riesgo debe estar asociado con la enfermedad y participar en la vía causal que conduce a la misma, un biomarcador está asociado estadísticamente

con la enfermedad pero no se conoce su relación con la causalidad e independencia. Un comité de expertos de EEUU (21) ha definido las contribuciones que debe aportar un biomarcador de ECV para ser incorporado: a) Estar elevado o disminuido en presencia de la enfermedad; b) Existir un fuerte cuerpo de evidencias sobre su asociación con la enfermedad a través de estudios caso-control y prospectivos; c) Demostrar su capacidad discriminante para separar casos de controles; d) Contribuir a mejorar el poder predictor de riesgo de ECV a 10 años calculado con la ecuación de Framingham (Framingham Risk Score) (22).

A continuación se describen algunos biomarcadores emergentes teniendo en cuenta las etapas más significativas que conducen a la formación de la placa aterosclerótica. Se debe tener presente que esta clasificación se elaboró con la finalidad de lograr orden y brindar una mejor comprensión del problema y que algunos biomarcadores pueden participar simultáneamente en varios procesos de la aterogénesis (inflamación, estrés oxidativo, activación endotelial, etc).

#### BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN

*Interleuquina 6 (IL-6)*. Pacientes con SCA han demostrado tener niveles de IL-6 superiores a los de pacientes con angina estable (23), pero los aumentos que se observan no correlacionan con la severidad sino que reflejarían la aterosclerosis presente en el sistema vascular (24).

*Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)*. Numerosos estudios sugieren que MCP-1, como reflejo de la actividad de los MC, puede ser un potencial biomarcador en pacientes con SCA más que en pacientes con EC, debido a su rol en la desestabilización y ruptura de la placa; además, podría ser útil como objetivo terapéutico (25).

*Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )*. El estudio CARE ha demostrado que pacientes con IAM reciente, IAM recurrente o que mueren por IAM tienen niveles de TNF- $\alpha$  superiores a los controles (26).

*Interleuquina 18 (IL-18)*. Esta citoquina es un marcador de inflamación. El estudio PRIME (*Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction*) demostró asociación independiente entre la concentración de IL-18 sérica y futuros eventos coronarios (27). El estudio sugiere que este marcador podría agregar información sobre el pronóstico de la enfermedad a los marcadores tradicionales.

*Interleuquina 10 (IL-10)*. Es una citoquina con propiedades pleiotrópicas. Si bien los estudios son controversiales, el estudio ERA (*Estrogen Replacement and Atherosclerosis Study*) informó que elevadas concentraciones de IL-10 se asocian con un incremento en el riesgo de fu-

turos eventos cardiovasculares en mujeres postmenopáusicas con EC (28).

*Amiloide sérico A*. Se sintetiza en el hígado en respuesta a estímulos inflamatorios. Desplaza a la Apo A1 de las HDL alterando su rol fisiológico. El estudio WISE (*Women's Ischemia Syndrome Evaluation*) halló una relación fuerte e independiente con futuros eventos cardiovasculares (29).

*Proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR-hs)*. La PCR-hs es un reactante de fase aguda, marcador clínico de riesgo cardiovascular y participa directa e indirectamente en numerosas acciones proaterogénicas en el subendotelio vascular, pero su rol en la iniciación y progresión de la aterosclerosis todavía no está esclarecido (30). Los valores de corte son: bajo riesgo, menor de 1,0 mg/L; valores medios, 1,0 – 3,0 mg/L; alto riesgo, mayores de 3,0 mg/L. Las muestras son estables en *freezer* a -20 °C por varios meses (31) (32). Puede determinarse por inmunoturbidimetría, existe material de referencia aprobado para la calibración de métodos y se observó buena concordancia entre los distintos fabricantes. Se ha logrado transferir el valor de PCR-hs del material de referencia (CRM470) a 14 métodos diferentes, lo cual contribuirá a la armonización de los resultados (33). La PCR-hs satisface la precisión (coeficiente de variación interno y externo menor de 10%) y exactitud (menor que  $\pm 10\%$ ), requerida por los paneles científicos de la Asociación Americana del Corazón (AHA) y del Centro para el Control de Enfermedades y Prevención de EEUU (CDC) (34).

La PCR-hs predice independientemente el riesgo coronario y agrega valor pronóstico al *score* de riesgo de Framingham. Los valores de PCR-hs están aumentados en sujetos con síndrome metabólico y correlacionan bien con el número de componentes de éste (35). La PCR-hs y la historia familiar de EC antes de los 60 años han sido incorporadas en el cálculo del riesgo global de EC a 10 años en el denominado "*Reynolds Risk Score*" mejorando la exactitud de la predicción del riesgo en ambos sexos (36). Teniendo en cuenta el efecto antiinflamatorio de los inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (hipocolesterolemiantes denominados estatinas), y utilizando la PCR-hs como biomarcador de inflamación, el Estudio JUPITER (*Justification for the Use of Statins in Primary Prevention*) se propuso determinar si la terapia con Rosuvastatina 20 mg/día podría reducir la tasa de eventos cardiovasculares en personas asintomáticas (no-diabéticas) con C-LDL < 130 mg/dL y PCR-hs  $\geq 2$  mg/dL. Luego de un seguimiento de 4 años sobre 17802 personas (varones  $\geq 50$  años y mujeres  $\geq 60$  años) se redujo la incidencia de EC en 44% y la mortalidad por todas las causas en 20% respecto del placebo (37). Recientemente un panel de expertos de la *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine* estableció que PCR-hs alcanza los criterios establecidos para aceptarla

como un biomarcador para el manejo del riesgo de EC en prevención primaria (21). De todos los marcadores de inflamación es el más aceptado para la prevención primaria de ECV.

#### BIOMARCADORES DE ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA ENDOTELIAL

*Factor de von Willebrand FvW.* FvW es un biomarcador de disfunción endotelial cuya elevada concentración se ha asociado con mortalidad por ECV, EC o *stroke* en sujetos sanos y en pacientes con EC establecida (38-40).

*Molécula de adhesión intercelular 1 soluble (ICAM-1s).* Los niveles circulantes de ICAM-1s liberadas de la superficie endotelial, han sido propuestos como índice de la activación endotelial. Los estudios ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities Study*) y PHS (*Physicians' Health Study*) demostraron que ICAM-1s es un predictor de riesgo de EC. Sin embargo, otros estudios no son coincidentes. Recientemente el *Women's Health Study* demostró que los niveles de ICAM-1s fueron predictores de progresión de aterosclerosis coronaria pero no de IAM o accidente cerebro vascular (41).

*Molécula de adhesión a la célula vascular 1 (VCAM-1).* El incremento de las formas solubles circulantes VCAM-1 se ha vinculado a la EC y EAP (41) (42). Se ha hallado aumentada en individuos con síndrome metabólico juntamente con monocitos CD54, refirmando la propensión para la aterosclerosis en sujetos con este desorden metabólico (43).

*Selectinas.* Selectina P se ha hallado elevada en pacientes con angina estable, inestable, IAM y enfermedad cerebrovascular. Si bien algunos estudios sostienen que selectina P es predictora de eventos cardiovasculares en pacientes con EAP o EC y en mujeres aparentemente sanas, existen discrepancias entre los hallazgos de diversos autores (44). Se ha demostrado que los niveles de selectina E aumentan en pacientes con angina inestable e IAM (45) (46).

#### BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo conduce a la modificación de las LDL y constituye un importante mecanismo de aterogénesis y desestabilización de la placa (47).

*Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox).* LDLox es un biomarcador ligado a los desórdenes de las lipoproteínas y a la inflamación cuyos niveles circulantes se han asociado con la presencia de EC demostrada por angiografía. Algunos estudios prospectivos han demostrado aumento en los niveles de LDLox en pacientes que han muerto por causa cardíaca, o que han sufrido IAM no fatal o angina inestable y se han observado niveles elevados en pacientes con SCA. LDLox es un biomarcador atractivo que podría considerarse un nexo entre los des-

órdenes lipoproteicos e inflamatorios que se producen en la aterosclerosis (48) (49).

*Lipoproteína asociada a fosfolipasa A2 (Lp-PLA2).* Esta lipasa asociada a LDL en suero o plasma es producida por los MC y su expresión aumenta en las lesiones ateroscleróticas (50) (51). Se ha reportado que el aumento de la actividad de Lp-PLA2 se asocia con 3 veces más riesgo de muerte o IAM recurrente. Estudios prospectivos han demostrado que Lp-PLA2 es predictora de EC (52) (53).

*Mieloperoxidasa (MPO).* Esta enzima secretada por neutrófilos activados y monocitos/MC libera ácido hipocloroso, un fuerte oxidante que promueve la formación de radicales libres. Los niveles de MPO se han visto incrementados en sujetos con SCA, en los que tiene valor diagnóstico y pronóstico (54) (55). Sin embargo, para su uso en la clínica es necesaria la estandarización en el manejo de las muestras y en los procedimientos analíticos (56).

*NADPH oxidasas.* Esta familia de enzimas se asocia con aterosclerosis subclínica e intervienen en el estrés oxidativo, disfunción endotelial, inflamación, hipertrofia, apoptosis y migración celular, entre otros procesos (57) (58).

*Isoprostanos.* Los isoprostanos que resultan de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico por radicales libres, pueden ser medidos en suero u orina y podrían ser útiles como marcadores del estrés oxidativo, el cual es difícil determinarlo *in vivo* (59). Se han hallado asociados con ECV, aunque existen inconsistencias entre los estudios realizados (55). Son moléculas estables y se pueden medir con alta sensibilidad y especificidad por cromatografía gaseosa o espectrometría de masas, lo cual restringe las determinaciones a laboratorios de alta complejidad. Los isoprostanos pueden estar aumentados en muchos desórdenes inflamatorios, lo que limita su valor predictivo. Los métodos de ELISA disponibles para realizar esta determinación no tienen la misma precisión y exactitud que los métodos señalados anteriormente. Todavía se requiere más información para su incorporación en la clínica.

#### BIOMARCADORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO ANGIOGÉNICO

*Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).* En pacientes con angina inestable los niveles de VEGF se han correlacionado con el riesgo de mortalidad o IAM independientemente de otros biomarcadores de necrosis cardíaca (60).

*Factor de crecimiento plaquetario (PIGF).* El estudio CAPTURE reveló que los niveles de PIGF son predictores de muerte o IAM no fatal independientemente de otros biomarcadores cardíacos (61).

*Factor de crecimiento del hepatocito (HGF).* Promueve el crecimiento celular y protege de la apoptosis. Aumentos de los niveles circulantes de HGF luego de SCA indican mejoría, aunque se debe considerar que sus niveles aumentan luego de la administración de heparina (62).

*Metaloproteinasas de la matriz (MMPs).* MMP-2 y MMP-9 se hallaron aumentadas en coronarios respecto de los controles (63). MMP-9 se ha informado elevada en pacientes con IM, angina inestable, EC y DM2. Niveles elevados de MMP-9 asociados con disminución en los niveles del inhibidor TIMP-1 se los vincula con aterosclerosis coronaria prematura. Se ha detectado una fuerte asociación entre los niveles de MMP-9 y el riesgo de muerte por ECV. La combinación de las determinaciones de MMP-9 e IL-18 ha resultado de utilidad para identificar pacientes con muy alto riesgo (64). MMP-10 se ha asociado con inflamación y aterosclerosis subclínica (65).

*Inhibidor tisular de la metaloproteinasa.* Las MMP son inhibidas por TIMP y para su actividad requieren de la co-secreción de estos. El estudio ATHEROGENE mostró en pacientes con EC que el aumento de TIMP-1 fue un predictor independiente de muerte cardiovascular (66).

*Proteína A asociada al embarazo.* Es una metaloproteinasa que también se utiliza para el diagnóstico fetal del Síndrome de Down. Se expresa en ambos sexos y aumenta en presencia de placas ateromatosas rotas, pero no en placas estables. Sería útil para estratificar pacientes con SCA (67).

#### BIOMARCADORES DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

*Ligando CD40.* CE, CML y MC presentes en la aterosclerosis expresan el receptor CD40. Las plaquetas originan abundante cantidad del ligando CD40 generando procesos pro-inflamatorios (68). Si bien algunos autores han informado relación entre el aumento de los niveles del ligando CD40 soluble y el incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares (69), otros, en cambio, no han hallado relación entre este biomarcador y aterosclerosis subclínica (70).

#### BIOMARCADORES DE TROMBOSIS

*Factor tisular.* Es sintetizado en el subendotelio por CML y en la adventicia por fibroblastos. Se expresa por la activación por citoquinas de monocitos, plaquetas y CE y se asocia con la trombosis. Esta glicoproteína, que normalmente se expresa en la pared de los vasos, está aumentada en circulación en pacientes con angina inestable y con SCA (71).

*Fibrinógeno.* Se ha informado que es un factor de riesgo independiente de ECV y un marcador de aterosclerosis subclínica asociado con el espesor de la intima-media carotídea (72). Los individuos con niveles de fibrinógeno en el tercil más alto tienen 2,3 veces más

riesgo de ECV respecto del tercil más bajo (73). El valor agregado por la determinación de fibrinógeno a los *scores* de riesgo cardiovascular es bajo y es improbable que sea útil para estudios en población (74). Su medida en la práctica clínica no está recomendada por la insuficiente estandarización de los métodos (21).

*Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1).* PAI-1 es un biomarcador informativo de trombosis y fibrinolisis cuyos niveles elevados son predictores de riesgo cardiovascular en hombres de edad media y que se ha observado aumenta el riesgo de recurrencia de IAM en hombres jóvenes (75).

*Activador tisular del plasminógeno (t-PA).* El antígeno t-PA está asociado con un incremento en el riesgo de IAM en hombres aparentemente sanos y en mujeres posmenopáusicas, pero los resultados de los diferentes trabajos no son coincidentes en la fuerza de la relación luego de ajustar para covariables (76) (77).

*Factor VII y VIII.* La asociación entre los niveles de factor VII y EC es controversial aunque algunos autores lo han hallado predictor independiente (78). Niveles elevados de factor VIII se han vinculado con el aumento de riesgo de ECV (79).

*Dímero D (DD).* Es un marcador de formación y lisis de fibrina en procesos intra y extravasculares. Algunos autores han revelado que DD es un factor de riesgo independiente de mortalidad cardiovascular (80).

*Fibrinopéptido A.* Es un marcador de la actividad de la trombina sobre el fibrinógeno. Tiene una vida media de 3 a 5 minutos en circulación y se dosa en orina. Los niveles excretados son muy variables y por ello no es útil en la práctica clínica (81).

#### BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LOS LÍPIDOS

*Apolipoproteína A-1 y B (Apo A-1)(Apo B).* Estudios longitudinales han demostrado que niveles disminuidos de Apo A-1, como componente marcador de las HDL, es un factor de riesgo independiente y mejor predictor de EC que C-HDL (82). El estudio AMORIS (*Apolipoprotein-Related Mortality Risk Study*) determinó en 175.553 individuos adultos seguidos durante 5,5 años, que Apo B y Apo A-1 fueron excelentes predictores de IAM para cualquier valor de colesterol y triglicéridos en ambos sexos y todas las edades (83). Los marcadores Apo B y Apo A-1 son más informativos que las mediciones de C-LDL y C-HDL respecto del riesgo coronario (84). Se ha mostrado que Apo B posee mejor poder discriminante que los lípidos para la identificación de coronarios y controles (85) y que, junto con triglicéridos fue el más fuerte discriminador de hijos cuyos padres habían sufrido infarto de miocardio antes de los 55 años, comparado con individuos controles (86).

Apo B es componente de todas las lipoproteínas aterogénicas (VLDL, IDL, LDL, Lp(a)) y por cada una de esas partículas se encuentra una molécula de Apo B. Es por ello que la determinación de Apo B informa sobre el número de partículas aterogénicas en circulación. La terapia con inhibidores de la 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas) tiene mayor efecto en la reducción de C-LDL que en el número de partículas LDL, y por lo tanto, Apo B podría proveer mejor información terapéutica que la medida de C-LDL (87).

Los conocimientos actuales indican que la inclusión de Apo B en el panel de lípidos de rutina para la evaluación del riesgo cardiovascular puede mejorar el manejo del paciente. Se ha informado que el coeficiente de variación entre laboratorios se encuentra entre 3,1 – 6,7% (87). El percentil 50 se encuentra en 97 mg/dL, y el percentil 70 en 110 mg/dL. Los valores de corte sugeridos para los objetivos terapéuticos utilizando Apo B, comparados con C-LDL son: Apo B menor de 80 mg/dL equivale a C-LDL menor de 100 mg/dL y Apo B menor de 100 mg/dL equivale a C-LDL menor de 130 mg/dL (89). Presenta la desventaja que todavía no se conoce una ecuación de riesgo que incluya Apo B junto a los demás factores de riesgo mayores. Cambiar de algoritmo en la clínica requiere de educación y podría causar alguna confusión en los médicos y pacientes (88). Un comité de expertos ha sugerido recientemente que aunque Apo B es muy buen predictor de EC no debería ser utilizado por ahora para el manejo del riesgo global (Nivel de evidencia B) (21).

Se ha informado que Apo B/Apo A-I se asocia independientemente con el riesgo coronario y fue superior como indicador a CT/C-HDL, C-LDL/C-HDL y C-No-HDL/C-HDL (89). Aunque se asocia independientemente con el riesgo coronario agrega poco valor predictivo al *score* de Framingham (90). Apo B/Apo A-I podría ser utilizado como alternativa a la relación Colesterol total/Colesterol HDL (nivel de evidencia A) (21).

**LDL pequeñas y densas.** El tamaño y el número de partículas de LDL son marcadores predictores de ECV. Las LDL pequeñas y densas son generadas cuando el exceso de triglicéridos en las lipoproteínas VLDL es intercambiado por colesterol esterificado de las LDL y se producen LDL más ricas en triglicéridos (por acción de la proteína de transferencia de colesterol esterificado - CETP). Estas partículas sufren la lipólisis en el hígado por acción de la lipasa hepática y se producen las LDL pequeñas y densas, más oxidables, con mayor penetración en el subendotelio y más aterogénicas. El predominio de partículas pequeñas y densas se ha aceptado como un factor de riesgo emergente por el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (22). El colesterol de LDL pequeñas y densas separadas por ultracentrifugación podría ser un marcador de riesgo cardiovascular y correlaciona bien con el mé-

todo de dosaje por gradiente en gel de poliácridamida (91). Además de este último método, puede utilizarse la resonancia magnética nuclear, pero estas técnicas no son aptas en la práctica clínica. Se necesitan estudios longitudinales para demostrar su asociación independiente con la ECV. Los datos existentes no agregan ventajas en el manejo del riesgo global para la prevención primaria de la EAC (21)

**Lipoproteína (a).** La Lp(a) es un factor de riesgo continuo e independiente con una modesta asociación con el riesgo para EC y accidente cerebrovascular isquémico. Los valores son estables en los individuos durante la vida. No se conoce su rol fisiológico pero puede promover la inflamación, formación de células espumosas y trombosis. La apo (a) presenta numerosas isoformas y la más pequeña está asociada con la EC. La Organización Mundial de Salud aceptó un material de referencia para Lp(a) pero los métodos de dosaje muestran significativa variabilidad en la medida de su concentración sérica. A pesar de las diferencias entre métodos, los individuos que se encuentran en el tercil más alto tienen aumentado el riesgo para EC en aproximadamente 70% respecto de aquellos en el tercil más bajo (92). Se ha sugerido 30 mg/dL para el valor de corte, el cual coincide bien con el percentil 75 hallado en un estudio anterior (92) (93). No está recomendada la determinación en población general y estando restringida para personas con riesgo de ECV y niveles límites de C-LDL y altos de Apo B o en individuos con riesgo global moderado (10%-20%) con dudas en el manejo terapéutico (aspirina o estatinas) o que tienen fuerte historia familiar de EC prematura; en esos casos puede ser útil su determinación aunque existe insuficiente evidencia sobre las ventajas de dosar Lp(a) para monitorear el tratamiento (92) (94).

**Lipoproteínas remanentes.** Anormalidades cualitativas y cuantitativas en las lipoproteínas ricas en triglicéridos están asociadas con la EC (95). La separación de los remanentes para su análisis es difícil. El Estudio Framingham desarrolló un método de separación utilizando anticuerpos y mostró que el contenido de colesterol en los remanentes fue un factor de riesgo independiente para ECV en mujeres, mejor que el contenido de triglicéridos en estas partículas (96).

**Subtipos de HDL.** Las HDL pequeñas y densas, HDL3, tienen un importante rol antiaterogénico y podrían ser un marcador emergente. En presencia de dislipemia aterogénica (hipertrigliceridemia con disminuciones en el C-HDL y presencia de LDL pequeñas y densas) pueden estar disminuidas en circulación y funcionalmente alteradas (menor poder antioxidante y antiinflamatorio). El aumento selectivo de HDL3 podría ser un objetivo terapéutico (97).

LDLox. Ver estrés oxidativo.

## OTROS BIOMARCADORES

**Factor transformante del crecimiento-beta 1 (TGF- $\beta$ 1).** El TGF- $\beta$ 1 es un marcador de la ECV y un posible blanco terapéutico para la misma, pues interviene en el mecanismo de acción de drogas como glitazonas y estatinas (98). TGF- $\beta$ 1 participa en el remodelamiento vascular disminuyendo la relación proliferación/apoptosis.

**Leucotrienos.** Los leucotrienos son mediadores inflamatorios a los que se atribuye un importante rol en la aterosclerosis y sus complicaciones isquémicas (SCA y *stroke*) aunque serán necesarios más estudios experimentales y clínicos para determinar su potencial como biomarcadores en ECV (99).

**Ciclooxigenasa 2 (COX-2).** Esta enzima es clave en la generación de prostaglandinas pro inflamatorias, como PGE<sub>2</sub> y parece participar en diversas fases de la aterosclerosis. Resultados recientes indican que se han detectado incrementos de PGE<sub>2</sub> en relación con marcadores tradicionales de riesgo ateroesclerótico y es un posible marcador de aterosclerosis subclínica. La posibilidad de modular la actividad de COX-2, o de prostaglandinas derivadas de su efecto, puede representar una nueva alternativa en la prevención y tratamiento de la aterosclerosis (100).

**Homocisteína.** Está asociada con aumento en el riesgo de ECV. En EEUU se asigna un valor de corte de 15  $\mu$ mol/L pero depende de la metodología y de la región donde se vive. Existen equipos de diagnóstico comerciales, pero su determinación no está aprobada para la población general. Niveles circulantes elevados de homocisteína aumentan el riesgo de enfermedad oclusiva en vasos coronarios, cerebrales y periféricos. Por cada incremento de 5  $\mu$ mol/L de homocisteína en suero el riesgo de EAC aumenta 20%, independientemente de los factores de riesgo tradicionales (101). La hiperhomocisteinemia se puede originar en causas genéticas, déficit de vitaminas B6, B12 o ácido fólico en la alimentación, ciertos medicamentos y también por falla renal. El mecanismo de acción es incierto y se especula que su acción sería a través de generar un estrés oxidativo sobre las CE produciendo una menor biodisponibilidad de NO y desencadenando múltiples procesos proaterogénicos (102)(103).

**Adiponectina.** Esta proteína producida por el tejido adiposo tiene acciones antiaterogénicas y actuaría inhibiendo la formación de la placa ateromatosa en casi todas sus etapas (104). Se ha demostrado que los niveles circulantes elevados de adiponectina están asociados con un bajo riesgo de EC independientemente de otros factores de riesgo conocidos (105).

**Neopterin.** Esta enzima producida por los MC estimulados con INF- $\gamma$  es considerada un marcador de activación monocitos-MC. Varios estudios han establecido

su rol en la EC, revelando que sus niveles están elevados principalmente en pacientes con SCA y tiene valor predictivo para pacientes con SCA y EC estable (106).

## Conclusión

La dimensión, en términos sanitarios, sociales y económicos, de la aterosclerosis explica y justifica el esfuerzo que se está realizando en este campo con el fin de lograr un descenso de su incidencia. El mayor conocimiento sobre la fisiopatología y su relación con las enfermedades cardiovasculares, implica buscar nuevos marcadores que permitan identificar a las personas con riesgo elevado antes que presenten signos o síntomas clínicos, estratificar el riesgo y permitir que se puedan aplicar intervenciones precoces a fin de reducir la morbilidad y mortalidad.

Sin embargo, para incorporar nuevos marcadores a la práctica clínica deberían conocerse aspectos vinculados con la información pre-analítica (preparación del paciente, manejo de la muestra y variación biológica), información analítica (selección y validación de los métodos, límites de detección, sensibilidad, especificidad, imprecisión, exactitud, estandarización, controles y objetivos de calidad, e interferencias) e información post-analítica (límites para las decisiones clínicas, sensibilidad y especificidad diagnóstica, valor predictivo, probabilidad post-*test* y valores de referencia); es decir, su incorporación debe estar basada en la evidencia proporcionada por estudios de diferentes tipos. Además, deberían tener un bajo costo económico y en el caso de utilizarse para la prevención primaria deberían agregar valor predictivo al *score* de evaluación de riesgo cardiovascular, por ejemplo, el de Framingham.

La PCR-*hs* es un biomarcador de inflamación que puede ser incorporado en el futuro para la detección de sujetos en riesgo en la población por agregar valor predictivo al *score* de Framingham y cumplir con los requerimientos basados en la evidencia, aunque requiere de una cuidadosa evaluación por el aumento en los costos que produciría si se incorporara en el *screening*. Otro marcador de riesgo coronario de mucho interés es la apolipoproteína B aunque deberán realizarse considerables esfuerzos para poder consensuar su incorporación en la práctica clínica.

La investigación de biomarcadores para su uso en la prevención, diagnóstico, pronóstico y control terapéutico de la aterosclerosis requiere de acciones coordinadas, pero la incorporación acertada de algunos de ellos permitirá disminuir el riesgo de enfermar o morir por una causa evitable. Será necesario optimizar su uso para evitar el aumento de los costos en el manejo de la enfermedad.



## CORRESPONDENCIA

DR. RAÚL IGNACIO CONIGLIO

Instituto Bioquímico Clínico Integral

Saavedra 372. 8500 VIEDMA. Río Negro. Argentina.

Tel/Fax: 54-02920-421418

E-mail: raulconiglio@speedy.com.ar

## Referencias bibliográficas

1. Schargrodsky H, Escobar MC, Escobar E. Cardiovascular disease prevention: A challenge for Latin America. *Circulation* 1998; 98: 2 103-4.
2. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65(12): S140-6.
3. Mc Intyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 150-8.
4. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
5. Griending KK, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 1996; 10: 283-92.
6. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-81.
7. Rosenfield ME. Oxidized LDL affects multiple atherogenic cellular responses. *Circulation* 1991; 83: 2137-40.
8. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB* 2001; 15: 2073-84.
9. Kawakami A, Yoshida M. Remnant lipoproteins and atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 73-6.
10. Koschinsky ML. Lipoprotein (a) and atherosclerosis: new perspectives on the mechanism of action of an enigmatic lipoprotein. *Curr Atheroscler Rep* 2005; 7(5): 389-95.
11. Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 2006; 37: 208-22.
12. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003; 83: 1069-112.
13. Matsura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 466-86.
14. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247: 349-58.
15. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 2001; 88: 998-1003.
16. Bennett MR. Breaking the plaque: evidence for plaque rupture in animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 713-4.
17. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-71.
18. Kannel WB, Dawber TR, Kagan KA, Rovotskie N, Stokes J. Factors of risk in the development of coronary heart disease. Six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33-50.
19. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, *et al.* Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association's Task Force on Risk Reduction. *Circulation* 1998; 97: 1876-88.
20. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease. Molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006; 113: 2335-62.
21. Myers GL, Christenson RH, Cushman M, Ballantyne CM, Cooper GR, Pfeiffer CM, *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. *Clin Chem* 2009; 55: 378-84.
22. Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Final Report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
23. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286: 2107-13.
24. Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. *Clin Chem* 1999; 45: 1967-73.
25. De Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, Jarolim P, Wiviott SD, Sabatine MS, *et al.* Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2117-24.
26. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94: 1543-53.
27. Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P, Arveiler MD, Ferrières J, Amouyel P, *et al.* Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (PRIME). *Circulation* 2003; 108: 2453-9.
28. Lakoski SG, Liu Y, Brosnihan KB, Herrington DM. Interleukin-10 concentration and coronary heart disease (CHD) event risk in the estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study. *Atherosclerosis* 2008; 197(1): 443-7.
29. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, *et al.* Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: The National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation* 2004; 109: 726-32.

30. Paffen E, deMaat MPM. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res* 2006; 71: 30-9.
31. Ridker PM, Wilson PWF, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation* 2004; 109: 2818-25.
32. Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis. From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24-38.
33. Kimberly MM, Caudill SP, Vesper HW, Monsell EA, Miller WG, Rej R, *et al.* Standardization of high-sensitivity immunoassays for measurement of C-reactive protein; II: Two approaches for assessing commutability of a reference material. *Clin Chem* 2009; 55: 342-50.
34. Nakamura M, Sato S, Shimamoto. Establishment of external quality control program for hs-PCR and three-year follow-up of the performance for precision and accuracy. *J Atheroscl Thromb* 2007; 14: 287-93.
35. Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino Sr RB, Wilson PW. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2004; 110: 380-5.
36. Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: The Reynolds Risk Score for Men. *Circulation* 2008; 118: 2243-51.
37. Mora S, Musunuru K, Blumenthal RS. The clinical utility of high-sensitivity C-reactive protein in cardiovascular disease and the potential implication of JUPITER on current practice guidelines. *Clin Chem* 2009; 55: 219-28.
38. Rumley A, Lowe GD, Sweetnam PM, Yarnell JW, Ford RP. Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart study. *Br J Haematol* 1999; 105: 110-6.
39. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995; 332: 635-41.
40. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study investigators. *Circulation* 1999; 100: 736-42.
41. Li YH, Teng JK, Tsai WC, Tsai LM, Lin LJ, Chen J. Elevation of soluble adhesion molecules is associated with the severity of myocardial damage in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; 80: 1218-21.
42. Larsson T, Hallerstam S, Rosfors S, Wallen NH. Circulating markers of inflammation are related to carotid artery atherosclerosis. *Int Angiol* 2005; 24: 43-51.
43. Gomez Rosso L, Benitez MB, Fornari MC, Berardi V, Lynch S, Schreier L, *et al.* Alterations in cell adhesion molecules and other biomarkers of cardiovascular disease in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2008; 199: 415-23.
44. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 2166-79.
45. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Miyao Y, Kaita K, *et al.* Increased plasma level of soluble E-selectin in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2000; 140: 243-8.
46. Atalar E, Aytemir K, Haznedaroglu I, Ozer N, Ovunc K, Aksoyek S, *et al.* Increased plasma levels of soluble selectins in patients with unstable angina. *Int J Cardiol* 2001; 78: 69-73.
47. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part III: Biomarkers of oxidative stress and angiogenic growth factors. *Circulation* 2006; 113: e289-e292.
48. Tsimikas S, Witztum J. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 2001; 103: 1930-2.
49. Tsimikas S, Brilakis E, Miller E, McConnell J, Lennon R, Kornman K, *et al.* Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 353: 46-57.
50. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2479-84.
51. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, Mc Mahon AD, Ford I, Cooney I, *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A (2) as an independent predictor of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2000; 343(16): 1148-55.
52. Mallat Z, Steg PG, Benessiano J, Tanguy AL, Fox KA, Collet JP *et al.* Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1249-57.
53. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1586-93.
54. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98: 9-17.
55. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1586.

56. Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG. Myeloperoxidase: A useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem* 2009; 55: 1462-70.
57. Zalba G, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-dependent superoxide production is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1452.
58. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, *et al.* NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 691-728.
59. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 279-86.
60. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiger AM, Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 524-30.
61. 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: 435-41.
62. Yasuda S, Goto Y, Baba T, Satoh T, Sumida H, Miyazaki S *et al.* Enhanced secretion of cardiac hepatocyte growth factor from an infarct region is associated with less severe ventricular enlargement and improved cardiac function. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 (1): 115-21.
63. Muzzio ML, Miksztowicz V, Brites F, Aguilar D, Repetto EM, Wikinski R, *et al.* Metalloproteinases 2 and 9, Lp-PLA(2) and lipoprotein profile in coronary patients. *Arch Med Res* 2009; 40: 48-53.
64. Altman R. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thromb J* 2003; 1: 4.
65. Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodriguez JA *et al.* C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 (7): 1369-78.
66. Lubos E, Schnabel R, Rupprecht HJ, Bickel C, Messow CM, Prigge S, *et al.* Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Eur Heart J* 2006; 27(2): 150-6.
67. Futterman LG, Lemberg L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. *Am J Crit Care* 2002; 11: 168-72.
68. Schönbeck U, Libby L. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89: 1092-103.
69. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *ACC Curr J Rev* 2003; 12 (3): 12-3.
70. Libby P, James A, de Lemos, Zirlik A, Varo N, Sabina A, *et al.* Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (10): 2192-6.
71. Moons AHM, Levi M, Peters RJG. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 313-25.
72. Páramo JA, Beloqui O, Roncal C, Benito A, Orbe J. Validation of plasma fibrinogen as a marker of carotid atherosclerosis in subjects free of clinical cardiovascular disease. *Haematologica* 2004; 89(10): 1226-31.
73. Kullo IJ, Ballantyne CM. Conditional risk factor for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 219-30.
74. Woodward M, Tunstall-Pedoe H, Rumley A, Lowe GDO. Does fibrinogen add to prediction of cardiovascular disease? Results from the Scottish Heart Health Extended Cohort Study. *Br J Haematol* 2009; 146 (4): 442-6.
75. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 2004; 109 (IV): 6-19.
76. Lowe GD, Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Thomas HF, Elwood PC. Fibrin D-dimer, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and the risk of major ischaemic heart disease in the caerphilly study. *Thromb Haemost* 1998; 79(1): 129-33.
77. Pradhan AD, LaCroix AZ, Langer RD, Trevisan M, Lewis CE, Hsia JA, *et al.* Tissue plasminogen activator antigen and D-dimer as markers for atherothrombotic risk among healthy postmenopausal women. *Circulation* 2004; 110: 292-300.
78. Miller GJ, Ireland HA, Cooper JA, Bauer KA, Morrissey JH, Humphries SE, *et al.* Relationship between markers of activated coagulation, their correlation with inflammation, and association with coronary heart disease (NPHSII). *J Thromb Haemost* 2008; 6: 259-67.
79. Tracy RP, Alice M, Arnold AM, Ettinger W, Fried L, Meilahn E, *et al.* The relationship of fibrinogen and factors VII and VIII to incident cardiovascular disease and death in the elderly arteriosclerosis, thrombosis, and vascular. *Biology* 1999; 19: 1776-83.
80. Lowe GD. Fibrin D-dimer and cardiovascular risk. *Semin Vasc Med* 2005; 5(4): 387-98.
81. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR. Relative value of inflammatory, hemostatic, and rheological factors for incident myocardial infarction and stroke: The Edinburgh Artery Study. *Circulation* 2007; 115: 2119-27.
82. Luc G, Bard JM, Ferrières J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, *et al.* Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: The PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1155-61.
83. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastvelt AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS STUDY): a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2026-33.

84. Parish S, Peto R, Palmer A, Clarke R, Lewington S, O'fer A, *et al.* for the International Studies of Infarct Survival (ISIS) collaborators. The joint effects of apolipoprotein B, apolipoprotein A1, LDL cholesterol, and HDL cholesterol on risk: 3510 cases of acute myocardial infarction and 9805 controls. *Eur Heart J* 2009; 30: 2137-46.
85. Coniglio RI. Factores de riesgo coronario en el sur argentino. El laboratorio bioquímico-clínico en la detección de sujetos de alto riesgo. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, 1993.
86. Rosseneu M, Fruchart JC, Bard JM, Nicaud V, Vinaimont N, Cambien F, *et al.* Plasma apolipoprotein concentrations in young adults with a parental history of premature coronary heart disease and in control subjects. The EARS Study. *European Atherosclerosis Research Study. Circulation* 1994; 89: 1967-73.
87. Sniderman AD. Differential response of cholesterol and particle measures of atherogenic lipoproteins to LDL-lowering therapy: implications for clinical practice. *J Clin Lipidol* 2008; 2: 36-42.
88. Contois JH, McConnell JP, Seit AA, Csako G, Devaraj S, Hoefner DM, *et al.* Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: Position Statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem* 2009; 55: 407-19.
89. Sniderman AD, Furberg CD, Keech A, Roeters van Lennep JE, Frohlich J, Jungner I, *et al.* Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. *Lancet* 2003; 361: 777-80.
90. van der Steeg WA, Boekholdt M, Stein EA, El-Harchaoui K, Stroes ESG, Sandhu MS, *et al.* Role of the apolipoprotein B/Apolipoprotein A-I ratio in cardiovascular risk assessment: A case-control analysis in EPIC-Norfolk. *Ann Intern Med* 2007; 146: 640-8.
91. Berg G, Muzzio ML, Wikinski R, Schreier L. A new approach to the quantitative measurement of dense LDL subfractions. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004; 14: 73-80.
92. Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skarlatos S. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Lipoprotein (a) and Cardiovascular Disease: Recent Advances and Future Directions. *Clin Chem* 2003; 49: 1785-96.
93. Coniglio RI, Selles J, Malaspina MM, Alvarez C. Determinación de lipoproteína (a) por electroinmuno-difusión. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1997; 31(2): 195-203.
94. The emerging risk factors collaboration. Lipoprotein (a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke and nonvascular mortality. *JAMA* 2009; 302: 412-23.
95. Ginsberg HN. Hypertriglyceridemia: new insights and new approaches to treatment. *Am J Cardiol* 2001; 87: 1174-80.
96. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cuppler LA, Wilson PW, Ordovas JM, *et al.* Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001; 154: 229-36.
97. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? *Natur Clin Prac Cardiovasc Med* 2006; 3: 144-53.
98. Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. TGF- $\beta$ 1: a novel target for cardiovascular pharmacology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 279-86.
99. Bäck M. Leukotrienes: potential therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Bull Acad Natl Med* 2006; 190(7): 1511-8.
100. Belouqui O, Páramo JA, Orbe J, Benito A, Colina I, Monasterio A, *et al.* Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: a new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors?. *Eur Heart J* 2005; 26: 153 - 8.
101. Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 1203-12.
102. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ESG, Kastelein JJP, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patients risk assessment. *Circulation* 2004; 109 (III): 5-19.
103. Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *Eur Heart J* 2009; 30: 6-15.
104. Elissondo N, Gómez Rosso L, Maidana P, Brites F. Adiponectina: una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42 (1): 17-33.
105. Giannesi D, Maltinti M, Del Ry S. Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 2007; 56: 459-67.
106. Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, Fruhwald FM, Zweiker R, Watzinger N, *et al.* Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 703-7.

Acceptado para su publicación el 4 de junio de 2010