BIOMARCADORES LIPOPROTEICOS PARA DETERMINAR LA INFLAMACIÓN DE LA PLACA CAROTÍDEA EN ICTUS ISQUÉMICO

Dr. Pol Camps Renom

Institut d'Investigacions Biomèdiques Hospital de la Santa Creu i Sant Pau - IIBHSCSP

1. Resumen

Introducción y justificación del estudio

El ictus representa la primera causa de discapacidad adquirida en nuestro entorno y la segunda causa de muerte. Esta morbimortalidad incrementa con las recurrencias después de haber tenido un primer ictus y, por tanto, la prevención secundaria después de un primer episodio es de gran importancia. Las estrategias médico-quirúrgicas que se pueden aplicar para prevenir recurrencias dependen del tipo y de la causa del ictus. Aproximadamente 1 de cada 5 ictus están causados por placas de ateroma (popularmente llamadas "placas de colesterol") en la arteria carótida interna. En las últimas décadas se ha observado que la inflamación de estas placas es uno de los procesos clave relacionados con la progresión y el riesgo de ictus posterior. Nuestro grupo, en colaboración con otros grupos internacionales, observó que medir la inflamación de las placas de la carótida con una técnica de imagen llamada tomografía por emisión de positrones (PET) predecía a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia después de un ictus y permitía identificar cuáles de ellos podrían beneficiarse de terapias más agresivas, como la cirugía o la colocación de stents. A pesar de estos prometedores resultados, la PET es una técnica cara y escasamente disponible en la mayoría de centros, por lo que parece difícil su implementación generalizada en una patología tan frecuente como el ictus isquémico asociado con placas de ateroma. En este contexto, disponer de marcadores plasmáticos que se asocien a la inflamación medida por PET podría ser de gran utilidad clínica, ya que permitiría realizar un cribado inicial y una monitorización de la respuesta a tratamientos y evitaría realizar PETs innecesarias o de repetición.

Objetivo general del estudio

Estudiar marcadores plasmáticos lipoproteicos e inflamatorios que se correlacionen con el nivel de inflamación de las placas de ateroma carotídeas medida mediante 18-FDG PET en pacientes con ictus isquémico.

Diseño del estudio

Llevamos a cabo un estudio observacional prospectivo de pacientes con ictus isquémico y al menos una placa de ateroma en la arteria carótida interna. El estudio partía de los pacientes reclutados en un estudio paralelo a los que se les realizó una tomografía por emisión de positrones (PET) con 18-FDG de la carótida.

Procedimientos del estudio

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una PET de la carótida con 18-FDG y una analítica en la fase aguda y al año del ictus para determinar marcadores plasmáticos inflamatorios y lipoproteicos. Los marcadores plasmáticos se analizaron mediante técnicas de ELISA, Multiplex, cromatografía y autoanalizador COBAS. Las lipoproteínas se determinaron físico-químicamente y se analizó su efecto en macrófagos en cultivo y carótidas de ratón. A los pacientes se les ha seguido al menos un año y durante el seguimiento se han registrado recurrencias de ictus, otros eventos cardiovasculares y mortalidad.

2. Resultados

En el estudio se incluyeron 91 personas (64 pacientes con ictus isquémico reciente y 27 personas sanas que sirvieron de población de control). A todos los pacientes con ictus isquémico se les siguió una media de 14 meses y se registraron un 18% de recurrencias. Tal como se ha explicado en el apartado "Procedimientos del estudio", a todos los pacientes se les realizó una analítica basal y una al año para medir marcadores plasmáticos inflamatorios y lipoproteicos y estudiar su asociación con las principales variables de estudio (inflamación de la placa de ateroma y recurrencias de ictus). Los principales resultados obtenidos se resumen por puntos a continuación, y en el apartado "Relevancia y posibles implicaciones futuras" se expone su importancia.

- Análisis de biomarcadores con ELISA: Se ha visto que los pacientes con ictus isquémico presentan niveles más altos de LDL oxidada (una forma de colesterol modificado) que los controles sanos y que este aumento es independiente del grado de estenosis de la carótida. Esta mayor presencia de LDL oxidada puede deberse a una liberación de este biomarcador desde la placa de ateroma. También se han encontrado valores de apoJ (un tipo de lipoproteína) aumentados en pacientes con ictus isquémico, la cual también podría provenir de la placa, donde se ha descrito su presencia. También se ha observado un aumento significativo de LRP1 soluble (sLRP1), que se ve incrementado en patologías asociadas con riesgo cardiovascular, en los pacientes con mayores niveles de inflamación en las placas de ateroma carotídeas, y se ha visto que esta asociación es independiente del grado de estenosis y de la obesidad.

- Análisis de biomarcadores con Multiplex: Se han identificado tres marcadores plasmáticos que predicen con elevada sensibilidad el riesgo de encontrar una placa altamente inflamada: sICAM-1, sVCAM-1 y fractalquina. Además, se ha visto que sICAM-1 también predice de forma independiente el riesgo de recurrencia de ictus isquémico.

- Determinación de LDL(-) por cromatografía: Se ha observado que en los pacientes que han tenido un ictus isquémico reciente el porcentaje de LDL(-) no se asocia con el grado de inflamación vista por PET, pero sí se asocia de forma independiente con el grado de estenosis carotídea. Por el contrario, la concentración total de LDL no se encuentra aumentada en los pacientes y no se asocia con el grado de estenosis. Estos interesantes resultados apuntan a que es posible que las formas modificadas de LDL tengan una influencia mayor en la progresión de la aterosclerosis que el total de LDL.

- Ensayos enzimáticos de PON y PAF-AH: Se ha visto que las actividades enzimáticas protectoras de la oxidación acetilhidrolasa del factor plaquetario (PAF-AH) y paraoxonasa (PON) se encuentran disminuidas en los pacientes con ictus. Sin embargo, esto podría deberse a una menor concentración de lipoproteínas en suero de los pacientes, ya que las lipoproteínas son las principales transportadoras de estas enzimas. No se ha encontrado asociación entre estos cambios en la actividad enzimática y la inflamación de las placas de ateroma carotídeas.

- Caracterización de lipoproteínas en carótida de ratón *ex vivo*: Durante el estudio se incubaron carótidas de ratones con suero sanguíneo humano proveniente de pacientes con ictus isquémico y controles sanos. Los resultados muestran que la incubación con suero de controles sanos no produce disfunción endotelial en carótidas de ratón y en cambio sí lo hace el suero de pacientes con ictus isquémico y placas de ateroma en la carótida. Estos resultados nos indican que la disfunción endotelial observada después de la incubación con suero de pacientes está ligada a factores circulantes presentes en estos pacientes que no están en los controles sanos. También se ha visto que la disfunción endotelial observada desaparece mediante la inhibición, tanto no selectiva como selectiva, de las isoformas COX-1 y COX-2.

- Aislamiento y caracterización de lipoproteínas en cultivos celulares: Se han realizado experimentos de incubación de LDL(-) con macrófagos y células endoteliales en cultivo. Se ha observado que en presencia de LDL(-) los macrófagos liberan niveles significativamente más elevados de sICAM-1, sVCAM-1, fractalquina y sLRP1 (que precisamente son los marcadores plasmáticos que hemos encontrado elevados en presencia de placas inflamadas) que cuando se cultivan con la fracción nativa de LDL. Estos resultados nos hacen pensar que proporciones elevadas de LDL(-) promueven la progresión de las placas carotídeas y provocan un estado proinflamatorio crónico dentro de la lesión que en última instancia puede desestabilizarse y provocar una liberación de algunas de las citocinas que encontramos elevadas en el plasma de nuestros pacientes.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

En el presente estudio, financiado gracias a La Marató de TV3, hemos descubierto marcadores plasmáticos inflamatorios y lipoproteicos que se encuentran elevados en pacientes que han sufrido un ictus isquémico y que tienen placas de ateroma en la carótida. Además, hemos observado que algunos de estos marcadores se asocian con la vulnerabilidad de las placas de ateroma carotídeas y que son predictores del riesgo de recurrencia. Por último, hemos visto cómo estos factores plasmáticos inducen inflamación en macrófagos y disfunción endotelial en cultivos y modelos *ex vivo*. Todos estos resultados son relevantes desde distintos puntos de vista.

En primer lugar, hemos descubierto que las concentraciones de sICAM, sVCAM, fractalquina y sLRP1 en pacientes que acaban de sufrir un ictus isquémico predicen el grado de inflamación de las placas de ateroma carotídeas medida con PET. Esto es muy importante, porque en la última década ha quedado patente la gran importancia que tiene la inflamación en el riesgo de recurrencia de los pacientes con ictus y aterosclerosis carotídea. Hasta cinco estudios recientes publicados en revistas de alto impacto han descrito una fuerte asociación entre la inflamación medida con PET y el riesgo de recurrencia de estos pacientes. Sin embargo, la PET es una prueba cara, escasamente disponible en muchos centros, que requiere experiencia para su interpretación y que utiliza radiación ionizante (lo que dificulta su realización de forma seriada). Por tanto, las moléculas descritas en nuestro estudio podrían llegar a

utilizarse en un futuro como cribado para saber qué pacientes son candidatos a realizar una PET o incluso para realizar el seguimiento posterior con medidas seriadas. Por supuesto, de confirmarse su utilidad, permitirían llevar a cabo un manejo de estos pacientes mucho más eficiente en costes. De forma consecuente, en nuestro estudio, a pesar de tener un número de pacientes relativamente reducido, una de estas moléculas (sICAM) predice el riesgo de recurrencia en nuestra cohorte de forma independiente.

En segundo lugar, hemos observado que los pacientes con ictus isquémico y aterosclerosis carotídea, a pesar de tener niveles totales de colesterol y LDL más reducidos respecto a los controles, sobre todo por un uso más generalizado de las estatinas, presentan una mayor proporción de formas modificadas de LDL y de algunas apolipoproteínas como la apoJ. Además, hemos observado que la proporción de LDL(-) en los pacientes es un predictor independiente del grado de estenosis carotídea y en cambio no lo son los niveles totales de LDL (que es lo que actualmente utilizamos para monitorizar a nuestros pacientes). Esto nos indica que es probable que formas modificadas de LDL como LDL(-) tengan un papel más relevante en la génesis y progresión de las placas de ateroma carotídeas que los niveles totales de LDL. Por ello, en un futuro habrá que plantear si es suficiente realizar el seguimiento de estos pacientes a partir de los niveles de LDL total como hasta ahora o debemos empezar a fijarnos en sus propiedades.

En tercer lugar, nuestro estudio aporta conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de la aterosclerosis carotídea. Hemos podido observar cómo la incubación de macrófagos y células endoteliales (dos de los subtipos celulares más fuertemente implicados en la progresión de la aterosclerosis) con LDL(-) genera la secreción de múltiples moléculas inflamatorias, entre las que destaca sICAM (que hemos visto que se asocia con la inflamación y el riesgo de recurrencia). También hemos visto que cuando incubamos modelos de pared arterial *ex vivo* procedentes de ratón con el suero de estos pacientes se induce una disfunción endotelial que no se presenta en los controles. Esto demuestra aún más la implicación que tienen todos estos factores plasmáticos en la disfunción endotelial. Además, hemos observado que la inhibición de isoformas de COX puede revertir este efecto y, por tanto, podríamos estar ante nuevas dianas terapéuticas.

Por último, si miramos el mundo de las enfermedades vasculares con perspectiva, vemos que nos encontramos a las puertas de un cambio de paradigma en el manejo de determinados pacientes con enfermedad aterosclerótica. Y es que en la última década hemos visto que el tratamiento con antiagregantes y estatinas es insuficiente para prevenir las recurrencias y la progresión de la enfermedad en pacientes que tienen un estado proinflamatorio persistente. Por tanto, disponer de marcadores plasmáticos inflamatorios (como sICAM) y lipoproteicos (como la proporción de LDL(-)) directamente relacionados con esta inflamación y progresión de la enfermedad puede tener un gran valor para monitorizar a estos pacientes, medir el efecto de los tratamientos e incluso diseñar nuevas dianas terapéuticas.

4. Bibliografía científica generada

Puig N, Camps-Renom P, Camacho M, *et al. Plasma sICAM-1 as a Biomarker of Carotid Plaque Inflammation in Patients with a Recent Ischemic Stroke.* Trans Stroke Res. 2022; doi:10.1007/s12975-022-01002-x (en línea antes de publicarse). (IF 5.35).

Puig N, Jiménez-Xarrié E, Camps-Renom P, Benítez S. *Search for Reliable Circulating Biomarkers to Predict Carotid Plaque Vulnerability*. Int J Mol Sci. 2020; 21:8236. (IF 4.56).

Puig N, Montolio L, Camps-Renom P, *et al. Electronegative LDL Promotes Inflammation and Triglyceride Accumulation in Macrophages*. Cells. 2020;9(3). (IF 5.66).