



Fundació
La Marató de TV3

21^o SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



MECANISMOS DE FORMACIÓN DEL TROMBO INTRACORONARIO DURANTE EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO CON ELEVACIÓN DE ST EN PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS: UN ABORDAJE INTEGRAL DE LA MORFOLOGÍA DE LA LESIÓN CULPABLE

Àngel Ramon Cequier Fillat

Hospital Universitari de Bellvitge

Sílvia Barceló Batllori

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resumen

Hipótesis

Múltiples mecanismos, tanto locales como sistémicos, están involucrados en la formación del trombo intracoronario que conlleva el infarto agudo de miocardio. Nuestra hipótesis es que el análisis proteómico del trombo intracoronario obtenido de pacientes en la fase aguda del infarto de miocardio y el análisis con imagen intracoronaria de las lesiones responsables podría revelar desencadenantes fisiopatológicos sistémicos y locales de la formación del trombo. La integración de los datos clínicos, proteómicos y de biología de sistemas podría facilitar la identificación de potenciales biomarcadores y nuevas dianas farmacológicas.

Objetivos

Objetivo primario:

Conocer el proceso molecular asociado con la formación de trombos intracoronarios durante el infarto agudo de miocardio (IAM) y su relación con el grado de inestabilidad de la lesión responsable, con el fin de identificar posibles objetivos terapéuticos.

Objetivos secundarios:

1. Identificar la expresión diferencial de las proteínas del trombo intracoronario en el IAM conforme al mecanismo de disrupción de la lesión responsable (ruptura *versus* no ruptura).
2. Integrar los datos clínicos de los pacientes con los datos proteómicos procedentes de los trombos y de los exosomas plasmáticos para determinar la o las variables causantes de los grupos observados.
3. Identificar la expresión proteica diferencial en el IAM según el mecanismo de disrupción de la lesión responsable (ruptura *vs.* no ruptura).
4. Correlacionar el sustrato coronario con los marcadores inflamatorios y los resultados de biología de sistemas.

Metodología

Se han incluido de manera prospectiva 39 pacientes con IAM con elevación del segmento ST entre 50 y 80 años, de menos de 6 horas de evolución desde el inicio de los síntomas y sometidos a angioplastia primaria y tromboaspiración manual. Los trombos intracoronarios aspirados se dividieron en dos partes, una para análisis

histopatológico para confirmar la naturaleza del trombo y otra para su análisis proteómico. Asimismo se extrajeron muestras de sangre intracoronaria y periférica para su análisis. A 20 pacientes se les pudo realizar tomografía de coherencia óptica (OCT) para determinar el posible mecanismo de disrupción de la placa responsable (rotura vs. no rotura –erosión o nódulo cálcico–). Las imágenes de tomografía de coherencia óptica (análisis cuantitativo: área luminal de referencia, área luminal de la lesión, de la longitud del trombo, área de trombos, volumen de trombos total de cada lesión, área luminal mínima y longitud del segmento responsable; y análisis cualitativo: tipo de placa, presencia o ausencia de rotura o erosión, y tipo de trombos) han sido analizadas en un laboratorio centralizado y acreditado.

Análisis proteómico y exosómico.- Las proteínas se extrajeron en urea 7 M, tiourea 2 M y SDS al 2%, y se redujeron y separaron usando el enfoque FASP con tripsina/LysC y los péptidos se limpiaron con microcolumnas de punta superior C18. Finalmente, las soluciones peptídicas limpiadas se secaron y almacenaron a -20 °C y se analizaron por LC-MSMS. Todas las muestras se analizaron en un solo lote con el software Maxquant (1.6.3.4) y el motor de búsqueda incorporado Andromeda. Se clasificaron las muestras en función del número de proteínas cuantificadas. Los exosomas plasmáticos se prepararon y centrifugaron a 1.500 g durante 10 min (4 °C) y más tarde a 10.000 g durante 20 min (4 °C) y se purificaron utilizando las columnas Izon (qEVoriginal / 70 nm). Las proteínas se extrajeron con 150 ml de urea 6 M/bicarbonato de amonio 200 mM y se precipitaron. El precipitado limpio resultante fue resuspendido en urea 6 M/Tris-HCl 0,1 M, agitado en vórtex y baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Las proteínas fueron separadas y cuantificadas con tripsina/Lys-C y eliminadas las sales en los péptidos con columnas C18. Los péptidos resultantes se analizaron por LC-MSMS, como para los trombos.

Se recogieron todas las características clínicas y periprocedimiento de los pacientes y se realizó un seguimiento clínico de un año.

2. Resultados obtenidos

Análisis de características clínicas y resultados de proteómica del trombo intracoronario

1. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos clústeres (A y D) en ninguna de las características clínicas, angiográficas y de OCT, exceptuando una ligera asociación en diabetes mellitus.
2. Se ha detectado una correlación moderada entre el factor plaquetario 4 (PF4, CXCL4) con el tiempo de isquemia ($R^2 = 0,584$, $p = 0,0085$) y con la PCR ($R^2 = 0,677$, $p = 0,002$) (figura 1a y figura 1b). El factor plaquetario 4 es una citocina liberada en los gránulos alfa plaquetarios que parece tener un efecto procoagulante moderando los efectos de la heparina. Estos resultados podrían suponer que el PF4 tendría un papel precoz en la formación del trombo, siendo consumido durante la evolución de este, una vez ya se han activado y amplificado los mecanismos de inflamación sistémica reflejados por unos valores elevados de PCR.

Figura 1a

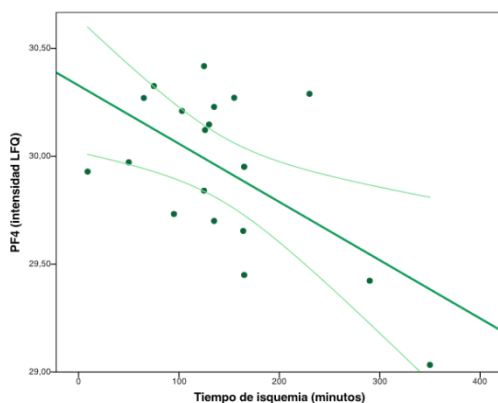
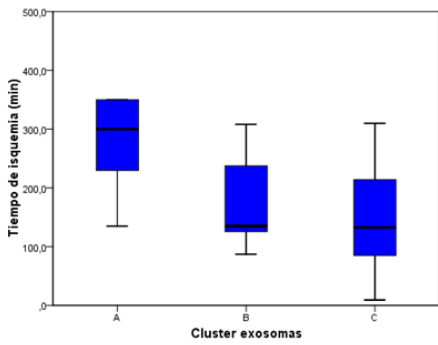


Figura 2. Diferencias en el tiempo de isquemia entre los 3 clústeres de exosomas



Los clústeres B y C presentaron varias características clínicas diferenciales. El clúster B presentó una mayor proporción de factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión arterial: 92% vs. 25%; $p = 0,001$, diabetes mellitus: 50% vs. 13%; $p = 0,044$) (figura 3a y figura 3b), tiempos de isquemia similares y una mayor concentración de proteína C reactiva (8,2[3,9-14,8] vs. 1,4[0,9-3,0]; $p = 0,003$) (figura 3c), situación que refleja un perfil clínico claramente diferente.

Figura 3a. Diferencias en la incidencia de HTA entre los 3 clústeres de exosomas (B vs. C; $p = 0,001$)

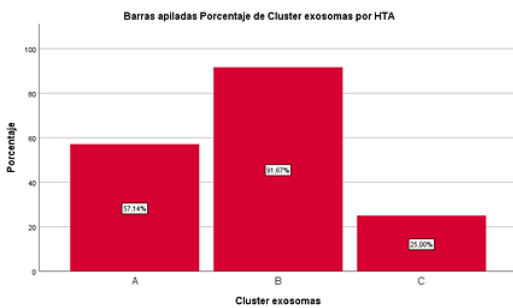


Figura 3b. Diferencias en la incidencia de diabetes entre los 3 clústeres de exosomas (B vs. C; $p = 0,04$)

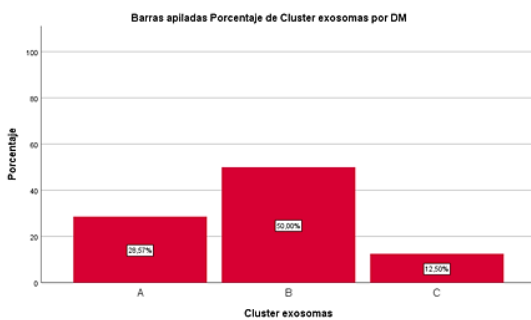
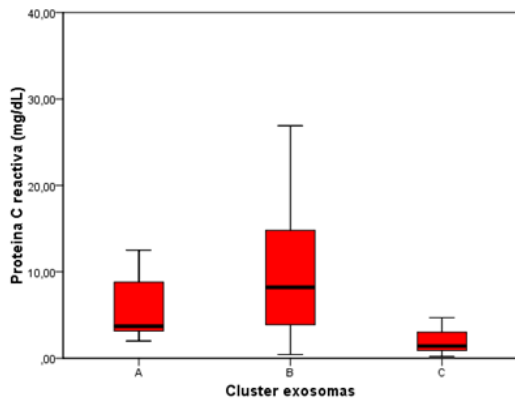


Figura 3c. Diferencias en la concentración de proteína C reactiva entre los 3 clústeres de exosomas ($p = 0,003$)



En el análisis de las proteínas expresadas de forma diferencial entre los clústeres B y C se realizó un análisis de las diferentes vías metabólicas diferenciales. La vía del complemento se encontró sobreexpresada en el clúster B, lo que unido a una mayor concentración de proteína C reactiva podría plantear la hipótesis de que el desencadenante trombótico en estos pacientes depende más de un estado proinflamatorio sistémico que de una inestabilidad local de placa. Por el contrario, en el clúster C (pacientes con menos factores de riesgo y una menor concentración de proteína C reactiva) presentó sobreexpresadas las vías ligadas al metabolismo de las lipoproteínas, dato que podría estar relacionado con una mayor aterogenicidad y mayor carga de placa de ateroma a pesar de los niveles de LDL similares al clúster B. De hecho, las concentraciones de apolipoproteína B100 y A1 están claramente relacionadas con la incidencia de infarto agudo de miocardio, independientemente de los valores de LDL.

El análisis de los datos nos ha permitido conocer las vías y moléculas representadas en los dos grupos de muestras definidas en el análisis de componentes principales. Por otra parte, y con el fin de dar un valor añadido y complementario al estudio, hemos finalizado el análisis de las muestras de exosomas procedentes de los plasmas de los mismos pacientes. Estas estructuras vesiculares son clave en el transporte de moléculas funcionalmente relevantes y esperamos que el contenido de las mismas nos pueda dar información relevante para explicar la agrupación observada de las muestras.

Análisis de los exosomas y técnica en la validación del plasma

Los exosomas circulantes han sido identificados recientemente como biomarcadores para el pronóstico, diagnóstico, estratificación del riesgo y terapia en muchas enfermedades, desde el cáncer hasta la enfermedad cardiovascular. Durante el infarto de miocardio, los exosomas circulantes cambian no solamente en número, sino también en las cargas compuestas de miRNA, lípidos y proteínas. Por dicha razón lo estamos validando en plasma utilizando la tecnología xMAP de Luminex. Esta tecnología permite la detección de hasta cincuenta biomarcadores diferentes a la vez en muestras biológicas y de fluidos. Esta tecnología se puede configurar para realizar ensayos de proteínas de forma rápida, rentable y precisa.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en los países occidentales y la cardiopatía isquémica es su entidad más frecuente, confiriendo a los pacientes un pronóstico limitado. El infarto agudo de miocardio es la primera manifestación clínica en un importante número de pacientes con cardiopatía isquémica. El IAM se asocia con una mortalidad inicial muy elevada y determina en muchos de los supervivientes un limitado pronóstico a largo plazo. Los mecanismos que participan en la génesis y en la progresión del trombo intracoronario en pacientes con IAM no se conocen en su totalidad. Al mismo tiempo, tampoco se conoce cuál es la naturaleza exacta que provoca la inestabilidad de la lesión responsable y la posterior formación y progresión del trombo intracoronario (rotura, erosión o alteraciones indetectables).

En el presente proyecto se analizan los potenciales mecanismos de formación y progresión de la trombosis intracoronaria en el contexto del IAM. La evaluación muy inicial del grado de inestabilidad de la lesión responsable (ruptura de placa, erosión, ausencia de lesión) mediante técnicas muy sensibles de imagen intracoronaria (imagen de OCT) pueden permitir una identificación más precisa del grado de participación de los diferentes desencadenantes. La relación de estos factores y la composición proteómica del trombo intracoronario puede identificar o clarificar aspectos respecto al mecanismo de la génesis y progresión de los trombos. Estos aspectos pueden facilitar la incorporación de nuevas aproximaciones farmacológicas o mecanicistas preventivas o muy precoces, buscando tratamientos más dirigidos o personalizados. Dada la

prevalencia y el impacto pronóstico y social del IAM, su potencial aplicación clínica podría ser muy importante.

Análisis proteómico. En el análisis proteómico de los trombos obtenidos de los pacientes únicamente se documentó una ligera asociación con la diabetes mellitus ($p = 0,04$), ya que los pacientes diabéticos se agrupan juntos, a pesar de que este grupo incluía muestras de pacientes no diabéticos que también son similares, en términos de proteínas identificadas y cuantificadas.

Análisis exosómico. En nuestro estudio sí que se documentó una correlación moderada entre el factor plaquetario 4 (PF4, CXCL4) con el tiempo de isquemia ($R^2 = 0,584$, $p = 0,0085$) y con las concentraciones de PCR ($R^2 = 0,677$, $p = 0,002$). Estos resultados pueden sugerir que el PF4 tendría un papel precoz en la formación del trombo, siendo consumido durante la evolución de este, una vez ya se han activado y amplificado los mecanismos de inflamación sistémica reflejados por unos valores elevados de PCR. Estos resultados en nuestra serie serán objeto de futuras investigaciones, ya que se realizará una validación en plasma de los pacientes para determinar si PF4 se segrega en el torrente circulatorio y puede ser considerado un posible biomarcador diagnóstico de infarto hiperagudo. Por otra parte, y este punto es también importante, la ausencia de correlación entre los componentes del trombo y el potencial mecanismo inicial desencadenante evaluado por OCT (ruptura grave de placa, fisura o erosión) sugieren poca relevancia del mecanismo inicial desencadenante en la composición final de los trombos.

En el análisis de las características clínicas y de procedimiento de los pacientes agrupados por clústeres de exosomas se documentó que uno de ellos se diferenciaba de los demás por presentar un tiempo de isquemia significativamente y marcadamente más prolongados (300 min vs. 132 min; $p = 0,006$). El tiempo de isquemia supone una variable determinante en las características de la formación, progresión y composición final del trombo, por su carácter extremadamente dinámico. Por ello, se realizaron evaluaciones comparativas entre los diferentes grupos de exosomas identificados. La vía del complemento se constató sobreexpresada en uno de los clústeres (B). Este aspecto, unido a una mayor concentración de proteína C reactiva, podría plantear la hipótesis de que el desencadenante trombótico en estos pacientes dependería más de un estado proinflamatorio sistémico que de una inestabilidad local de placa. Por el

contrario, el clúster C (pacientes con menos factores de riesgo y menor concentración de proteína C reactiva) presenta sobreexpresadas las vías ligadas al metabolismo de las lipoproteínas. Este aspecto podría estar asociado a una mayor aterogenicidad y mayor carga de placa de ateroma a pesar de que los niveles de LDL son similares a los del clúster B.

Escenarios adicionales de investigación creados en conjunción con otros proyectos.- La importante cantidad de trombos obtenidos en nuestra población de pacientes con infartos agudos de miocardio y los resultados de su análisis proteómico van a permitir realizar análisis comparativos con trombos obtenidos mediante aspiración en territorios vasculares diferentes de pacientes que presentan eventos trombóticos agudos. Estamos realizando una valoración comparativa en la composición proteómica de trombos coronarios *versus* trombos del territorio vascular cerebral en pacientes que han presentado episodios trombóticos agudos.

4. Bibliografía científica generada

Un aspecto relevante a comentar son las causas por las cuales la finalización del estudio ha requerido un período de realización más largo del que estaba inicialmente fijado. El comienzo del proyecto se retrasó aproximadamente seis meses por un problema exclusivamente burocrático debido a la dificultad en conseguir la aprobación de las dos instituciones participantes (Hospital de Bellvitge-ICS e IDIBELL), al tratarse de un proyecto coordinado.

Adicionalmente se solicitó una prórroga de un año y se justificaron una serie de enmiendas efectuadas al proyecto debido a la dificultad en la recogida de las muestras necesarias (trombos) para el desarrollo del mismo. Uno de los objetivos principales iniciales del estudio era caracterizar las moléculas implicadas en la generación del trombo formado en las arterias coronarias de los pacientes diabéticos y no diabéticos, en el momento del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Un punto muy importante y totalmente inesperado durante el desarrollo del proyecto ha sido la importante dificultad en la obtención de muestras de trombos intracoronarios mediante aspiración en los pacientes diabéticos, en el momento del infarto, de peso y medida suficientes para su estudio y análisis. Este hallazgo ha sido absolutamente

inesperado. No hay series que hayan descrito tal dificultad. La dificultad en la obtención de trombos coronarios que hemos observado en los pacientes diabéticos, aunque con la máxima reserva, puede sugerir un mecanismo diferente en la fisiopatología del infarto agudo de miocardio en dichos pacientes. Los pacientes con diabetes tienen placas coronarias más fibrosas y más rígidas y pueden experimentar rupturas más paulatinas y menos bruscas donde la carga trombótica es menor o donde el trombo al constituirse de forma progresiva está mucho más organizado. Este aspecto puede explicar la mayor resistencia y dificultad en su extracción mediante la aspiración intracoronaria. Por el contrario, la importante carga trombótica que se detecta en infartos de pacientes no diabéticos donde las lesiones coronarias son menos fibrosas y con un mayor componente lipídico, y posiblemente con trombos más recientes, puede explicar la facilidad en la obtención de material trombótico mediante aspiración. Este ha sido uno de los aspectos que, por otra parte, ha retrasado más la inclusión de pacientes en el estudio y que además nos ha obligado a modificar determinados objetivos del mismo.

Listado de publicaciones en preparación en la actualidad:

1. Mecanismos de formación y progresión de la trombosis en el infarto agudo de miocardio. Análisis proteómico de los trombos y del plasma intracoronario.
2. Mecanismo desencadenante del infarto agudo de miocardio con elevación de ST: mayor estado proinflamatorio sistémico y menor inestabilidad local de la placa.
3. Valor del factor plaquetario 4 (PF4) como biomarcador plasmático de la fase más inicial del infarto agudo de miocardio.
4. Bloqueo del ligando de quimiocinas 4 (CXCL4) como diana terapéutica en el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST.
5. Papel del sistema del complemento en la fisiopatología aguda del infarto agudo de miocardio con elevación de ST en pacientes con riesgo cardiovascular clásico elevado.
6. Secreción coronaria vs. sistémica de apolipoproteínas exosomales en el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST.