



NUEVOS PREDICTORES DE LA CARDIOPATÍA CORONARIA: MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, FUNCIONALIDAD DE LAS PARTÍCULAS DE HDL Y COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LAS MEMBRANAS CELULARES

Ramon Estruch Riba

Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

Montserrat Fitó Colomer

Institut Hospital Mar d'Investigacions Mèdiques

Jordi Salas Salvadó

Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili - Reus

1. Resumen

Objetivos

1. Establecer predictores novedosos y emergentes de enfermedad coronaria (CHD) en sujetos de mediana edad y mayores con alto riesgo cardiovascular seguidos durante cinco años. Se estudiarán diferentes parámetros relacionados con:
 - 1.1. La funcionalidad de HDL (capacidad de expulsión de colesterol, protección antioxidante, antiinflamatoria y endotelial, acción vasodilatadora y antiapoptótica) y la composición de proteínas y lípidos de HDL (suero amiloide A, complemento C3 y apolipoproteínas A-IV y C-III).
 - 1.2. La composición de ácidos grasos de las membranas de células sanguíneas enteras (enfoque lipidómico dirigido).
 - 1.3. Las micropartículas endoteliales circulantes.
2. Estudiar la modulación promovida por la intervención de la dieta mediterránea sobre la incidencia de CHD. Se determinará la asociación del evento CHD y los cambios de estos predictores al año de las diferentes intervenciones dietéticas.
3. Determinar el valor pronóstico de estos nuevos biomarcadores en los pacientes que han tenido un infarto de miocardio.

Objetivos secundarios

1. Examinar la relación entre los nuevos predictores de CHD relacionados con la composición de ácidos grasos iniciales de las membranas de los glóbulos blancos, la funcionalidad HDL y las micropartículas endoteliales y una selección de marcadores inflamatorios circulantes.
2. Evaluar la utilidad de estos nuevos biomarcadores para determinar el pronóstico de pacientes con infarto de miocardio.

2. Resultados

Por un lado, los objetivos del grupo del Dr. Estruch, grupo coordinador, tenía como objetivos concretos la determinación de las micropartículas endoteliales circulantes

como posibles biomarcadores en la prevención y el tratamiento de la cardiopatía coronaria (CC).

Para determinar los efectos de la dieta mediterránea en la liberación de cMP en el torrente sanguíneo, se seleccionaron 150 muestras (50 por grupo de intervención; EVOO, frutos secos y dieta control del estudio PREDIMED) de pacientes libres de ECV al final del estudio. Se cuantificaron, en el momento de inclusión y al año de seguimiento, en plasma de sangre periférica, las CMP de origen endotelial, plaquetario, leucocitario y eritrocitario por citometría de flujo y los ácidos grasos plasmáticos por cromatografía de gases, según el panel de anticuerpos que puede observarse a continuación.

Panel de anticuerpos:

Origen celular	Marcadores		
Control Anexina	-	-	Annexin V
Isotipos	IgG 1 γ	IgG 1 κ	
Plaquetas	PAC-1	CD62P	Annexin V
Plaquetas	CD142	CD61	Annexin V
Endotelio	CD146	CD62E	Annexin V
Eritrocitos	CD235ab	CD34	Annexin V
Leucocitos	CD3	CD45	Annexin V
Monocitos	CD11a	CD14	Annexin V
Células del músculo liso	CD142	SMA-a	Annexin V
Células activadas	CD63	CD62L	Annexin V

Después de un año de intervención dietética, la concentración de cMP derivadas de plaquetas era más baja en el grupo de los frutos secos en comparación con EVOO y dieta control. Además, las cMP protrombóticas (transportadoras de factor tisular y marcadores de activación celular) se vieron disminuidas al cabo de un año de intervención con dieta mediterránea suplementada tanto con aceite de oliva virgen extra como con frutos secos, en comparación con la dieta control.

Por otro lado, se estudió la funcionalidad de las micropartículas procoagulantes circulantes. Fueron seleccionados 132 sujetos de alto riesgo, 66 de ellos formaban parte del grupo intervención con dieta mediterránea (suplementada con aceite de oliva o frutos secos) y 66 del grupo control, midiéndose la actividad procoagulante de las micropartículas, tanto en estado basal, como a los 6 y 12 meses de intervención. Estos

análisis se realizaron mediante el test funcional ZYMUPHEN MP-Activity (Aniara, Hyphen BioMed) para la determinación funcional de las micropartículas de plasma por método colorimétrico, que permite estudiar la capacidad procoagulante de las micropartículas circulantes.

Los resultados obtenidos muestran que la dieta mediterránea podría tener un efecto protector sobre el proceso coronario. Por un lado, no se observa un cambio en la función coagulante de las micropartículas, su actividad no varía de forma significativa ni a los 6 ni a los 12 meses. Por el contrario, una dieta baja en grasas o dieta control favorece el incremento de la actividad procoagulante de las micropartículas, lo cual indicaría que no existe efecto protector y podría desencadenarse algún tipo de evento coronario.

La evaluación de moléculas inflamatorias y relacionadas con la estabilidad de la placa va en ese mismo sentido. Así, se observa que el grupo que sigue una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva o frutos secos presenta una reducción significativa de los niveles plasmáticos de MMP-9, endotelina, SST2, IL-6, IL-18, TNF- α y MCP-1 ($P < 0,05$, todos) e incrementos significativos de la IL-10 ($P = 0,013$). La MMP-9 es una molécula, al igual que la IL-18, que se relaciona con inestabilidad de placa, mientras que IL-10 favorece su estabilidad. En ninguna de ambas dietas se observaron cambios en las concentraciones de VCAM-1 e ICAM-1.

Así, la dieta mediterránea parece poseer un efecto inmunomodulador sobre biomarcadores de riesgo cardiovascular como SST2, IL-6, IL-10, IL-18, MMP-9, TNF- α y MCP-1.

Grupo de la Dra. Fitó

Llevó a cabo un estudio de casos y controles dentro de la cohorte PREDIMED (prevención con dieta mediterránea), originalmente un ensayo aleatorio en el que los participantes siguieron una dieta mediterránea o baja en grasas. Los casos con incidencia de síndrome coronario agudo ($n = 167$) se combinaron individualmente (1:2) con los controles por sexo, edad, grupo de intervención, índice de masa corporal y tiempo de seguimiento. Se investigaron sus dos manifestaciones individuales (infarto de miocardio, angina inestable) como resultados secundarios. Se midieron las siguientes características funcionales: concentración de colesterol HDL (en plasma);

capacidad de expulsión de colesterol; capacidad antioxidante medida por el índice inflamatorio HDL oxidativo; actividad de la fosfolipasa A2; y esfingosina-1-fosfato, apolipoproteínas A-I y A-IV, amiloide sérico A y proteína del complemento 3 (en plasma pobre de apolipoproteína B). Se utilizaron modelos de regresión logística condicional ajustados por los niveles de colesterol HDL y los factores de riesgo cardiovascular para estimar la *odds ratio* (OR) entre los incrementos de desviación estándar en las características funcionales de HDL y los resultados clínicos.

En la actualidad se está trabajando en la redacción del documento de metanálisis; se observó que una mayor eliminación de colesterol de los macrófagos provocada por suero pobre de apolipoproteína B estaba asociada con eventos coronarios. Aunque los resultados de la mayoría de los estudios combinados están en línea con esta afirmación, un estudio halló resultados opuestos. Se encontraron solo 9 artículos que cumplían los criterios de inclusión de la capacidad antioxidante de HDL; 5 de ellos contenían datos sobre el riesgo de mortalidad por todas las causas y 7 sobre el riesgo de eventos coronarios. De los 9 manuscritos, 4 eran estudios de casos y controles y todos los estudios se realizaron en una población reducida. Su metanálisis identificó la necesidad de estudios longitudinales mayores con diseños estandarizados. Sin embargo, los enfoques experimentales a lo largo de diferentes estudios fueron bastante consistentes, lo que aumenta la comparabilidad entre los resultados.

Grupo del Dr. Salas

Durante el último año del proyecto ha llevado a cabo el último análisis metabolómico de la composición de la membrana celular para cubrir un amplio espectro de diferentes ácidos grasos. También integró todos los perfiles metabolómicos obtenidos durante el proceso analítico y creó la base de datos final, con inclusión de datos clínicos, datos metabolómicos, datos sobre marcadores inflamatorios y, por último, datos sobre la funcionalidad HDL.

Un último análisis se centró en la relación entre la composición de la membrana celular de los ácidos grasos, la funcionalidad HDL y el estado inflamatorio. Sus resultados se muestran en la siguiente tabla, así como la asociación entre los parámetros de funcionalidad HDL y la composición de la membrana celular de ácidos grasos (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de funcionalidad HDL clasificados por coeficientes de regresión netos positivos o negativos elásticos de los ácidos grasos de membrana celular

	ApoA-IV	CEC	HOII	SIP	SAA	ApoA-I	ApoC-III	C3 protein
C14:0	None	None	None	None	0.00927	0.01868	-0.14057	None
C16:0	None	None	None	None	None	None	0.622764	None
C16:1n7trans	None	None	None	None	0.18307	None	None	None
C16:1n7cis	None	None	-0.013	None	None	None	0.120216	None
C18:0	None	-0.0404	0.1098	-0.353	None	None	-0.99713	None
C18:1n9cis	None	None	None	0.13603	None	None	None	None
C18:1n9trans	None	None	None	-0.392	None	-0.0447	-1.27781	None
C18:2n6	None	-0.0294	None	None	None	0.11717	-0.10579	None
C18:3n3	None	-0.0178	None	-0.1138	-0.0899	None	0.00328	None
C20:0	None	None	None	None	-0.2632	None	-0.10936	None
C20:1n9	None	None	0.0601	None	None	None	None	None
C20:2n6	None	None	None	None	0.34364	None	None	None
C20:3n6	None	None	None	None	0.22568	None	None	None
C20:4n6	None	None	None	None	None	None	None	None
C20:5n3	None	None	None	None	None	None	-0.07868	None
C22:0	None	None	None	-0.021	None	None	None	None
C22:4n6	None	None	None	None	None	None	None	None
C22:5n6	None	None	None	None	-0.3201	None	None	None
C22:5n3	None	None	None	None	0.02681	None	None	None
C24:0	None	None	None	-0.0472	0.24229	None	None	None
C22:6n3	None	None	None	None	None	None	None	None
C24:1n9	None	None	None	None	None	0.00524	None	None
Total SFA	None	None	None	None	None	None	None	None
Total MUFA	None	None	None	None	None	None	0.240921	None
Total n-6 PUFA	None	None	None	None	None	None	None	None
Total n-3 PUFA	None	None	None	None	None	None	None	None
n6:n3 PUFA	None	None	None	None	None	None	None	None

Además, varios parámetros de funcionalidad HDL se relacionaron con marcadores inflamatorios, principalmente IL-6 (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de funcionalidad HDL clasificados por coeficientes de regresión netos positivos o negativos elásticos de los marcadores inflamatorios (n = 259)

	ApoA-IV	CEC	HOII	SIP	SAA	ApoA-I	ApoC-III	C3 protein
IFN γ	None	None	None	None	None	None	None	None
IL-1b	None	None	None	None	0.0184	-0.0651	None	None
IL-6	None	None	None	0.1545	0.1196	-0.1227	None	-0.0229
IL-8	None	None	None	None	None	None	None	None
IL-10	None	None	None	None	None	None	None	None

Ajustados por edad, sexo, índice de masa corporal, niveles de HDL al inicio del estudio, tabaquismo, diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia.

Curiosamente, el contenido de estas moléculas en las partículas de HDL, principalmente las relacionadas con IL-6, también se asociaron a ácidos grasos

específicos en las membranas celulares, lo que sugiere un papel potencial de la composición de ácidos grasos de la membrana celular en la inflamación y la funcionalidad de HDL (tabla 3).

Tabla 3. Ácidos grasos en la membrana celular clasificados por coeficientes de regresión netos positivos o negativos elásticos de parámetros de funcionalidad HDL cuando ambos están asociados con IL-6 (n = 259)

Fatty acids	HDL structure/ functional parameters		
	S1P	SAA	ApoA-I
C14:0	None	None	0.0166
C20:0	-0.0097	None	None
C16:1n7 <i>trans</i>	-0.0908	0.0843	None
C18:3n3	-0.0510	-0.0097	None

Ajustados por edad, sexo, índice de masa corporal, niveles de HDL al inicio del estudio, tabaquismo, diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

La prevención es el primer paso en el tratamiento de muchas enfermedades, como por ejemplo las enfermedades cardiovasculares. Disponer de buenos biomarcadores de estas enfermedades nos puede permitir identificar mejor los sujetos con alto riesgo vascular que en la actualidad se escapan de las clasificaciones de riesgo.

Así pues, uno de los objetivos de este proyecto era validar la utilidad de tres nuevos posibles biomarcadores (funcionalidad HDL, composición de ácidos grasos de las membranas celulares y las micropartículas endoteliales circulantes) en la predicción de nuevos eventos de enfermedad coronaria en sujetos de alto riesgo pero asintomáticos (prevención primaria) y en pacientes que ya han sufrido un infarto de miocardio (prevención secundaria). Los resultados obtenidos son totalmente innovadores, ya que por un lado se combinan biomarcadores, patrones alimenticios dietéticos y datos clínicos, lo que puede ser de máximo interés para la sociedad médica. Hasta la fecha, la información sobre el valor pronóstico de estos biomarcadores en pacientes que han sufrido un ataque al corazón era absolutamente nueva. Y en los estudios de intervención de alimentación, tampoco nunca hasta ahora, se había aplicado la metodología de circulación de micropartículas endoteliales.

Por un lado, los resultados obtenidos por el grupo de la Dra. Fitó son muy prometedores, ya que podría incorporarse la medición de algunos de estos biomarcadores (por ejemplo, los relacionados con la composición de HDL, como los niveles de ApoA-I o S1P en muestras de plasma pobre de apolipoproteínas B) como biomarcadores para la gestión clínica y herramienta de pronóstico ACS para sujetos de alto riesgo. Esta sugerencia es factible porque: 1) las muestras de plasma pobre de apolipoproteína B son fáciles de obtener (su colección solo tarda 30 minutos y requiere reactivos baratos y equipo de laboratorio estándar) (Rohatgi A, N Engl J Med, 2014), y 2) las técnicas cuantitativas son fáciles de estandarizar e implementar en laboratorios rutinarios.

Por otra parte, los resultados del grupo del Dr. Salas han demostrado que niveles más elevados de ácidos grasos específicos en la membrana celular, como C:22 y C:24 se asocian a una menor incidencia de CHD, mientras que niveles más altos de C20:1n9 se asocian a un riesgo más elevado. También ha demostrado que las diferencias en la composición de la membrana de las células sanguíneas del ácido graso se asocian a niveles séricos de diferentes marcadores inflamatorios y que, de forma constante, se asociaron a cambios al cabo de un año en los niveles de ácidos grasos en las células sanguíneas con cambios en estos marcadores inflamatorios, datos que permiten un potencial preventivo y/o estrategia terapéutica para luchar contra enfermedades inflamatorias.

Los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Estruch también han demostrado que el consumo de ciertos ácidos grasos en el contexto de una dieta mediterránea disminuye los niveles de cMP de diferentes orígenes celulares. Además, la actividad procoagulante de las micropartículas puede verse frenada por la acción de la propia dieta, contrariamente a lo que ocurriría con una dieta baja en grasas (*low-fat*), lo cual parece incrementar de forma significativa la acción procoagulante de las micropartículas. Aunque nuestros resultados (Salas y Estruch) contribuyen a abrir nuevas vías de investigación en el campo de las enfermedades coronarias y los trastornos cardiovasculares, nuestros resultados no poseen una inmediata aplicabilidad en atención sanitaria. Los futuros pasos no solo deben confirmar nuestros resultados en otras poblaciones, sino que también podrán dilucidar la forma en que la composición de la membrana celular modifica la actividad celular y si puede modificarse la composición de ácidos grasos de la membrana celular para conseguir una célula sana, y, por otro

lado, ver de qué forma la dieta es capaz de modular la capacidad procoagulante de las micropartículas circulantes.

Así, los resultados de este proyecto podrían mejorar los tratamientos y la decisión clínica en pacientes con síndrome coronario agudo, afectar a la información para tomar decisiones o políticas administrativas y mejorar la calidad de vida o la satisfacción de los pacientes con enfermedades cardiovasculares. La prevención primaria de enfermedades coronarias se basa todavía en la escala de riesgo de Framingham, una escala que tiene más de 40 años. Por lo tanto, la combinación de los conocimientos previos con los posibles biomarcadores de riesgo actuales debe ser la herramienta perfecta para obtener las 4 P que se precisan en una medicina personalizada y de calidad: predictiva, preventiva, personalizada y participativa.

4. Bibliografía científica generada

Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Vilahur G, Arderiu G, Padró T, Corella D, Salas-Salvadó J, Arós F, Martínez-González MA, Ros E, Fitó M, Estruch R, Badimon L. *CD3(+)/CD45(+) and SMA-α(+) circulating microparticles are increased in individuals at high cardiovascular risk who will develop a major cardiovascular event.* Int J Cardiol. 2016;208:147-9. IF: 3.471. Citacions: 21. Q2

Chiva-Blanch G, Crespo J, Suades R, Arderiu G, Padro T, Vilahur G, Cubedo J, Corella D, Salas-Salvadó J, Arós F, Martínez-González MA, Ros E, Fitó M, Estruch R, Badimon L. *CD142+/CD61+, CD146+ and CD45+ microparticles predict cardiovascular events in high risk patients following a Mediterranean diet supplemented with nuts.* Thromb Haemost. 2016;116(1):103-14. doi: 10.1160/TH16-02-0130. IF: 4.733. Citacions: 12. Q1

Maria Trinidad Soria-Florido, Olga Castañer, Camille Lassale, Ramon Estruch, Jordi Salas-Salvadó, Miguel Ángel Martínez, Dolores Corella, Emilio Ros, Fernando Arós, Roberto Elosua, José Lapetra, Miquel Fiol, Angel Alonso-Gomez, Enrique Gómez-Gracia, Lluís Serra-Majem, Xavier Pintó, Mònica Bulló, Miguel Ruiz-Canela, Jose V. Sorlí, Alvaro Hernáez, Montse Fitó.

Dysfunctional HDLs are associated with a greater incidence of acute coronary syndrome in a population at high cardiovascular risk: a nested-case control study.

Circulation. 2020 Jan 16. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041658. IF: 23.054. Q1

Papandreou C, Sala-Vila A, Galié S, Muralidharan J, Estruch R, Fitó M, Razquin C, Corella D, Ros E, Timiraos J, Lapetra J, Serra-Majem L, Carlos S, Castañer O, Asensio EM, Salas-Salvadó J, Bulló M.

Association Between Fatty Acids of Blood Cell Membranes and Incidence of Coronary Heart Disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. Apr;39(4):819-825. PMID: 30727755. doi:

10.1161/ATVBAHA.118.312073. IF: 6.618. Q1

Muralidharan J, Papandreou C, Sala-Vila A, Rosique-Esteban N, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Ros E, Razquín C, Castañer O, Salas-Salvadó J, Bulló M.

Fatty Acids Composition of Blood Cell Membranes and Peripheral Inflammation in the PREDIMED Study: A Cross-Sectional Analysis.

Nutrients 2019; Mar 7;11(3). pii: E576. PMID: 30866565 doi:10.3390/nu11030576.

IF: 4.171. Q1

Muralidharan J, Papandreou C, Trinidad Soria M, Sala-Vila A, Blanchart G, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Ros E, Ruiz-Canela M, Fitó , Salas-Salvadó J, Bulló M.
Cross-sectional associations between HDL structure/function, fatty acids of cell membranes composition and inflammation in the PREDIMED study (sometido a revisión).

Metabolism.

Lapuente M, Estruch R, Shahbaz M, Casas R.

Relation of Fruits and Vegetables with Major Cardiometabolic Risk Factors, Markers of Oxidation, and Inflammation.

Nutrients. 2019 Oct 6;11(10). pii: E2381. doi: 10.3390/nu11102381. IF: 4.171. Q1

Casas R, Castro-Barquero S, Estruch R, Sacanella E.

Nutrition and Cardiovascular Health.

Int J Mol Sci. 2018 Dec 11;19(12):3988. doi: 10.3390/ijms19123988. PMID: 30544955; PMCID: PMC6320919. IF: 4.183. Q2

Ruiz-León AM, Lapuente M, Estruch R, Casas R.

Clinical Advances in Immunonutrition and Atherosclerosis: A Review.

Front Immunol. 2019 Apr 24;10:837. doi: 10.3389/fimmu.2019.00837. PMID: 31068933; PMCID: PMC6491827. IF: 4.716. Citas: 6. Q2

Casas R, Estruch R, Sacanella E.

Influence of Bioactive Nutrients on the Atherosclerotic Process: A Review.

Nutrients. 2018 Nov 2;10(11):1630. doi: 10.3390/nu10111630. PMID: 30400153; PMCID: PMC6266892. IF: 4.171. Citas: 7. Q1