



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



MECANISMES DE FORMACIÓ DEL TROMBUS INTRACORONARI DURANT L'INFART AGUT DE MIOCARDI AMB ELEVACIÓ D'ST EN PACIENTS DIABÈTICS I NO DIABÈTICS: UN ABORDATGE INTEGRAL DE LA MORFOLOGIA DE LA LESIÓ CULPABLE

Àngel Ramon Cequier Fillat

Hospital Universitari de Bellvitge

Sílvia Barceló Batllori

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resum

Hipòtesi

Múltiples mecanismes, tant locals com sistèmics, estan involucrats en la formació del trombus intracoronari que comporta l'infart agut de miocardi. La nostra hipòtesi és que l'anàlisi proteòmica del trombus intracoronari obtingut de pacients en la fase aguda de l'infart de miocardi i l'anàlisi amb imatge intracoronària de les lesions responsables podria revelar desencadenants fisiopatològics sistèmics i locals de la formació del trombus. La integració de les dades clíniques, proteòmiques i de biologia de sistemes podria facilitar la identificació de potencials biomarcadors i noves dianes farmacològiques.

Objectius

Objectiu primari:

Conèixer el procés molecular associat a la formació de trombus intracoronaris durant l'infart agut de miocardi (IAM) i la seva relació amb el grau d'inestabilitat de la lesió responsable, amb l'objectiu d'identificar possibles objectius terapèutics.

Objectius secundaris:

1. Identificar l'expressió diferencial de les proteïnes del trombus intracoronari en l'IAM d'acord amb el mecanisme de disrupció de la lesió responsable (ruptura *versus* no ruptura).
2. Integrar les dades clíniques dels pacients amb les dades proteòmiques procedents dels trombus i dels exosomes plasmàtics per determinar la o les variables causants dels grups observats.
3. Identificar l'expressió proteica diferencial en l'IAM segons el mecanisme de disrupció de la lesió responsable (ruptura *vs.* no ruptura).
4. Correlacionar el substrat coronari amb els marcadors inflamatoris i els resultats de biologia de sistemes.

Metodologia

S'han inclòs de manera prospectiva 39 pacients amb IAM amb elevació del segment ST entre 50 i 80 anys, de menys de 6 hores d'evolució des de l'inici dels símptomes i sotmesos a angioplàstia primària i tromboaspiració manual. Els trombus intracoronaris aspirats es van dividir en dues parts, una per a anàlisi histopatològica per confirmar la

naturalitat del trombus i l'altra per a l'anàlisi proteòmica. Així mateix es van extreure mostres de sang intracoronària i perifèrica per fer-ne l'anàlisi. A 20 pacients se'ls va poder fer tomografia de coherència òptica (OCT) per determinar el possible mecanisme de disrupció de la placa responsable (trencament vs. no trencament –erosió o nòdul càlcic–). Les imatges de tomografia de coherència òptica (anàlisi quantitativa: àrea luminal de referència, àrea luminal de la lesió, de la longitud del trombus, àrea de trombus, volum de trombus total de cada lesió, àrea luminal mínima i longitud del segment responsable; i anàlisi qualitativa: tipus de placa, presència o absència de trencament o erosió, i tipus de trombus) han estat analitzades en un laboratori centralitzat i acreditat.

Anàlisi proteòmica i exosòmica.- Les proteïnes es van extreure en urea 7 M, tiourea 2 M i SDS al 2%, i es van reduir i separar usant l'enfocament FASP amb tripsina/LysC i els pèptids es van netejar amb microcolumnes de punta superior C18. Finalment, les solucions peptídiques netejades es van assecar i emmagatzemar a -20 °C i es van analitzar per LC-MSMS. Totes les mostres es van analitzar en un sol lot amb el programari Maxquant (1.6.3.4) i el motor de cerca incorporat Andromeda. Es van classificar les mostres d'acord amb el nombre de proteïnes quantificades. Els exosomes plasmàtics es van preparar i centrifugar a 1.500 g durant 10 min (4 °C) i després a 10.000 g durant 20 min (4 °C) i es van purificar utilitzant les columnes Izon (qEVoriginal / 70 nm). Les proteïnes es van extreure amb 150 ml d'urea 6 M/bicarbonat d'amoni 200 mM i es van precipitar. El precipitat net resultant es va sotmetre a resuspensió en urea 6 M/Tris-HCl 0,1 M, agitació en vòrtex i a bany d'ultrasons durant 10 minuts. Les proteïnes es van separar i quantificar amb tripsina/Lys-C i eliminades les sals als pèptids amb columnes C18. Els pèptids resultants es van analitzar per LC-MSMS, com per al trombus.

Es van recollir totes les característiques clíniques i periprocediment dels pacients i se'n va fer un seguiment clínic d'un any.

2. Resultats obtinguts

Anàlisi de característiques clíniques i resultats de proteòmica del trombus intracoronari

1. No es van obtenir diferències estadísticament significatives entre els dos clústers (A i D) en cap de les característiques clíniques, angiogràfiques i d'OCT, tot exceptuant una lleugera associació en diabetis mellitus.
2. S'ha detectat una correlació moderada entre el factor plaquetari 4 (PF4, CXCL4) amb el temps d'isquèmia ($R^2 = 0,584$, $p = 0,0085$) i amb la PCR ($R^2 = 0,677$, $p = 0,002$) (figura 1a i figura 1b). El factor plaquetari 4 és una citocina alliberada en els grànuls alfa plaquetaris que sembla tenir un efecte procoagulant moderant els efectes de l'heparina. Aquests resultats podrien suposar que el PF4 tindria un paper precoç en la formació del trombus, i ser consumit durant l'evolució d'aquest, una vegada ja s'han activat i amplificat els mecanismes d'inflamació sistèmica reflectits per uns valors elevats de PCR.

Figura 1a

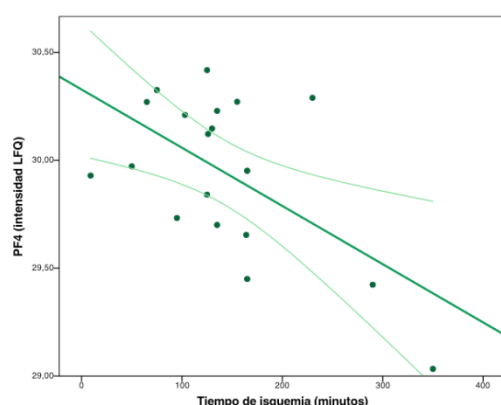
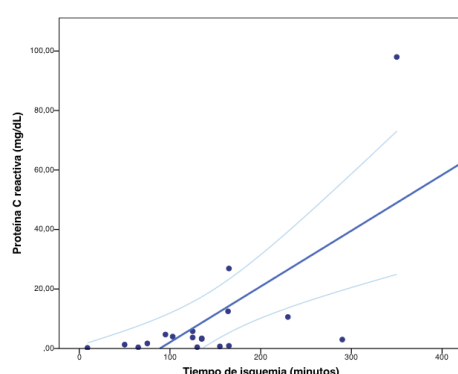


Figura 1b



Aquests resultats seran objecte de futures investigacions i es realitzarà una validació en plasma per determinar si PF4 es segrega al torrent circulatori i pot ser considerat un possible biomarcador diagnòstic d'infart hiperagut. Al mateix temps, podria ser objecte

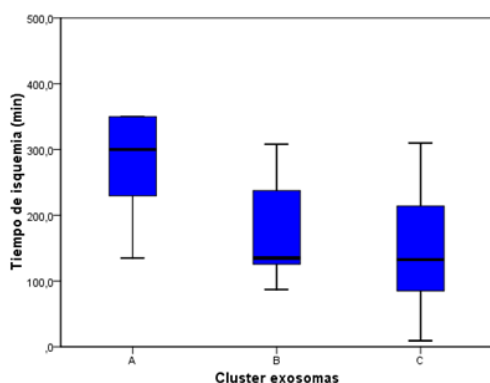
d'una investigació del seu potencial paper com a diana terapèutica en infarts hiperaguts.

Anàlisi de les característiques clíniques i resultats de proteòmica d'exosomes

Després de la realització de l'anàlisi dels components principals de les proteïnes detectades en exosomes en plasma es van identificar 3 clústers diferenciats.

Es van analitzar les característiques clíniques i de procediment d'aquests pacients (T1) i es va documentar que el clúster A només es diferenciava del B i C en el fet que presentava un temps d'isquèmia significativament més elevat (300[164-350] min vs. 132[103-232] min; $p = 0,006$) (figura 2). El temps d'isquèmia suposa una variable determinant en les característiques del trombus pel seu caràcter extremadament dinàmic. Per això es va determinar de fer una comparació A vs. combinat B+C i una segona anàlisi de comparació de B vs. C.

Figura 2. Diferències en el temps d'isquèmia entre els 3 clústers d'exosomes



Els clústers B i C van presentar diverses característiques clíniques diferencials. El B va presentar una major proporció de factors de risc cardiovascular clàssics (hipertensió arterial: 92% vs. 25%; $p = 0,001$, diabetis mellitus: 50% vs. 13%; $p = 0,044$) (figura 3a i figura 3b), temps d'isquèmia similars i una més elevada concentració de proteïna C reactiva (8,2[3,9-14,8] vs. 1,4[0,9-3,0]; $p = 0,003$) (figura 3c), situació que reflecteix un perfil clínic clarament diferent.

Figura 3a. Diferències en la incidència d'HTA entre els 3 clústers d'exosomes (B vs. C; $p = 0,001$)

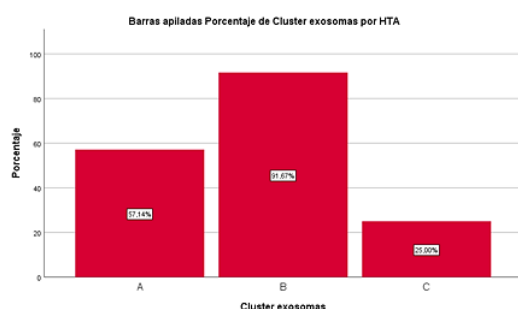


Figura 3b. Diferències en la incidència de diabetis entre els 3 clústers d'exosomes (B vs. C; $p = 0,04$)

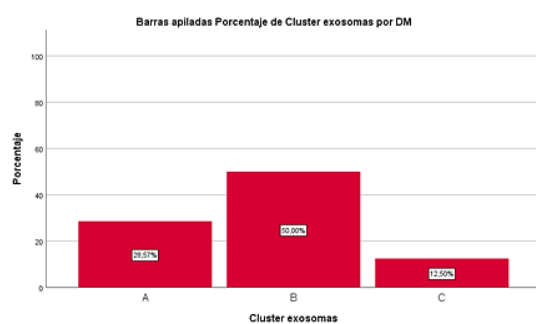
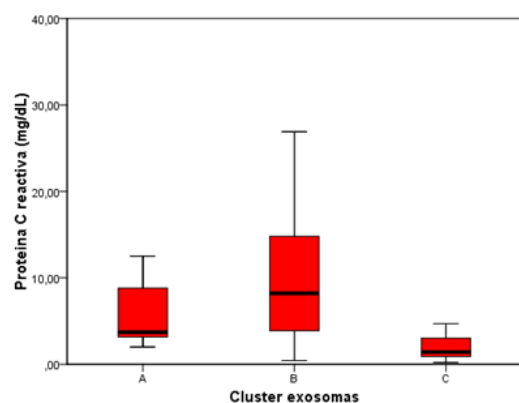


Figura 3c. Diferències en la concentració de proteïna C reactiva entre els 3 clústers d'exosomes ($p = 0,003$)



En l'anàlisi de les proteïnes expressades de forma diferencial entre els clústers B i C es va fer una anàlisi de les diferents vies metabòliques diferencials. La via del complement es va trobar sobrerrepresentada en el clúster B, la qual cosa, unida a una més elevada concentració de proteïna C reactiva, podria plantejar la hipòtesi que el desencadenant

trombòtic en aquests pacients depèn més d'un estat proinflamatori sistèmic que d'una inestabilitat local de placa. Contràriament, en el clúster C (pacients amb menys factors de risc i una menor concentració de proteïna C reactiva) presentaven sobreexpressades les vies lligades al metabolisme de les lipoproteïnes, fet que podria estar relacionat amb una major aterogenicitat i major càrrega de placa d'ateroma tot i els nivells d'LDL similars al clúster B. De fet, les concentracions d'apolipoproteïna B100 i A1 estan clarament relacionades amb la incidència d'infart agut de miocardi, independentment dels valors d'LDL.

L'anàlisi de les dades ens ha permès conèixer les vies i molècules representades en els dos grups de mostres definits en l'anàlisi de components principals. D'altra banda, i amb l'objectiu de donar un valor afegit i complementari a l'estudi, hem finalitzat l'anàlisi de les mostres d'exosomes procedents dels plasmes dels mateixos pacients. Aquestes estructures vesiculars són clau en el transport de molècules funcionalment rellevants i esperem que el contingut ens pugui donar informació rellevant per explicar l'agrupament observat de les mostres.

Anàlisi dels exosomes i tècnica en la validació del plasma

Els exosomes circulants han aparegut recentment com a biomarcadors per al pronòstic, el diagnòstic, l'estratificació del risc i la teràpia en moltes malalties, des del càncer fins a la malaltia cardiovascular. Durant l'infart de miocardi, els exosomes circulants canvien no només quant a nombre, sinó també quant a càrregues compostes de miRNA, lípids i proteïnes. Per aquesta raó ho estem validant en plasma emprant la tecnologia xMAP de Luminex. Aquesta tecnologia permet la detecció de fins a cinquanta biomarcadors diferents a la vegada en mostres biològiques i fluids. Aquesta tecnologia es pot configurar per fer assajos de proteïnes de forma ràpida, rendible i precisa.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

La malaltia cardiovascular és la principal causa de mortalitat als països occidentals i la cardiopatia isquèmica n'és l'entitat més freqüent, que confereix als pacients un pronòstic limitat. L'infart agut de miocardi és la primera manifestació clínica en un important nombre de pacients amb cardiopatia isquèmica. L'IAM s'associa amb una mortalitat inicial molt elevada i determina en molts dels supervivents un pronòstic a

llarg termini limitat. Els mecanismes que participen en la gènesi i en la progressió del trombus intracoronari en pacients amb IAM no es coneixen del tot. Al mateix temps, tampoc es coneix quina és la naturalesa exacta que provoca la inestabilitat de la lesió responsable i la posterior formació i progressió del trombus intracoronari (trencament, erosió o alteracions indetectables).

En aquest projecte s'analitzen els potencials mecanismes de formació i progressió de la trombosi intracoronària en el context de l'IAM. L'avaluació molt inicial del grau d'inestabilitat de la lesió responsable (ruptura de placa, erosió, absència de lesió) mitjançant tècniques molt sensibles d'imatge intracoronària (imatge d'OCT) poden permetre una identificació més precisa del grau de participació dels diferents desencadenants. La relació d'aquests factors i la composició proteòmica del trombus intracoronari pot identificar o clarificar aspectes en relació amb el mecanisme de la gènesi i la progressió dels trombus. Aquests aspectes poden facilitar la incorporació de noves aproximacions farmacològiques o mecanicistes preventives o molt precoces, tot cercant tractaments més dirigits o personalitzats. Atesa la prevalença i l'impacte pronòstic i social de l'IAM, la seva potencial aplicació clínica podria ser molt important.

Anàlisi proteòmica. En l'anàlisi proteòmica dels trombus obtinguts dels pacients únicament es va documentar una lleugera associació amb la diabetis mellitus ($p = 0,04$), ja que els pacients diabètics s'agrupen junts, tot i que aquest grup inclouïa mostres de pacients no diabètics que també són similars, en termes de les proteïnes identificades i quantificades.

Anàlisi exosòmica. El nostre estudi sí que va permetre documentar una correlació moderada entre el factor plaquetari 4 (PF4, CXCL4) amb el temps d'isquèmia ($R^2 = 0,584$, $p = 0,0085$) i amb les concentracions de PCR ($R^2 = 0,677$, $p = 0,002$). Aquests resultats poden suposar que el PF4 tindria un paper precoç en la formació del trombus, i ser consumit durant l'evolució d'aquest, una vegada ja s'han activat i amplificat els mecanismes d'inflamació sistèmica reflectits per uns valors elevats de PCR. Aquests resultats en la nostra sèrie seran objecte de futures investigacions, ja que es farà una validació en plasma dels pacients per determinar si PF4 es segrega al torrent circulatori i pot ser considerat un possible biomarcador diagnòstic d'infart hiperagut. D'altra banda, i aquest punt també és important, l'absència de correlació entre els components del trombus i el potencial mecanisme inicial desencadenant

avaluat per OCT (ruptura greu de placa, fissura o erosió) suggereixen poca rellevància del mecanisme inicial desencadenant en la composició final del trombus.

En l'anàlisi de les característiques clíniques i de procediment dels pacients agrupats per clústers d'exosomes es va documentar que un dels clústers es diferenciava dels altres perquè presentava un temps d'isquèmia significativament i marcadament més perllongat (300 min vs. 132 min; $p = 0,006$). El temps d'isquèmia suposa una variable determinant en les característiques de la formació, progressió i composició final del trombus, pel seu caràcter extremadament dinàmic. Per això es van fer avaluacions comparatives entre els diferents grups d'exosomes identificats. La via del complement es va constatar sobrerrepresentada en un dels clústers (B). Aquest aspecte, unit a una major concentració de proteïna C reactiva, podria plantejar la hipòtesi que el desencadenant trombòtic en aquests pacients dependria més d'un estat proinflamatori sistèmic que d'una inestabilitat local de placa. Contràriament, el clúster C (pacients amb menys factors de risc i una menor concentració de proteïna C reactiva) presenta sobreexpressades les vies lligades al metabolisme de les lipoproteïnes. Aquest aspecte podria estar relacionat amb una major aterogenicitat i una major càrrega de placa d'ateroma, tot i que els nivells d'LDL són similars als del clúster B.

Escenaris addicionals de recerca creats en conjunció amb altres projectes. La important quantitat de trombus obtinguts en la nostra població de pacients amb infarts aguts de miocardi i els resultats de la seva anàlisi proteòmica permetran fer anàlisis comparatives amb trombus obtinguts mitjançant aspiració en territoris vasculars diferents de pacients que presenten esdeveniments trombòtics aguts. Estem fent una valoració comparativa en la composició proteòmica de trombus coronaris *versus* trombus del territori vascular cerebral en pacients que han presentat episodis trombòtics aguts.

4. Bibliografia científica generada

Un aspecte rellevant que cal comentar són les causes per les quals la finalització de l'estudi ha requerit un període de realització més llarg que l'establert inicialment. El començament del projecte es va retardar aproximadament sis mesos per un problema

exclusivament burocràtic a causa de la dificultat d'aconseguir l'aprovació de les dues institucions (Hospital de Bellvitge-ICS i IDIBELL), en tractar-se d'un projecte coordinat.

Adicionalment es va sol·licitar una prorroga d'un any i es van justificar una sèrie de esmenes que es van fer al projecte a causa de la dificultat de recollir les mostres necessàries (trombus) per al projecte. Un dels objectius principals inicials de l'estudi era caracteritzar les molècules implicades en la generació del trombus format a les artèries coronàries dels pacients diabètics i no diabètics, en el moment de l'infart agut de miocardi amb elevació del segment ST. Un punt molt significatiu i totalment inesperat durant el desenvolupament del projecte ha estat la important dificultat en l'obtenció de mostres de trombus intracoronaris mitjançant aspiració en els pacients diabètics, en el moment de l'infart, de mesura i mida suficients per poder ser estudiades i analitzades. Aquesta troballa ha estat absolutament inesperada. No hi ha sèries que hagin descrit aquesta dificultat. La dificultat en l'obtenció de trombus coronaris que hem observat en els pacients diabètics, encara que amb la màxima reserva, pot suggerir un mecanisme diferent en la fisiopatologia de l'infart agut de miocardi en aquests pacients. Els pacients amb diabetis tenen plaques coronàries més fibroses i més rígides i poden experimentar ruptures més progressives i menys brusques on la càrrega trombòtica és menor o el trombus en constituir-se de forma progressiva està molt més organitzat. Aquest aspecte pot explicar la major resistència i dificultat a la seva extracció mitjançant l'aspiració intracoronària. Per contra, la important càrrega trombòtica que es detecta en infarts de pacients no diabètics en què les lesions coronàries són menys fibroses i amb un major component lipídic, i possiblement amb trombus més recents, poden explicar la facilitat en l'obtenció de material trombòtic mitjançant aspiració. Aquest ha estat un dels aspectes que, d'altra banda, ha retardat més la inclusió de pacients en l'estudi i que a més a més ens ha obligat a modificar-ne determinats objectius.

Llista de publicacions que actualment estan en preparació:

1. Mecanismes de formació i progressió de la trombosi en l'infart agut de miocardi. Anàlisi proteòmica dels trombus i del plasma intracoronari.
2. Mecanisme desencadenant de l'infart agut de miocardi amb elevació d'ST: major estat proinflamatori sistèmic i menor inestabilitat local de la placa.

3. Valor del factor plaquetari 4 (PF4) com a biomarcador plasmàtic de la fase més inicial de l'infart agut de miocardi.
4. Bloqueig del lligand de quimiocines 4 (CXCL4) com a diana terapèutica en l'infart agut de miocardi amb elevació del segment ST.
5. Paper del sistema del complement en la fisiopatologia aguda de l'infart agut de miocardi amb elevació d'ST en pacients amb risc cardiovascular clàssic elevat.
6. Secreció coronària vs. sistèmica d'apolipoproteïnes exosomals en l'infart agut de miocardi amb elevació del segment ST.