



NOUS PREDICTORS DE LA CARDIOPATIA CORONÀRIA: MICROPARTÍCULES ENDOTELIALS CIRCULANTS, FUNCIONALITAT DE LES PARTÍCULES D'HDL I COMPOSICIÓ EN ÀCIDS GRASSOS DE LES MEMBRANES CEL·LULARS

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. Resum

Objectius

1. Establir predictors nous i emergents per a malalties coronàries (CHD) en els subjectes de mitjana edat i gent gran amb risc cardiovascular alt seguits durant cinc anys. S'estudiaran diferents paràmetres relacionats amb:
 - 1.1. La funcionalitat de l'HDL (capacitat d'expulsió de colesterol, protecció antioxidant, antiinflamatòria i endotelial, acció vasodilatadora i antiapoptòtica) i la composició de proteïnes i lípids d'HDL (sèrum amiloide A, complement C3 i apolipoproteïnes A-IV i C-III).
 - 1.2. La composició d'àcids grassos de les membranes dels glòbuls sencers (enfocament lipidòmic dirigit).
 - 1.3. Les micropartícules endotelials circulants.
2. Estudiar la modulació promoguda per la intervenció de la dieta mediterrània sobre la incidència de la malaltia cardíaca. Es determinarà l'associació entre CHD i els canvis d'aquests predictors després d'un any d'intervenció dietètica.
3. Determinar el valor pronòstic d'aquests nous biomarcadors en els pacients que han patit un infart de miocardi.

Objectius secundaris

1. Examinar la relació entre els nous predictors de les CHD relacionats amb la composició d'àcids grassos inicials de les membranes dels glòbuls blancs, la funcionalitat d'HDL i les micropartícules endotelials i una selecció de marcadors inflamatoris circulants.
2. Avaluar la utilitat d'aquests nous biomarcadors per determinar el pronòstic dels pacients amb infart de miocardi.

2. Resultats

Per una banda, els objectius del grup del Dr. Estruch, grup coordinador, tenia com a objectius concrets la determinació de les micropartícules endotelials circulants com a possibles biomarcadors en la prevenció i el tractament de la cardiopatia coronària (CC). Per determinar els efectes de la dieta mediterrània en l'alliberament de cMP al torrent sanguini, es van seleccionar 150 mostres (50 per grup d'intervenció; EVOO, fruits secs i dieta control del l'estudi PREDIMED) de pacients lliures d'ECV al final de l'estudi. Es van quantificar, al moment d'inclusió i a l'any de seguiment, al plasma de sang perifèrica, les cMP d'origen endotelial, plaquetari, leucocitari i eritrocitari per citometria de flux i els àcids grassos plasmàtics per cromatografia de gasos, segons el panell d'anticossos que es pot veure a sota.

Panell d'anticossos:

Origen cel·lular	Marcadors		
Control Anexina	-	-	Annexin V
Isotips	IgG 1 γ	IgG 1 κ	
Plaquetes	PAC-1	CD62P	Annexin V
Plaquetes	CD142	CD61	Annexin V
Endoteli	CD146	CD62E	Annexin V
Eritròcits	CD235ab	CD34	Annexin V
Leucòcits	CD3	CD45	Annexin V
Monòcits	CD11a	CD14	Annexin V
Cèl·lules del múscul llis	CD142	SMA-a	Annexin V
Cèl·lules activades	CD63	CD62L	Annexin V

Després d'un any d'intervenció dietètica, la concentració de cMP derivades de plaquetes era més baixa al grup dels fruits secs comparats amb el d'EVOO i el de dieta control. A més, les cMP protrombòtiques (transportadores de factor tissular i marcadors d'activació cel·lular) es van veure disminuïdes després d'un any d'intervenció amb dieta mediterrània suplementada tant amb oli d'oliva verge extra com amb fruits secs, en comparació amb la dieta control.

D'altra banda, es va estudiar la funcionalitat de les micropartícules procoagulants circulants. Per fer això, vam seleccionar 132 subjectes d'alt risc, 66 dels quals formaven part del grup intervenció amb dieta mediterrània (suplementada amb oli

d'oliva o fruits secs) i 66 del grup control i vam mesurar l'activitat procoagulant de les micropartícules, tant basalment com després de 6 i 12 mesos d'intervenció. Hem fet aquestes anàlisis mitjançant el test funcional ZYMUPHEN MP-Activity (ANIARA, Hyphen BioMed) per a la determinació funcional de les micropartícules de plasma per mètode colorimètric, que permet estudiar la capacitat procoagulant de les micropartícules circulants.

Els resultats obtinguts mostren que la dieta mediterrània podria tenir un efecte protector sobre el procés coronari. Per una banda, no s'observa un canvi en la funció coagulant de les micropartícules, la seva activitat no varia de manera significativa ni als 6 ni als 12 mesos. Contràriament, una dieta baixa en greixos o dieta control afavoreix l'increment de l'activitat procoagulant de les micropartícules, la qual cosa indicaria que no hi ha efecte protector i podria desencadenar algun tipus d'esdeveniment coronari.

L'avaluació de molècules inflamatòries i relacionades amb l'estabilitat de la placa van en el mateix sentit. De manera que s'observa que el grup que segueix una dieta mediterrània suplementada amb oli d'oliva o fruits secs presenta una reducció significativa dels nivells plasmàtics d'MMP-9, endotelina, SST2, IL-6, IL-18, TNF- α i MCP-1 ($P < 0,05$, tots) i increments significatius de la IL-10 ($P = 0,013$). L'MMP-9 és una molècula que igual que la IL-18 es relaciona amb inestabilitat de placa, mentre que IL-10 n'afavoreix l'estabilitat. En cap de les dues dietes es van observar canvis en les concentracions de VCAM-1 i ICAM-1.

Així, la dieta mediterrània sembla tenir un efecte immunomodulador sobre biomarcadors de risc cardiovascular com SST2, IL-6, IL-10, IL-18, MMP-9, TNF- α i MCP-1.

Grup de la Dra. Fitó

Va dur a terme un estudi de control de casos dins de la cohort PREDIMED (prevenció amb dieta mediterrània), originalment un assaig aleatori en què els participants seguien una dieta mediterrània o baixa en greixos. Els casos de síndrome coronària aguda incident ($n = 167$) es van combinar individualment (1:2) amb controls per sexe, edat, grup d'intervenció, índex de massa corporal i temps de seguiment. Es van investigar les seves dues manifestacions individuals (infart de miocardi, angina

inestable) com a resultats secundaris. Es van mesurar les característiques funcionals següents: concentració de colesterol HDL (en plasma); capacitat d'expulsió de colesterol; capacitat antioxidant mesurada per l'índex inflamatori HDL; activitat de la fosfolipasa A2; i esfingosina-1-fosfat, apolipoproteïnes A-I i A-IV, amiloide sèric A i proteïna del complement 3 (en plasma empobrit d'apolipoproteïna B). Es van utilitzar models de regressió logística condicional ajustats pels nivells de colesterol HDL i factors de risc cardiovascular per estimar les proporcions de probabilitat (OR) entre els increments de desviació estàndard en les característiques funcionals d'HDL i els resultats clínics.

Actualment s'està treballant en la redacció del treball de metaanàlisi; es va observar que una més alta eliminació del colesterol dels macròfags produïda pel sèrum empobrit d'apolipoproteïna B estava associada amb esdeveniments coronaris. Tot i que els resultats de la majoria dels estudis combinats coincideixen en aquesta afirmació, un estudi ha trobat resultats contraris. Només van trobar 9 articles que complien els criteris d'inclusió de la capacitat antioxidant d'HDL, 5 dels quals tenien dades sobre el risc de mortalitat per tota causa i 7 sobre el risc d'esdeveniments coronaris. Dels 9 manuscrits, 4 eren estudis de control de casos i tots els estudis es van fer amb una població reduïda. La metaanàlisi va identificar la necessitat d'estudis longitudinals més grans amb dissenys normalitzats. No obstant això, els enfocaments experimentals dels diferents estudis han estat força consistents, fet que augmenta la comparabilitat entre els resultats.

Grup del Dr. Salas

Durant aquest darrer any del projecte ha dut a terme l'última anàlisi metabolòmica de la composició de membrana cel·lular per abastar un ampli espectre d'àcids grassos diferents. També ha integrat tots els perfils metabolòmics obtinguts durant el procés analític i ha creat la base de dades final amb la inclusió de dades clíniques, dades metabolòmiques, dades sobre marcadors inflamatoris i, finalment, dades sobre la funcionalitat HDL.

Una última anàlisi es va centrar en la relació entre la composició de la membrana de les cèl·lules d'àcids grassos, la funcionalitat d'HDL i l'estat inflamatori. Es mostren els resultats i l'associació entre paràmetres de funcionalitat HDL i composició de membranes de cèl·lules grasses (taula 1).

Taula 1. Paràmetres de funcionalitat d'HDL classificats per coeficients de regressió nets positius o negatius elàstics dels àcids grassos de la membrana cel·lular

	ApoA-IV	CEC	HOII	S1P	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

Adicionalment, diversos paràmetres de funcionalitat d'HDL es van relacionar amb marcadors inflamatoris, principalment IL-6 (**taula 2**).

Taula 2. Paràmetres de funcionalitat HDL classificats per coeficients de regressió nets positius o negatius elàstics dels marcadors inflamatoris (n = 259)

	ApoA-IV	CEC	HOII	S1P	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

Ajustats per edat, sexe, índex de massa corporal, nivells d'HDL a l'inici de l'estudi, tabaquisme, diabetis tipus 2 i hipercolesterolèmia.

Curiosament, el contingut d'aquestes molècules en partícules d'HDL, principalment aquelles relacionades amb IL-6, també es van associar amb àcids grassos específics a les membranes cel·lulars, fet que suggereix un paper potencial de la composició d'àcids grassos a la membrana cel·lular en la inflamació i la funcionalitat HDL (taula 3).

Taula 3. Els àcids grassos a la membrana cel·lular classificats per coeficients de regressió nets positius o negatius elàstics dels paràmetres de funcionalitat HDL quan tots dos estan associats amb IL-6 (n = 259)

Fatty acids	HDL structure/ functional parameters		
	SIP	SAA	ApoA-I
C14:0	None	None	0.0166
C20:0	-0.0097	None	None
C16:1n7trans	-0.0908	0.0843	None
C18:3n3	-0.0510	-0.0097	None

Ajustats per edat, sexe, índex de massa corporal, nivells d'HDL a l'inici de l'estudi, tabaquisme, diabetis tipus 2 i hipercolesterolèmia.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

La prevenció és el primer pas en el tractament de moltes malalties, com per exemple les cardiovasculars. Disposar de bons biomarcadors d'aquestes malalties ens pot permetre identificar millor els subjectes amb alt risc vascular que actualment s'escapen de les classificacions de risc.

Així doncs, un dels objectius d'aquest projecte era validar la utilitat de tres nous possibles biomarcadors (funcionalitat HDL, composició d'àcids grassos de les membranes cel·lulars i les micropartícules endotelials circulants) en la predicció de nous esdeveniments de malaltia coronària en subjectes d'alt risc però asimptomàtics (prevenció primària) i en pacients que ja han patit un infart de miocardi (prevenció secundària). Els resultats obtinguts són totalment innovadors, ja que per una banda es combinen biomarcadors, patrons alimentaris dietètics i dades clíniques, la qual cosa pot representar un màxim interès per a la societat mèdica. Fins al dia d'avui, la informació

sobre el valor pronòstic d'aquests biomarcadors en pacients amb un atac de cor era absolutament nova. I en els estudis d'intervenció d'alimentació, tampoc mai fins ara no s'havia aplicat la metodologia de circulació de micropartícules endotelials.

Per una banda, els resultats obtinguts pel grup de la Dra. Fitó són molt prometedors, ja que es podria incorporar el mesurament d'alguns d'aquests biomarcadors (per exemple, els relacionats amb la composició d'HDL, com els nivells d'ApoA-I o S1P en mostres de plasma empobrit d'apolipoproteïnes B) com a biomarcadors per a la gestió clínica i eina de pronòstic ACS per a subjectes d'alt risc. Aquest suggeriment és factible perquè: 1) les mostres de plasma pobres d'apolipoproteïna B són fàcils d'obtenir (la seva col·lecció només triga 30 minuts i requereix reactius barats i equipament de laboratori estàndard) (Rohatgi A, N Engl J Med, 2014), i 2) les tècniques quantitatives són fàcils d'estandarditzar i implementar en laboratoris rutinaris.

D'altra banda, els resultats del grup del Dr. Salas han demostrat que nivells més elevats d'àcids grassos específics a la membrana cel·lular, com C:22 i C:24 estan associats amb una menor incidència de CHD, mentre que nivells més alts de C20:1n9 s'associen amb un risc més elevat. També hem demostrat que les diferències en la composició de la membrana de les cèl·lules sanguínies de l'àcid gras s'associen amb nivells sèrics de diferents marcadors inflamatoris i que, de forma constant, es van associar amb canvis al cap d'un any en els nivells d'àcids grassos en les cèl·lules sanguínies amb canvis en aquests marcadors inflamatoris, dades que permeten un potencial preventiu i/o estratègia terapèutica per lluitar contra malalties inflamatòries. Els resultats obtinguts pel grup del Dr. Estruch també han demostrat que el consum de certs àcids grassos en el context d'una dieta mediterrània disminueix els nivells de cMP de diferents orígens cel·lulars. A més, l'activitat procoagulant de les micropartícules es pot veure frenada per l'acció de la mateixa dieta, contràriament al que passaria amb una dieta baixa en greixos (*low-fat*), la qual sembla incrementar de manera significativa l'acció procoagulant de les micropartícules.

Tot i que els nostres resultats (Salas i Estruch) contribueixen a obrir noves vies de recerca en el camp de les malalties coronàries i els trastorns cardiovasculars, els nostres resultats no tenen una aplicabilitat immediata en l'atenció sanitària. Els passos futurs no només han de confirmar els nostres resultats en altres poblacions, sinó que també podran escatir la forma en què la composició de la membrana cel·lular modifica

l'activitat cel·lular i si es pot modificar la composició d'àcids grassos de la membrana cel·lular per aconseguir una cèl·lula sana, i d'altra banda, veure de quina manera la dieta és capaç de modular la capacitat procoagulant de les micropartícules circulants. Així, els resultats d'aquest projecte podrien millorar els tractaments i la decisió clínica en pacients amb síndrome coronària aguda, afectar la informació per prendre decisions o polítiques administratives i millorar la qualitat de vida o la satisfacció dels pacients amb malalties cardiovasculars. La prevenció primària de malalties coronàries es basa encara en l'escala de risc de Framingham, una escala que té més de 40 anys. Per tant, la combinació dels coneixements previs amb els possibles biomarcadors de risc actuals ha de ser l'eina perfecta per obtenir les quatre P requerides en una medicina personalitzada i de qualitat: predictiva, preventiva, personalitzada i participativa.

4. Bibliografia 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-a(+) 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-Flórida, 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 (sotmès a revisió). 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. Citacions: 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. Citacions: 7. Q1