

Identificación mediante proteómica de posibles biomarcadores plaquetarios en síndrome coronario agudo

Andrés F. Parguiña¹, Isaac Rosa¹, Lilián Grigorian-Shamagián², Elvis Teijeira-Fernández², Jana Alonso², Rosa Agra², José Ramón González-Juanatey², Ángel García¹

¹Dpto de Farmacología; Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. ²Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela

Introducción

La activación plaquetaria y la formación del trombo juegan un papel fundamental en el síndrome coronario agudo (SCA), principal causa de muerte en Europa. El SCA es una enfermedad crónica que se desarrolla durante la vida del individuo a causa de la lenta acumulación de placa de ateroma en las arterias (aterosclerosis). La placa de ateroma se va endureciendo poco a poco encerrando en su interior un núcleo lipídico rodeado por una capa densa y fibrosa que puede debilitarse debido a una serie de razones patológicas y llegar a romperse dando lugar a la formación de un coágulo. Si este coágulo llega a bloquear las arterias coronarias puede reducir o incluso impedir el flujo de sangre al corazón (isquemia). Debido a esta falta de oxígeno en el corazón el paciente, dependiendo de la gravedad, puede sufrir desde dolor al hacer ejercicio (angina estable [AE]) hasta una situación aguda como una angina inestable (AI) o un infarto de miocardio (IM). Las plaquetas juegan un papel fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis y el SCA [1]. De hecho, la mayoría de las terapias existentes para tratar esta enfermedad interrumpen la activación plaquetaria. Dado que las plaquetas carecen de núcleo, la proteómica es una herramienta fundamental para su estudio. Por todo ello, el estudio del proteoma plaquetario en el contexto del evento agudo podría ayudar a descubrir biomarcadores o dianas terapéuticas que contribuyan a un mejor tratamiento/diagnóstico de la enfermedad. Ese ha sido el objetivo del presente trabajo.

Métodos

Basándonos en nuestra experiencia en proteómica de plaquetas [2-5], hemos utilizado la 2-DE para comparar el proteoma de 18 pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST en

el electrocardiograma (SCASEST) frente al de un grupo control constituido por 10 individuos con cardiopatía isquémica crónica estable. La toma de muestra de los pacientes con SCASEST se hizo en tres puntos: al ingreso (menos de 24 horas desde el inicio del evento agudo), a los 5 días y a los 6 meses. Los grupos se cotejaron de manera que no hubiese diferencias significativas en edad, sexo y tratamientos. Las plaquetas se procesaron en menos de dos horas tras la extracción sanguínea. Tras extraer las proteínas, éstas se separaron mediante electroforesis bidimensional (2-DE). La primera dimensión fue en tiras de gradiente inmovilizado de pH (4-7, 24 cm). Se escogió esa franja de pI porque análisis anteriores que hemos llevado a cabo han demostrado que la mayor parte de las proteínas plaquetarias detectables mediante 2-DE se encuentran en dicha región del proteoma [2]. La segunda dimensión fue en geles del 10% de poliacrilamida. Los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby, y escaneados en un Typhoon 9410 (GE Healthcare). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Ludesi REDFIN (Suecia).

Resultados

En cada gel se detectaron más de 2300 spots. Tras el análisis diferencial, se detectaron 55 spots correspondientes a proteínas que variaban entre los grupos SCASEST y control ($p < 0.05$ y variaciones de intensidad > 2) (Figura 1). Las proteínas, identificadas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF), correspondían a 30 genes diferentes. Los resultados fueron validados mediante *western blot*. La mayoría de las proteínas identificadas pertenecen a 3 grupos funcionales: señalización, citoesqueleto y ruta de secreción/vesículas. Esto concuerda con la idea de que existe una mayor activación plaquetaria en pacientes con SCASEST y fue respaldado por la disminución del número de diferencias en el día 5 tras el ingreso (26 spots diferentes) y a los 6 meses

(2 spots diferentes). Algunas de las proteínas identificadas están involucradas en la ruta de señalización de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ que es uno de los principales responsables del proceso de activación plaquetaria. Es el caso de *ILK*, *Src* y *talín*. En la mayoría de los casos las diferencias se debieron a modificaciones post-traduccionales. También se detectó una menor presencia de proteínas secretadas en pacientes SCASEST lo que podría deberse al proceso de secreción que sufren las plaquetas tras activarse. Se observó como la tendencia era que estas últimas proteínas estuviesen en mayor cantidad en el plasma pobre en plaquetas de los pacientes SCASEST.

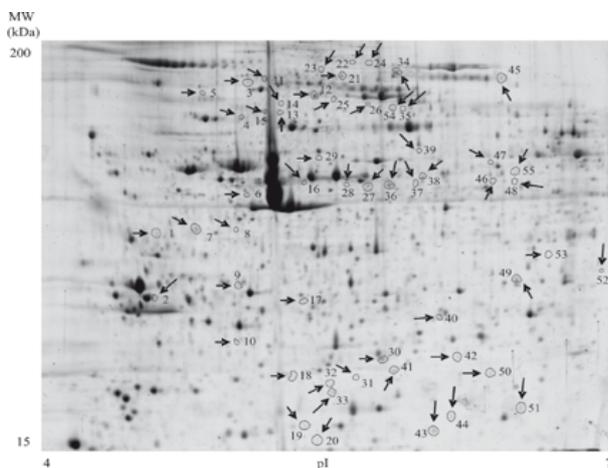


Figura 1. Imagen representativa del proteoma de plaquetas resaltando los 55 spots que varían entre pacientes SCASEST y controles crónicos.

Conclusión

Se ha empleado satisfactoriamente la proteómica de plaquetas basada en 2-DE para identificar 55 proteínas –provenientes de 30 genes diferentes– que varían entre pacientes SCASEST y controles crónicos. En próximos estudios investigaremos el papel de las proteínas identificadas en la patofisiología del SCA y exploraremos su uso potencial como biomarcadores para el tratamiento y/o prognosis de la enfermedad.

Agradecimientos

AG es investigador Ramón y Cajal del Dpto de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela; AFP es becario FPI del mismo departamento. Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (ref. SAF2007-61773), la Consellería de Educación de la Xunta de Galicia y la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña.

Bibliografía

- [1] Lindemann S, Krämer B, Seizer P y Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2007;5 Suppl 1:203-11.
- [2] García A, Prabhakar S, Brock CJ, et al. Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4:656-68.
- [3] García A, Prabhakar S, Hughan SC, et al. Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. *Blood* 2004;103:2088-95.
- [4] García A, Senis YA, Antrobus R, et al. A global proteomics approach identifies novel phosphorylated signaling proteins in GPVI-activated platelets: involvement of G6f, a novel platelet Grb2-binding membrane adapter. *Proteomics* 2006;6:5332-43.
- [5] Senis YA, Antrobus R, Severin S, Parguñá AF, Rosa I, Zitzmann N, Watson SP y García A. Proteomic analysis of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ outside-in signaling reveals Src-kinase-independent phosphorylation of Dok-1 and Dok-3 leading to SHIP-1 interactions. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2009;7:1718-26.