

COMUNICACIÓN SELECCIONADA

# LA METABOLÓMICA PERMITE UN DIAGNÓSTICO RÁPIDO Y PRECISO DE LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA

Forteza de los Reyes M.J., Bodi Peris V., Monleón Salvadó D., Sanchis Forés J., Núñez Villota J., Mainar Latorre L., Moratal Pérez D., Chorro Gascó F.J., Chaustre Mendoza F., Llácer Escorihuela A. Servicio de Cardiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA. Universitat de València.

## OBJETIVO.

Proporcionar un diagnóstico bioquímico preciso de la isquemia miocárdica es un reto en la actualidad en Cardiología. El objetivo del presente estudio es evaluar la utilidad del perfil metabólico del suero sanguíneo mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN), para detectar isquemia coronaria en cerdos y en pacientes.

## MÉTODOS.

Se indujo isquemia a 9 cerdos mediante el hinchado de un balón de angioplastia en la arteria coronaria descendente anterior izquierda. También se estudiaron veinte pacientes con diagnóstico de angina estable programados para ser intervenidos de angioplastia primaria y diez pacientes controles programados para diagnóstico por angiografía. Se extrajeron muestras de sangre antes de la intervención, y 10 minutos después (tras la angiografía en controles) para posteriormente determinar en  $500\mu\text{l}$  de plasma los espectros de RMN. Se usó un análisis multivariado de mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, PLS). Los componentes principales escogidos explicaron al menos el 70% de la varianza. La cuantificación de metabolitos se determinó mediante una rutina de ajuste de los picos de las señales más relevantes.

## RESULTADOS.

En cerdos y en pacientes, el análisis multivariable demostró llamativas diferencias antes y después de 10 minutos post-isquemia en las señales pertenecientes principalmente a cuerpos cetónicos y ácidos grasos. Se detectaron diferencias muy significativas entre controles (después de la angiografía) y en pacientes (tras la isquemia asociada a angioplastia) en esas señales. Basándose en esos metabolitos, se construyó un modelo simple discriminante de mínimos cuadrados parciales para distinguir pacientes de controles. Este modelo se validó con 10 réplicas aleatorias y con nuevos datos y detectó de manera muy precisa la isquemia miocárdica.

## CONCLUSIONES.

Los diferentes perfiles metabólicos aquí detectados en el plasma de pacientes isquémicos y no isquémicos podría proporcionar la base para un novedoso diagnóstico bioquímico de la isquemia miocárdica.

## INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica la realización de un diagnóstico rápido y preciso de la isquemia miocárdica continúa siendo un reto en cardiología<sup>1</sup>. Los protocolos de actuación sobre los pacientes que acuden a puertas de urgencias con dolor torácico de origen isquémico y sin necrosis miocárdica, incluyen determinaciones seriadas de marcadores cardíacos<sup>2</sup>, test de estrés<sup>3</sup> y en muchos casos ingresos innecesarios.

En ese sentido la incorporación de nuevas disciplinas que estudian un conjunto de variables moleculares de un sistema biológico, las denominadas "ómicas" nos permiten obtener una visión global de los cambios que acontecen a nivel molecular en el organismo cuando está sometido a condiciones determinadas<sup>4</sup>. La genómica estudia los cambios globales que se dan en el genoma de un organismo<sup>5</sup>; la transcriptómica estudia la dinámica de la expresión génica<sup>6</sup>; la proteómica estudia el conjunto de proteínas que componen una célula, tejido u organismo<sup>7</sup>, y la metabolómica estudia los cambios dinámicos que se producen en metabolitos de bajo peso molecular cuando el organismo está sometido a unas condiciones determinadas<sup>8</sup>.

De entre todas las "ómicas" la metabolómica es la disciplina que mejor permite discriminar los cambios dinámicos que ocurren en un organismo bajo condiciones determinadas, no es necesario esperar horas a que se expresen genes o proteínas debido a que los metabolitos cambian rápidamente en respuesta a alteraciones fisiológicas, lo que permite la detección de dichas alteraciones con gran precocidad. El análisis de lo que se conoce como la huella dactilar metabólica o metaboloma permite caracterizar el sistema de estudio en el momento de toma de la muestra<sup>9-10</sup>.

Comunicación presentada en el XXVII Congreso de la S. V. C., Peñíscola Mayo 2010.

Premio de la Excm. Diputación de Castellón a la mejor comunicación sobre Cardiología Experimental e Investigación Básica.

Recibida el 4 de Noviembre de 2010. Aceptada para publicación el 19 de Diciembre de 2010

**Correspondencia:** M<sup>a</sup> José Forteza de los Reyes.  
Avda. de El Cid, 160, pta. 11 - 46014 Valencia  
**E-mail:** m.josefa.forteza@uv.es

El presente estudio incluye la obtención de un modelo metabólico basado en el análisis del suero sanguíneo de una serie experimental de cerdos a los que se les induce isquemia y la validación del modelo en una serie de pacientes con angina estable. El propósito es evaluar la utilidad del perfil metabólico del suero para detectar isquemia coronaria en cerdos y en pacientes.

## MÉTODOS

### Estudio experimental

Con el propósito de identificar los metabolitos que estaban implicados en la isquemia primeramente se realizó una serie experimental con cerdos y se determinó el perfil de metabolitos en suero en situación basal y 10 minutos después de inducirles isquemia.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia y cumple todas las normas vigentes para el manejo de animales de experimentación. Según nuestro protocolo descrito anteriormente<sup>11</sup> se provocó isquemia a 9 cerdos domésticos de  $30 \pm 5$  kg de peso. Se anestesió a los animales con inyección intramuscular lenta con ketamina/medetomidina 8 mg/kg. Se les realizó entubación endotraqueal para ventilación mecánica y se mantuvieron anestesiados con propofol mediante infusión intravenosa continua a 8-9 mg/kg. h. Se realizó monitorización continua de presiones y electrocardiograma durante todo el procedimiento.

El procedimiento de isquemia experimental se realizó mediante introducción percutánea de un catéter de angioplastia Judkins right 4 a través de la arteria femoral derecha. Se accedió a la arteria descendiente anterior mediante una guía de angioplastia y se hinchó el balón de angioplastia durante 10 minutos, seguidamente se deshinchó y se permitió recuperarse a los animales, no se detectaron muertes ni complicaciones significativas.

Se realizaron extracciones de sangre periférica en situación basal (previo al procedimiento de isquemia), y a los 10 minutos de isquemia justo antes de deshinchar el balón. Se separó el suero mediante centrifugación a 1.500 g durante 15 minutos y seguidamente se congeló en alícuotas a  $-80$  °C.

### Estudio en pacientes

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de nuestro Hospital y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

Partiendo del modelo metabólico desarrollado previamente en la serie experimental, se compararon los cambios en metabolitos entre un grupo de pacientes con angina estable programados para angioplastia coronaria y un grupo control de pacientes con coronarias normales. Con el fin de identificar un perfil metabólico que permitiera

discriminar una situación de isquemia controlada.

El grupo de estudio consistió en 20 pacientes con angina estable sin necrosis programados para realizarles una angioplastia en el servicio de cardiología. En el momento de la colocación del stent se les indujo isquemia de modo controlado durante 1 minuto mediante el inflado del balón de angioplastia y se confirmó la interrupción del flujo coronario mediante inyección de contraste angiográfico. Ningún paciente murió ni tuvieron lugar complicaciones significativas.

Se realizaron extracciones de sangre periférica antes de la angioplastia y a los 10 minutos después. Se separó el suero mediante centrifugación a 1.500 g durante 15 minutos y seguidamente se congeló en alícuotas a  $-80$  °C.

Se incluyó un grupo control compuesto por 10 pacientes programados para angiografía y que presentaron coronarias normales. Se realizaron extracciones de sangre periférica antes de la angiografía y a los 10 minutos después. Se siguió el mismo protocolo de procesado de la muestra que en pacientes.

### Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN

A partir de una alícuota de 500  $\mu\text{l}$  de suero se obtuvieron los espectros RMN del suero de cerdos y de los pacientes. Las determinaciones se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance DRX 600 a 37 °C. Se realizó un experimento de pre-saturación de pulso único en todas las muestras. Se trabajó sobre una región de desplazamiento químico que incluyó resonancias de 0,5 a 4,7 ppm. Las integrales de los picos de las señales de los metabolitos seleccionados se cuantificaron mediante rutinas automatizadas de ajuste de picos.

### Análisis estadístico

Todos los datos se trasladaron al entorno de programación científica y matemática MATLAB (The MathWorks Inc. 2006) con el que se realizaron los análisis quimiométricos y se desarrolló el panel de metabolitos de interés. A continuación se buscaron correlaciones entre las distintas variables de este panel mediante técnicas avanzadas de análisis multivariable: Análisis de Componentes Principales (PCA), y Proyección de Estructuras Latentes para Análisis Discriminante (PLS-DA) con el software PLS-Toolbox (Eigenvector Research, Inc.). El análisis multivariable basado en el análisis de componentes principales permite agrupar las fuentes principales de variabilidad entre los datos analizados en lo que se conoce como "componentes principales" (PC) y les asigna un valor numérico de modo que permite visualizar las relaciones y patrones de asociación de los datos. En este caso se determinó que los componentes principales explicaran el 70% de la variabilidad de los datos. Los puntos correspondientes a los componentes principales se usaron para detectar las posiciones de las variables más discriminatorias en los es-

pectros de RMN.

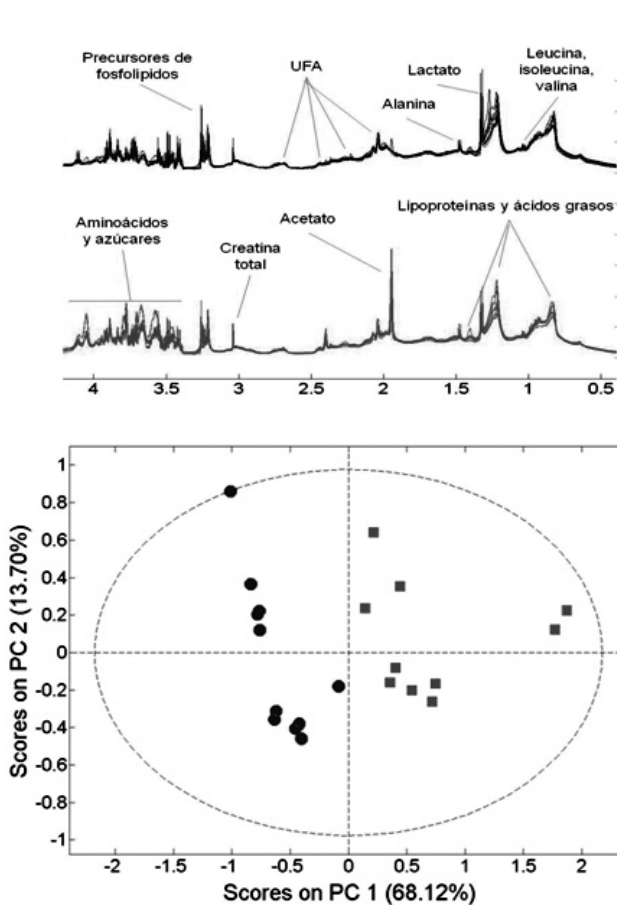
Las variables continuas se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar y se compararon mediante el test T para muestras independientes. Las proporciones se compararon con el test Chi-cuadrado. Los análisis de curvas ROC se realizaron para comprobar la fiabilidad de los perfiles metabolómicos. Se consideró significación estadística como  $p < 0,05$  y se calculó con el software SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

## RESULTADOS

### Estudio experimental

La figura 1A muestra el espectro RMN del suero de los cerdos en situación basal y tras 10 minutos de isquemia, se observaron diferencias significativas entre los picos del lactato, creatina y las regiones de los ácidos grasos y azúcares sobretodo.

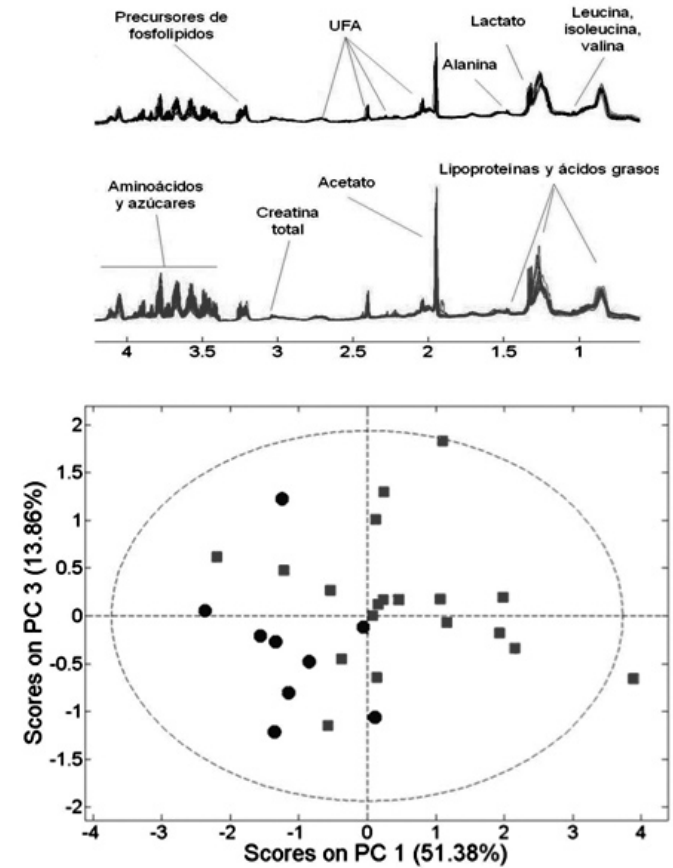
Posteriormente para analizar de modo global las consecuencias metabólicas de la isquemia se realizó un análisis multivariable basado en componentes principales, la figura



**Figura 1: Análisis metabolómico del modelo experimental**

Figura 1A: comparación de los espectros RMN solapados de todas las muestras de suero de cerdos en situación basal (azul) y situación isquemia (rojo). Los picos de los metabolitos más representativos aparecen marcados.

Figura 1B: análisis de componentes principales de los espectros RMN de los sueros de la serie experimental, en situación basal (círculos azules) y tras 10 minutos de isquemia (cuadrados rojos). Abreviaturas: UFA: ácidos graso insaturados. RMN: Resonancia magnética nuclear. PC: Componentes principales.



**Figura 2: Análisis metabolómico del modelo de isquemia controlada en pacientes**

Figura 1A: comparación de los espectros RMN solapados de todas las muestras de suero de pacientes controles (azul) y pacientes con isquemia (rojo). Los picos de los metabolitos más representativos aparecen marcados.

Figura 1B: análisis de componentes principales de los espectros RMN de los sueros de la serie de pacientes, controles (círculos azules) y en situación de isquemia controlada (cuadrados rojos). Abreviaturas: UFA: ácidos graso insaturados. RMN: Resonancia magnética nuclear. PC: Componentes principales.

Tabla 1. Características basales de los pacientes con isquemia controlada y de los controles.

Isquemia controlada	(n=20)	(n=10)	p
Controles			
Edad (media±DE. años)	64±10	66±10	0.4
Hombres (%)	15 (75)	4 (40)	0.1
Diabetes (%)	7 (35)	1 (10)	0.3
Fumador (%)	5 (20)	2 (20)	1.0
Hipertensión (%)	13 (65)	6 (60)	1.0
Hipercolesterolemia (%)	15 (76)	5 (50)	0.3
Angioplastia previa (%)	5 (25)	4 (40)	0.6
Revascularización previa (%)	5 (25)	4 (40)	0.6
Infarto previo (%)	9 (45)	4 (40)	1.0
Descenso del segmento ST (%)	4 (20)	2 (20)	1.0
Tratamiento con estatinas (%)	14 (70)	5 (50)	0.4

1B muestra la gráfica de puntos de componentes principales donde cada punto corresponde a una determinación, los puntos azules corresponden a las muestras obtenidas en situación basal y los cuadrados rojos a las muestras de isquemia. Se observa que tras los 10 minutos de isquemia se produce un cambio dramático en el perfil metabólico.

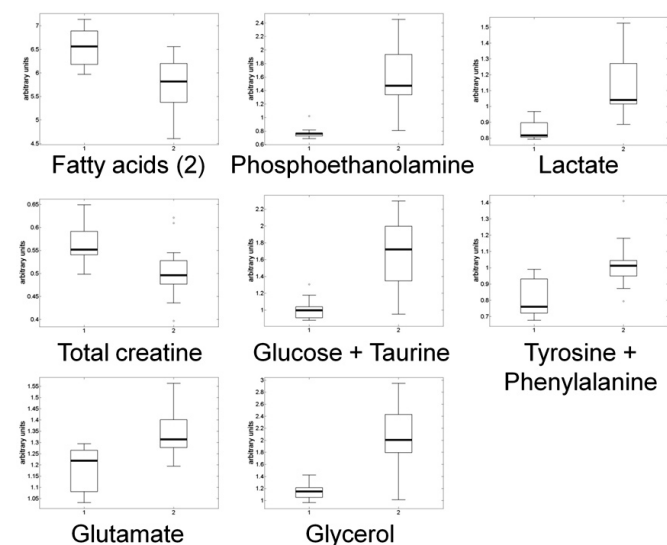


Figura 3: Principales metabolitos implicados en el modelo de isquemia experimental

Diagramas de cajas que representan los niveles de los metabolitos más significativos de la serie experimental en situación basal (caja izquierda) y tras 10 minutos de isquemia (caja derecha). La composición relativa está expresada como el área del metabolito de interés entre el total del área medida del espectro RMN.

A partir de los metabolitos que mostraron los cambios más significativos en el estudio experimental se desarrolló un modelo metabólico que permitía discriminar la situación de isquemia de la situación basal y se usó para el estudio en pacientes.

### Estudio en pacientes con isquemia controlada

En la tabla 1 se muestran las características basales del grupo de estudio.

Primeramente se observó que el perfil metabólico de pacientes con angina estable a los que se les había inducido isquemia transitoria en el momento de la colocación del stent difería significativamente del perfil de los pacientes controles (figura 2A).

El análisis de componentes principales de los sueros de pacientes con isquemia, al igual que en el estudio experimental, también mostró cambios muy significativos comparados con los sueros de pacientes controles (figura 2B).

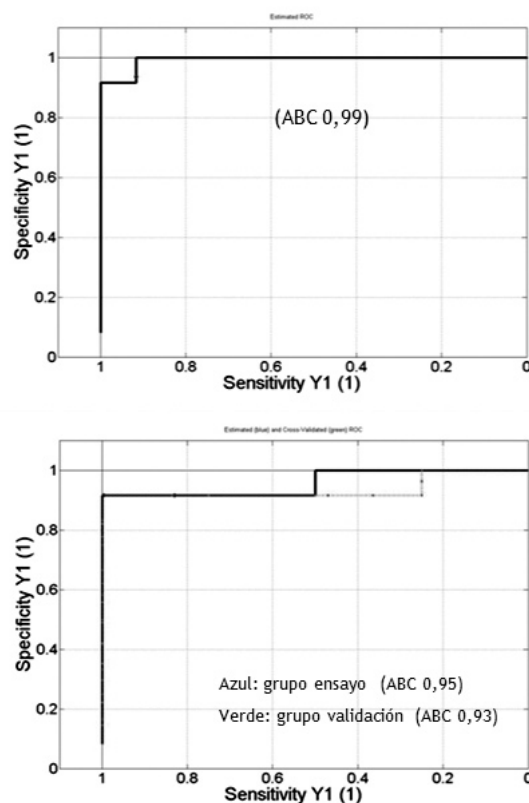


Figura 4: Análisis de la fiabilidad del modelo

Figura 4A: Curva ROC del grupo de estudio experimental (ABC: 0,99).

Figura 4B: Curva ROC del grupo de estudio de pacientes con isquemia controlada, línea azul grupo ensayo (ABC: 0,96), línea verde grupo validación (ABC: 0,93).

Abreviaturas: ABC: área bajo la curva.

La figura 3 muestra los metabolitos seleccionados en el modelo experimental que se validaron en el estudio en pacientes, los metabolitos que predominaron fueron aquellos implicados en el metabolismo energético.

Con el fin de determinar la fiabilidad del modelo metabólico desarrollado para discriminar pacientes a los que se les había inducido isquemia mediante el balón de angioplastia y los pacientes controles, se analizó el modelo mediante análisis de curva ROC, la figura 4 muestra la curva ROC y se observó un área bajo la curva de 0,96 para el modelo experimental y de 0,96 para el modelo en pacientes. Posteriormente este modelo se validó con 10 réplicas aleatorias y de nuevo volvió a ser altamente fiable con un área bajo la curva de 0,93.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el perfil metabólico del suero en situación de isquemia puede ser detectado mediante la espectroscopía de H+ RMN y que éste difiere significativamente del de una situación normal. Por otro lado se ha observado que estos cambios son muy dinámicos ya que en pocos minutos ya muestran cambios estadísticamente significativos.

### Cambios metabólicos en la isquemia miocárdica

En el momento de la interrupción completa del flujo sanguíneo, la isquemia compromete el suministro de oxígeno y de sustratos metabólicos, y como consecuencia se producen una serie de cambios en la respuesta metabólica global<sup>12</sup>.

El metabolismo energético del miocardio debe adaptarse a esta nueva situación, tras la isquemia, se produce un descenso rápido de los niveles de fosfato energético y la función contráctil decae rápidamente<sup>13</sup>. Se metaboliza todo el glucógeno y el lactato se acumula progresivamente produciendo acidosis celular debido a la hidrólisis anaerobia de la molécula de adenosin trifosfato (ATP)<sup>14</sup>. Nuestros datos coinciden con el aumento de lactato y este incremento se puede detectar a nivel sistémico ya que el incremento es muy significativo.

Otra de las consecuencias de la isquemia es la rápida depleción de ATP debido al cambio de un metabolismo puramente aerobio del miocardio a un metabolismo anaerobio. Las células comienzan a obtener la energía que necesitan a partir de la fosforilación a nivel de sustrato, es decir mediante la desfosforilación de la creatina fosfato en creatina<sup>15</sup>. El aumento en el pico de creatina total en la situación de isquemia tanto en animales como en pacientes apoya este hecho.

Muchos marcadores de necrosis no se pueden detectar hasta 4 horas después del daño irreversible, especialmente la creatina quinasa-MB, este enzima se encarga de realizar la reacción reversible de la fosforilación de creatina en creatina fosfato y en el músculo cardíaco está

presente en abundancia, cuando se encuentra elevado en sangre, es señal de daño en el miocardio ya que se ha liberado al exterior de la célula<sup>16</sup>. Para descartar la necrosis miocárdica, se realizaron determinaciones seriadas de los niveles de troponina I para descartar casos de infarto, y ningún paciente mostró niveles elevados. El hecho de que se detecten cambios significativos en los niveles de algunos metabolitos ya al cabo de 10 minutos indica que esta aproximación no sólo puede ser útil para detectar isquemia sino que también puede ser útil como diagnóstico muy sensible de leve daño miocárdico.

### Espectrometría de RMN como técnica de análisis metabólico para detectar isquemia miocárdica

La técnica empleada en este caso, la H+RMN de alta resolución se plantea como una opción muy atractiva para el uso en biomedicina ya que permite realizar un análisis fiable y sensible de los cambios metabólicos que tienen lugar<sup>17</sup>. Por otro lado en comparación con otras técnicas que se emplean actualmente para estudios en metabólica, tales como espectrometría de masas la espectrometría de H+RMN es una técnica no destructiva de la muestra, por lo que permite realizar posteriores mediciones sobre la misma muestra y además de sensible es muy rápida, ya que en 10 minutos permite obtener el resultado, debido a que la muestra se puede analizar directamente sin necesidad de procesamiento previo<sup>18-19</sup>.

Estudios previos ya demostraron una relación entre los cambios que acontecían en el perfil metabólico de suero de pacientes a los que se les había inducido isquemia someténdolos a ejercicio físico. Sabatine y col., mediante espectrometría de masas, observaron diferencias significativas en los perfiles metabólicos de plasma de pacientes a los que se sometía a test de estrés bajo condiciones monitorizadas<sup>20</sup>. Sin embargo debido al incremento en los niveles de ácido láctico y otros metabolitos del músculo esquelético enmascaraban los resultados de la isquemia del corazón y los autores no pudieron diferenciar casos de controles en algunos metabolitos.

Brindle y col.<sup>21</sup> comprobaron en un grupo de 76 pacientes a los que se les realizó angiografía coronaria sin ninguna situación de estrés que la espectrometría de H+RMN puede diagnosticar correctamente la severidad de la enfermedad coronaria aguda mediante el análisis multivariable de PLS-DA.

### Diagnóstico bioquímico de la isquemia miocárdica

Los metabolitos circulantes pueden entenderse tanto como nuevos marcadores como por su papel directo en el proceso de la isquemia, este aspecto ha sido poco estudiado. Las vías del metabolismo celular son prácticamente idénticas entre las distintas especies lo que facilita el estudio con la utilización de modelos animales<sup>22-23</sup>. Por lo que en una primera aproximación la cardiología expe-

rimental juega un papel fundamental en este estudio, ya que para poder definir el modelo de los metabolitos que experimentaban cambios en la situación de isquemia el uso del modelo animal y el cerdo, por su similitud con el corazón humano fue decisivo en este sentido.

De todo lo expuesto se deduce que las posibilidades que ofrece la metabolómica para mejorar el conocimiento fisiopatológico y diagnóstico de la isquemia miocárdica son enormes e implican un esfuerzo interdisciplinar. Ya que para poder detectar los metabolitos de interés clínico se requiere la colaboración de bioquímicos para las determinaciones, ingenieros para los análisis bioinformáticos y los cardiólogos para poder aplicar desde el punto de vista

práctico los hallazgos de laboratorio en la clínica. Es con la integración de todas las disciplinas cuando se permite avanzar en la investigación traslacional.

### Conclusiones e implicaciones clínicas

A través de un enfoque traslacional en el presente estudio se ha desarrollado un perfil metabólico que permite discriminar una situación de isquemia controlada. Sin embargo para su posterior utilización como diagnóstico este modelo debe ser validado en un grupo externo de dolor torácico sin isquemia inducida y para ello se requieren estudios adicionales que permitan avanzar en este campo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lee T.H., Goldman L. Evaluation of the patient with acute chest pain. *N Engl J Med* 2000; 342: 1.187-1.195.
- Gerszten R.E., Wang T.J. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature* 2008; 451: 949-952.
- Sanchis J., Bosch X., Bodí V. et al. Combination of clinical risk profile, early exercise testing and circulating biomarkers for evaluation of patients with acute chest pain without ST-segment deviation or troponin elevation. *Heart* 2008; 94: 311-315.
- Gehlenborg N., O'Donoghue S.I., Baliga N.S. et al. Visualization of omics data for systems biology. *Nat Methods* 2010; 7: S 56-68.
- Nielsen R. Genomics: In search of rare human variants. *Nature* 2010; 467: 1.050-1.051.
- Wang D., Bodovitz S. Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 281-290.
- Patterson S.D., Aebersold R.H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 311-323.
- Nicholson J.K., Lindon J.C. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008; 455: 1.054-1.056.
- Holmes E., Wilson I.D., Nicholson J.K. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* 2008; 134: 714-717.
- Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K. Metabonomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J* 2007; 274: 1.140-1.151.
- Bodí V., Sanchis J., Mainar L. et al. Right ventricular involvement in anterior myocardial infarction: a translational approach. *Cardiovasc Res* 2010.
- Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85: 1.093-1.129.
- Jennings R.B., Reimer K.A. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 225-246.
- Yellon D.M., Hausenloy D.J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1.121-1.135.
- Reimer K.A., Jennings R.B., Tatum A.H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 1983; 52: 72A-81A.
- Chan D., Ng L.L. Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Med* 2010; 8: 34.
- Coolen S.A., Daykin C.A., van Duynhoven J.P. et al. Measurement of ischaemia-reperfusion in patients with intermittent claudication using NMR-based metabonomics. *NMR Biomed* 2008; 21: 686-695.
- Weljie A.M., Newton J., Mercier P., Carlson E., Slupsky C.M. Targeted profiling: quantitative analysis of <sup>1</sup>H NMR metabolomics data. *Anal Chem* 2006; 78: 4.430-4.442.
- Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W.B., Harrigan G.G., Kell D.B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 245-252.
- Sabatine M.S., Liu E., Morrow D.A. et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation* 2005; 112: 3.868-3.875.
- Brindle J.T., Antti H., Holmes E. et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* 2002; 8: 1.439-1.444.
- Lewis G.D., Asnani A., Gerszten R.E. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *JACC* 2008; 52: 117-123.
- Barba I., Jaímez Auguets E., Rodríguez Sinovas A., García Dorado D. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *Magma* 2007; 20: 265-271.