

**TROMBOSI CARDIOVASCULAR
NOUS ABORDATGES PER A L'ESTUDI
DE LES PLAQUETES**

DISCURS

Llegit en l'acte d'ingrès de l'Acadèmica Numerària

Molt Il·ltre. Dra. Lina Badimon Maestro

Celebrat el dia 9 de desembre de 2009

DISCURS DE CONTESTACIÓ

A càrrec de l'Acadèmic Numerari

Molt Il·ltre. Dr. Joan Uriach Marsal

Barcelona
2009

*L'Acadèmia no es fa solidària
de les opinions que s'exposen en les
publicacions de les que és responsable
l'autor.*

AGRAÏMENTS

*Excel·lentíssim senyor president,
Molt Il·lustres senyores i senyors acadèmics,
senyores i senyors,
estimats amics*

És per a mi un honor presentar aquest discurs d'entrada com Acadèmica de Número a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya.

És també un honor i privilegi especial prendre la Medalla del Professor Josep Antoni Salvà Miquel qui fos primer professor i després col·lega en el meu treball en farmacologia.

I és per a mi un honor comptar amb el suport del Dr. Joan Uriach i Marsal i de tots els excel·lents professionals membres numeraris d'aquesta Acadèmia que m'ha acollit al seu si.

Són molts aquells a qui dec el ser aquí i ara.

Són tots aquells que ajudaren a fomentar el meu interès en els llibres, aquells que instil·laren en mi el desig de conèixer i investigar, són aquells que em demostraren la seva confiança en les meves possibilitats de contribuir a l'avançament del coneixement.

Foren els meus pares, els meus professors d'ensenyança mitja, els meus professors d'universitat, els meus mentors, els meus companys i col·legues. Tots ajudaren a conformar el meu caràcter i la meva carrera científica.

Més tard, el recolzament del meu espòs i dels meus dos fills ha estat fonamental per a que jo desenvolupés una activitat competitiva a nivell internacional.

Finalment els meus col·laboradors que al llarg de la meva carrera han estat claus en que les idees, els projectes i les hipòtesis es desenvolupessin, completessin i arribessin a bon port.

Com veuen i he dit són molts a qui jo dec el ser aquí i ara. La meva circumstància vital m'ha estat favorable. He estat envoltada de persones excepcionals que m'han empès, ajudat a tota hora i permès ser aquí.

A tots ells els dono les gràcies.

ÍNDIX

Trombosi cardiovascular. Nous abordatges per a l'estudi de les plaquetes	7
La plaqueta.	7
Aplicació de tècniques proteòmiques a l'estudi del perfil proteic plaquetari	9
Perfil proteòmic de les plaquetes en estat basal	13
Perfil proteòmic de les plaquetes activades	15
Perspectives futures	18
Referències.	19

TROMBOSI CARDIOVASCULAR. NOUS ABORDATGES PER A L'ESTUDI DE LES PLAQUETES

Les síndromes coronàries agudes com l'infart de miocardi o l'angina inestable, l'infart cerebral i les complicacions isquèmiques en la malaltia arterial perifèrica són manifestacions clíniques produïdes per processos trombòtics que es desenvolupen sobre les plaques arterioscleròtiques¹. Les malalties cardiovasculars, com manifestació de l'aterotrombosi, són la primera causa de mort al món originant quasi el 38% de totes les defuncions.

Les plaquetes, són el principal component cel·lular en els processos trombòtics associats a plaques arterioscleròtiques trencades. Per això, els tractaments antiplaquetaris han adquirit una especial rellevància en la prevenció de la malaltia isquèmica coronària.² No obstant, cada vegada major nombre d'evidències indiquen la importància d'investigar i identificar noves dianes terapèutiques que ajudin a reduir l'impacte de les malalties d'origen aterotrombòtic.

A l'era postgenòmica, l'aplicació de noves tecnologies entre les que s'inclou la proteòmica permet la identificació de patrons proteics diferencials en situacions fisiopatològiques específiques. La integració d'aquesta metodologia amb d'altres igualment noves com la genòmica funcional i amb tècniques bioquímiques clàssiques, està revelant proteïnes i vies moleculars que poden portar a noves alternatives en la prevenció i tractament de la patologia cardiovascular.

La plaqueta

Les plaquetes són components cel·lulars que es produeixen en la medul·la òssia a partir de fragments citoplasmàtics dels megacariòcits, per la qual cosa son mancants de DNA genòmic.³ En absència de processos d'activació, les plaquetes romanen en el torrent circulatori durant uns 10 dies, mantenint-se en estat quiescent, amb un nivell

mínim d'interacció amb altres components cel·lulars de la sang i la paret vascular. No obstant, en presència d'estímuls externs, com pot ser la pèrdua d'endoteli vascular i l'exposició de components de la matriu extracel·lular, com col·lagen o factor de von Willebrand (vWF), que s'uneixen a receptors de la superfície de la plaqueta, s'inicien complexos mecanismes de senyalització i un ampli espectre d'interaccions cel·lulars. Les plaquetes, no només són els efectors cel·lulars clau en el procés d'hemostàsia primària i manteniment de la integritat vascular, sinó que intervien també en processos inflamatoris^{4,5} i de resposta immune.⁶ A més, cada vegada es coneixen un major nombre de vies per les quals les plaquetes contribueixen a la formació i progressió de les lesions ateroscleròtiques, així com en els processos trombòtics que es produeixen després de l'erosió o ruptura de plaques ateroscleròtiques.⁷

Activació plaquetària

Els processos d'adhesió i agregació plaquetària o la interacció plaqueta-leucocit són conseqüència de mecanismes d'activació, en els que hi participen diferents proteïnes de membrana (receptores, molècules d'adhesió etc.) i complexos vies de senyalització. Com conseqüència de l'activació plaquetària se secreten mediadors proteics al microentorn que actuen de manera autocrina o paracrina (ex. mitògens i factors d'inflamació) induint la migració de leucocits a l'íntima vascular així com mecanismes moleculars i funcions cel·lulars amb potencial efecte en la progressió i complicació de la patologia cardiovascular.⁸

Independentment de l'estímul que produeix l'activació plaquetària, aquesta està regulada, en la seva via final, a través de l'activació del receptor plaquetari GPIIb/IIIa. Aquest receptor és la proteïna més abundant a la superfície plaquetària i està compost per 2 subunitats proteiques (la IIb i la IIIa). L'activació d'aquest receptor suposa un canvi conformacional en les dues subunitats, de manera que exposen un domini d'unió per a diversos lligands. El fibrinogen (d'origen plasmàtic o plaquetari) és la proteïna que s'uneix majoritàriament al receptor GPIIb/IIIa i la seva estructura dimèrica permet la seva interacció amb dues plaquetes simultàniament, afavorint així l'agregació plaquetària i la trombosi. Existeixen altres lligands de la GPIIb/IIIa que també hi participen, encara que en menor grau, en la interacció plaqueta-plaqueta com són el vWF, la fibronectina, la vitronectina i el CD40 lligand.⁹

La identificació i caracterització de proteïnes involucrades en les vies de senyalització, així com en la interacció amb receptors de membrana associats a l'activació i agregació plaquetària, com en el secretoma plaquetari i l'estudi de la seva funció, obre la possibilitat a noves dianes i estratègies farmacològiques en la teràpia antiplaquetes. De fet, la recerca de nous fàrmacs antiplaquetaris, de major efectivitat i amb menors efectes secundaris, és una àrea cabdal en la investigació cardiovascular.¹⁰

Degut al caràcter anucleat de les plaquetes, l'anàlisi del proteoma és la millor estratègia per l'estudi dels mecanismes bioquímics i moleculars relacionats amb la seva funció. La plaqueta reté certa quantitat de mRNA funcional provinent del megacariòcit i la maquinaria translacional necessària per a la síntesi de proteïnes.¹¹ No obstant, els seus nivells són molt reduïts per la qual cosa l'anàlisi del transcriptoma pot veure's emmascarat per interferència de cèl·lules contaminants (eritròcits, leucòcits) i els resultats poden ser difícils d'interpretar degut a la continua disminució dels nivells de mRNA en absència de transcripció gènica.¹² La disponibilitat d'utilitzar les noves tecnologies per examinar el perfil proteic d'una manera global i integrada facilita l'anàlisi dels factors determinants i mecanismes moleculars involucrats en la funció plaquetària i la seva resposta a agents antiplaquetaris. El repertori de proteïnes de la plaqueta depèn del perfil d'expressió del seus precursors, per la qual cosa les alteracions en la regulació de respostes plaquetàries podrien estar condicionades a canvis en els processos de senyalització dels megacariòcits i en les funcions d'aquests progenitors cel·lulars. Això fa que s'obri una nova perspectiva d'investigació en la patologia cardiovascular i teràpia antiplaquetària.

Aplicació de tècniques proteòmiques a l'estudi del perfil proteic plaquetari

La recent seqüenciació del genoma humà ha posat en evidència que el grau de complexitat dels organismes és conseqüència d'un ampli espectre proteic.

El proteoma pot definir-se com el conjunt de proteïnes, incloent-hi totes les seves isoformes i modificacions postransduccionals com poden ser fosforilacions, glicosilacions, sulfatacions, entre d'altres, que estan presents en una cèl·lula, teixit o organisme en un moment específic,

sota unes condicions determinades i són reflex de la seva activitat funcional.¹³ El desenvolupament de la tecnologia proteòmica ha estat possible gràcies al coneixement i disponibilitat de bases de dades del genoma i als avenços, tant tècnics com conceptuals en diferents àrees relacionades, com la separació i identificació de proteïnes, i de manera més específica, al descobriment i desenvolupament de mètodes sensibles i eficaços per a la ionització de proteïnes.¹⁴ Això ha permès que les tècniques d'espectrometria de masses anessin adquirint cada vegada més rellevància com a mètodes escollits en l'anàlisi de complexes mostres de proteïnes, fins el punt que avui en dia és l'eina primordial en els estudis proteòmics.

Com part de la proteòmica plaquetària s'entén no només el mapatge global de l'espectre de proteïnes de la cèl·lula, sinó també la identificació i caracterització de proteïnes associades a estructures i relacionades amb funcions plaquetàries específiques així com la dissecció de cascades de senyalització intracel·lular (Figura 1). L'anàlisi proteòmica implica la separació i identificació des de varis centenars a més de mil proteïnes a un mateix temps, el que s'aconsegueix mitjançant la tècnica d'electroforesi bidimensional (2DE) o cromatografia líquida multidimensional i espectrometria de masses (Figura 2).

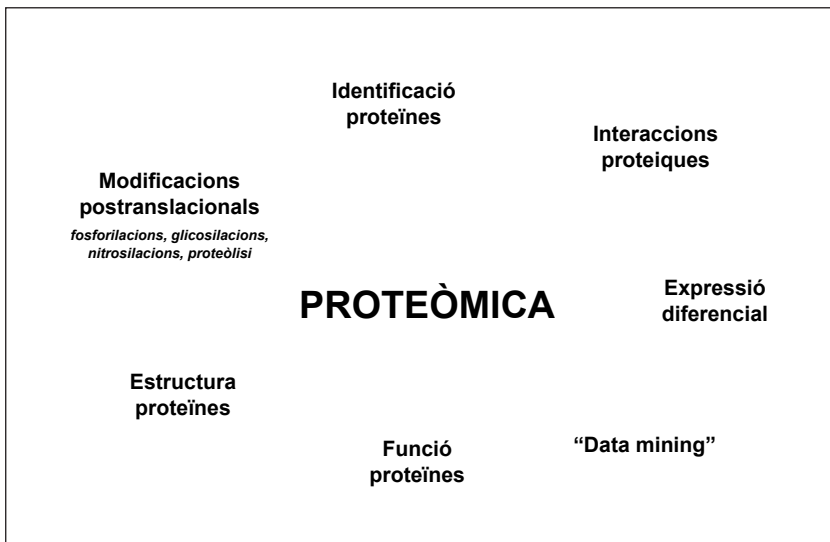


Figura 1. Representació esquemàtica dels components bàsics d'estudi en una plataforma de tecnologia proteòmica actual.

Electroforesi bidimensional

La tècnica de 2DE permet la separació de les proteïnes d'una mostra biològica, en una primera dimensió per isoelectroenfocament, en base al seu punt isoelèctric (pI) al llarg d'un gradient de pH (per exemple, pH 3-10) i en una segona dimensió, mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE-SDS), en relació al seu pes molecular (MW).¹⁵ La recent millora en la sensibilitat i reproductibilitat dels estudis proteòmics basats en aquesta tècnica electroforètica és degut als avenços en aquesta metodologia que inclouen el desenvolupament de tires amb diferents gradients immobilitzats de pH de reduïts intervals (pH 4-5, 5-6 etc.), que permeten analitzar amb detall les regions d'interès;¹⁶ la inclusió de noves substàncies caotròpiques i detergents que afavoreixen la solubilització de proteïnes, especialment les de membrana, la utilització de nous marcadors fluorescents altament sensibles i solubles en aigua^{17,18} i la millora en la sensibilitat i reproductibilitat dels equipaments d'escaneig i programes informàtics específics de digitalització i anàlisi (PDQuest, Melanie, DeCyder etc).

Espectrometria de masses

Les proteïnes d'interès són extretes dels gels i digerides normalment amb tripsina de manera que es genera un conjunt de pèptids característics per a cada proteïna que permetrà en funció de les seves masses, la identificació de la proteïna de la qual provenen per espectrometria de masses amb l'ajut de programes de cerca i potents bases de dades (SWISS-PROT, TrEMBL). A la proteòmica s'utilitzen fonamentalment dos tipus de tecnologies basades en l'espectrometria de masses (MS), la coneguda com MALDI-TOF ("matrix assisted laser desorption ionization-time of flight") i les que inclouen sistemes de ionització per "electrospray" (ESI-MS)¹⁷ i cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS).¹⁹ Aquestes darreres són a més les més utilitzades en processos d'identificació i caracterització de proteïnes plaquetàries basades en la seqüenciació de pèptids originats per digestió amb tripsina o en l'anàlisi de modificacions post-transduccionals com fosforilacions o glicosilacions.²⁰

L'anàlisi global del proteoma d'una cèl·lula, encara que analíticament factible, presenta severes limitacions degut a l'ampli rang dinàmic que es troben les proteïnes, aproximadament diferències de 5-log entre les proteïnes de major i menor abundància. Així doncs, l'estudi de subproteomes específics representa una bona estratègia per a millorar la

sensibilitat a l'anàlisi del proteoma plaquetari i analitzar la seva resposta davant d'estímuls externs.

Perfil proteòmic de les plaquetes en estat basal

L'extracció seqüencial de les plaquetes, basant-nos en la diferent solubilitat de les proteïnes en tampons específics,²¹ permet la separació del proteoma en fraccions subcel·lulars enriquides en (1) proteïnes del citosol, (2) proteïnes del citosquelet i de membrana. Aquest procediment és suficient per augmentar de forma significativa (aproximadament 2-3 vegades) el nombre de "spots" proteics detectats i reduir la complexitat dels sistemes proteics facilitant la seva anàlisi. La Figura 3 mostra comparativament el patró de distribució de proteïnes obtingut per electroforesi bidimensional a partir d'extractes enriquits en proteïnes

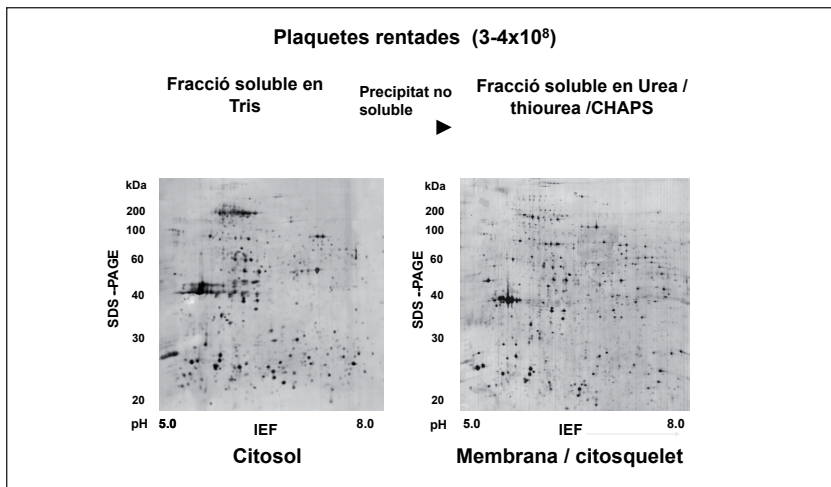


Figura 3. Mapa proteòmic representatiu, obtingut per 2DE, del subproteoma de (A) fracció citosòlica i (B) fracció enriquida en proteïnes de citosquelet/membrana de plaqueta. L'interval de pH d'isoelectroenfocament és de 5 a 8 i els gels de poliacrilamida estan fets al 12%. Proteïnes visualitzades amb tinció de plata seguint una metodologia compatible amb espectrometria de masses.

citosòliques i proteïnes de membrana/citosquelet obtingudes de plaquetes porcines en estat basal.²² Dintre d'un rang de pH de 5 a 8 se separen 543 "spots" proteics en la fracció citosòlica i 356 en el subproteoma enriquida en proteïnes de membrana/citosquelet. En ambdós subproteomes, els "spots" proteics presenten un patró de distribució

similar en el que es refereix a pesos moleculars (70% inferior a 65 kDa), mentre que la fracció enriquida en proteïnes de membrana/citosquelet presenta un major nombre de “spots” proteics a pH més àcids que les proteïnes de la fracció citosòlica, la qual cosa podria associar-se amb un major nombre de formes fosforilades en aquesta fracció (Figura 4).

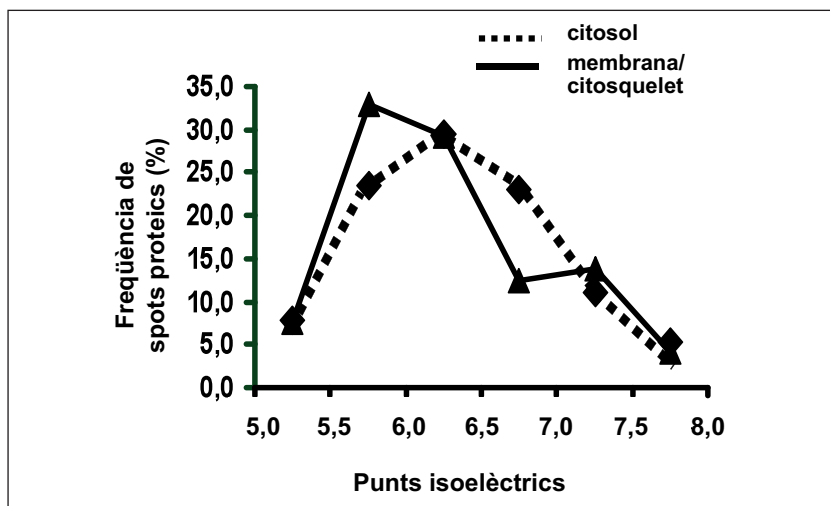


Figura 4. Freqüència de distribució de “spots” proteics en la fracció citosòlica i de citosquelet/membrana en funció dels seus punts isoelèctrics. Valors s’expressen com percentatge del nombre total de “spots” proteics detectats en cada gel.

Altres mètodes de subfraccionament utilitzats a l’estudi del proteoma plaquetari inclouen: (1) anticossos específics i tècniques d’immunoprecipitació per a l’obtenció de subproteomes determinats,²³ (2) la utilització de lecitines per a l’obtenció de fraccions enriquides en glicoproteïnes, la concanavalina A (Con A) i l’aglutinina del germen de blat (WGA) s’han utilitzat àmpliament en la investigació de glicoproteïnes,^{24,25} i (3) tècniques d’ultracentrifugació per a l’obtenció de micropartícules. Aquests fragments de membrana, alliberats al medi després de l’activació plaquetària han mostrat tenir una elevada activitat procoagulant.^{26,27} En un recent estudi proteòmic, García i col·laboradors han identificat 578 proteïnes com constituents d’aquest proteoma subcel·lular.²⁸ Tal com s’esperava, moltes d’aquestes representaven proteïnes plaquetàries ja caracteritzades. No obstant, aproximadament el 60% de les proteïnes que s’han identificat no s’han descrit anteriorment en estudis del proteoma plaquetari, el que suggereix que les micropartícules tenen una composició proteica peculiar.

Pel que es refereix al proteoma plaquetari és interessant remarcar que el major grup de proteïnes identificat correspon a proteïnes de senyalització (24%), seguit de proteïnes involucrades en la síntesi i degradació de proteïnes (22%). Es desconeix fins al moment si aquestes proteïnes són importants des d'un punt de vista funcional o simplement s'han incorporat a la plaqueta durant el procés de segregació del megacariocit.²⁹

Perfil proteòmic de les plaquetes activades

L'activació de les plaquetes i l'adhesió a superfícies vasculares desendotelitzades implica canvis extremadament ràpids i marcats en la seva morfologia i composició. Així doncs, les plaquetes passen de tenir una forma discoïdal a presentar nombrosos pseudopodis originats a partir de la membrana plasmàtica,³⁰ s'agregen i secreten el seu contingut granular. Des d'un punt de vista proteòmic, l'activació plaquetària implica alteracions en el nivell de detecció i distribució per compartiment d'un gran nombre de proteïnes, així como modificacions a nivell de postransducció.

Resultats del nostre grup mostren que l'activació *in vitro* de plaquetes amb trombina (0,5 U NIH/mL), indueix alteracions en el 77% de les formes proteiques que se separen per 2DE en la fracció citosòlica i en el 68% de les que es detecten en la fracció enriquida en proteïnes de citosquelet i membrana. Tal com es mostra en la Figura 5, en el citosol, el major percentatge de modificacions correspon a proteïnes que disminueixen el seu nivell de detecció en una taxa superior a 2 (43%) mentre que en la fracció de citosquelet/membrana el major nombre de proteïnes diferencials refereixen a aquelles que han incrementat el seu nivell de detecció (32%).

Entre els més de 300 tipus de modificacions postransducció que s'han descrit fins a dia d'avui,³¹ les fosforilacions juguen un paper primordial en la regulació de les cascades de senyalització que ocorren en les plaquetes. Basant-se en tècniques d'immunoprecipitació per a poder analitzar el proteoma de la fosfotirosina, han estat identificades 76 formes proteiques en plaquetes activades amb trombina que no estan presents en plaquetes en estat de repòs.³² Una àmplia anàlisi proteòmica de les cascades de senyalització intracel·lular a la plaqueta requereix, no obstant, la integració de diferents metodologies de subfraccionament i anàlisi. El marcatge de proteïnes fosforilades amb P³², juntament amb electroforesi bidimensional per a la separació de proteïnes i tecnologia

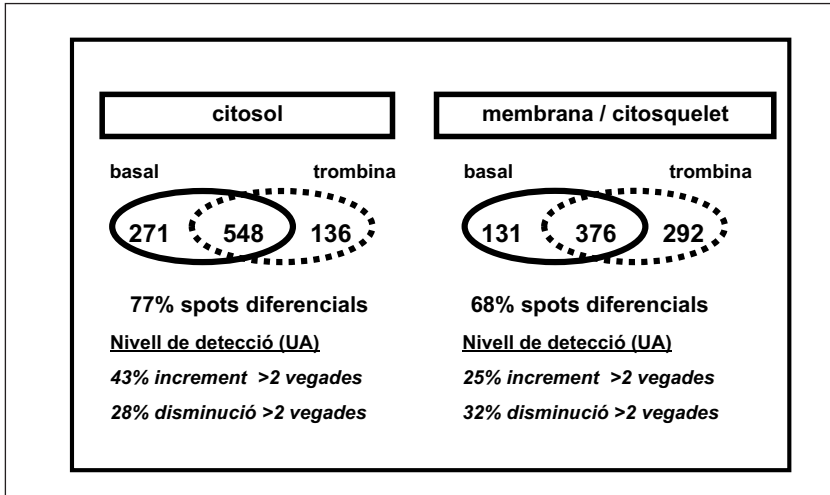


Figura 5. Comparació del nombre de “spots” proteics diferencials (augments/disminucions) identificats en les fraccions de citosol i citosquelet/membrana entre plaquetes basals i activades *in vitro* amb 0,5 NIH/mL trombina.

Maldi-TOF i nano-LC-MS-MS com estratègies d’anàlisi, ha permès identificar diferents isoformes de la pleckstrina, el major substrat de la proteïna cinasa C a la plaqueta, i diferents proteïnes citosquelètiques, com components proteics rellevants en plaquetes activades.³³

De fet, la reorganització del citosquelet que succeeix durant el procés d’activació plaquetària obre noves perspectives a l’estudi de proteoma citosquelètic ja que aquest podria posar de manifest noves dianes terapèutiques dirigides a impedir la pèrdua de forma discoide de la plaqueta durant la seva activació evitant d’aquesta manera processos derivats com l’adhesió o agregació plaquetària.

Anàlisi proteòmica i identificació de nous mecanismes d’acció de fàrmacs antiplaquetaris

Els fàrmacs nitrovasodilatadors són àmpliament utilitzats en pacients amb patologia coronària estable degut al seu caràcter vasodilatador.³⁴ No obstant això, cada vegada un major nombre d’evidències atribueixen propietats antiplaquetàries a nous donadors d’òxid nítric (NO), suggerint un potencial benefici antitrombòtic per aquests donadors. L’anàlisi proteòmica de plaquetes provinents d’animals tractats per via oral amb dosis terapèutiques d’un donador d’òxid nítric, en forma de nitrat-tiol,

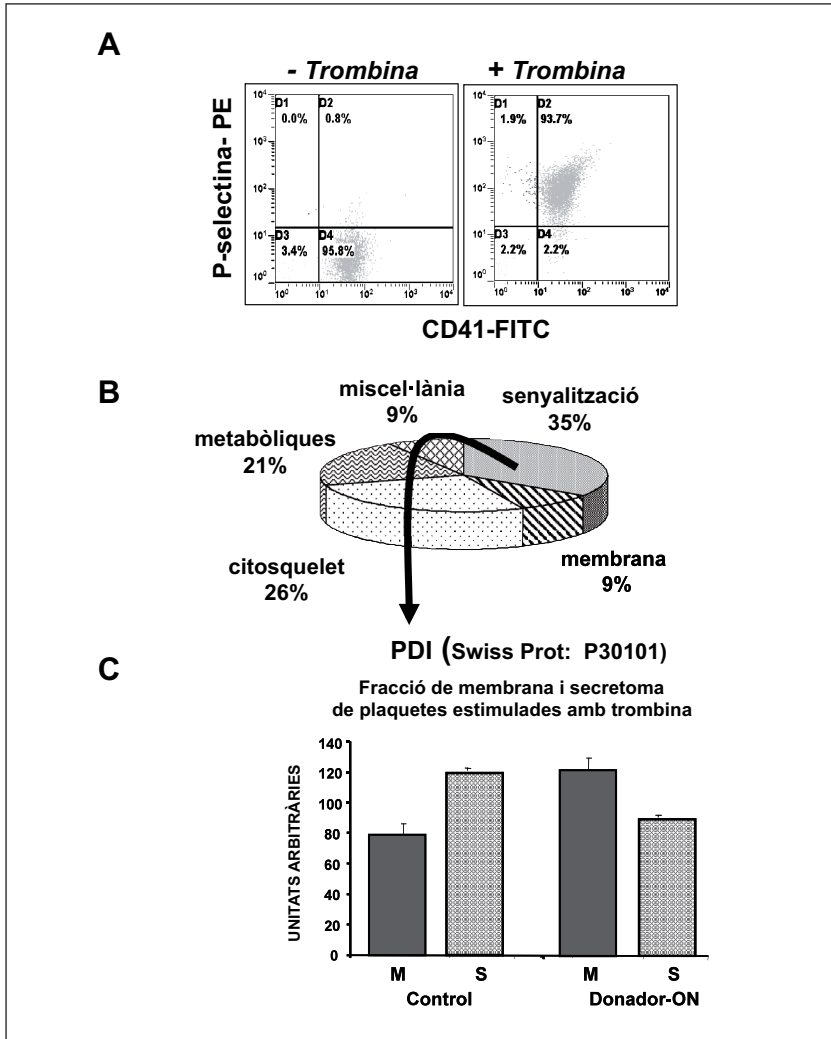


Figura 6. (A) Anàlisi per citometria de flux de P-selectina en plaquetes (CD41 positives), sense activar i activades amb 0,5 NIH/mL trombina. Anàlisi realitzada en plaquetes no permeabilitzades a fi i efecte de detectar únicament P-selectina a nivell de membrana plasmàtica plaquetària com marcador de plaquetes activades. Notar que la població de plaquetes estimulada amb trombina és positiva tant per a CD41 com P-selectina (esdeveniments positius en el quadrant superior dret). (B) Efecte del tractament oral amb un donador d'òxid nítric (NO) en el proteoma plaquetari. A la gràfica circular es mostra la distribució de proteïnes diferencials, segons la seva funció, detectades en plaquetes provinents d'animals abans (basal) i després de 9 dies de tractament. Amb la finalitat d'identificar l'efecte del donador de NO, l'estudi s'ha efectuat en plaquetes estimulades *in vitro* amb 0,5 NIH/mL trombina. (C) Nivells de PDI obtinguts a partir de l'anàlisi per "western blot" d'extractes de membrana/citosquelet plaquetari i sobrenadants provinents de plaquetes d'animals tractats amb/sense donadors de NO.

durant un període de nou dies i activades *in vitro* amb trombina posa de manifest la implicació, principalment de proteïnes de senyalització i del citosquelet, en els mecanismes d'acció antiplaquetaris induïts pel donador de NO (Figura 6). Una de les proteïnes de senyalització identificades que sembla estar implicada en la passivació plaquetària induïda pel donador de NO és la proteïna disulfur isomerasa (PDI).³⁵ Recentment i com es mostra a la referència 35, el nostre grup ha demostrat que en les plaquetes activades amb trombina augmenta l'expressió de PDI de la superfície de la plaqueta, el que podria facilitar la interacció plaqueta-plaqueta i subsegüent agregació plaquetària.³⁵ El PDI, té també una funció d'alliberació de NO de compostos donadors de NO i portadors de grups tiol.³⁶ Mitjançant anàlisi proteòmica i per "western blot" s'observa un augment de PDI en la fracció de membrana en plaquetes d'animals tractats amb el fàrmac, mentre que es redueix la forma secretada. Cal remarcar que en ambdues funcions del PDI hi participa el mateix centre actiu³⁶, el que sembla indicar que el tractament amb el donador de NO disminueix la secreció de PDI induït per trombina, que portaria a atenuar l'activació irreversible induïda per aquest agonista plaquetari.

Perspectives futures

La integració de noves tecnologies a l'àrea de genòmica i proteòmica funcional s'espera que proporcioni una poderosa eina per l'estudi de la biologia plaquetària. Aquest nou coneixement permetrà identificar processos biològics complexos rellevants per a la funció plaquetària i amb repercussió en processos patològics mediat per plaquetes com en el cas de la patologia aterotrombòtica coronària, vascular-cerebral i perifèrica.

REFERÈNCIES

1. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation*. 1992; 86: III74-85
2. Harrington RA, Becker RC, Ezekowitz M et al. Antithrombotic therapy for coronary artery disease: The seven ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:513S-548S.
3. Italiano JE Jr, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1174-1182.
4. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3378-3384
5. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-594
6. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*. 2004;25:489-95.
7. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Eng J Med*;2007;357:2482-2494.
8. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation*. 1993;87:II3-16
9. Cho J, Mosher DF. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood*. 2006;107:3555-63
10. von Bruchhausen F, Walter U. Platelets and their factors. Berlin. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 1997; pp753
11. Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, et al. Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest*. 2005;115:3370-3377.
12. Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, et al. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood*. 2003;101:2285-2293.

13. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422:193-197.
14. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422:198-207
15. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4:3665-3685
16. Hebert B. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1999;20:660-663.
17. Rozanas CR, Loyland SM. Capabilities using 2-D DIGE in proteomics research : the new gold standard for 2-D gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2008;441:1-18
18. Ball MS, Karuso P. Mass spectral compatibility of four proteomics stains. *J Proteome Res*. 2007;6:4313-4320
19. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*. 2001;101:269-295.
20. Yang Y, Zhang S, Howe K, Wilson DB, Moser F, Irwin D, Thannhauser TW. A comparison of nLC-ESI-MS/MS and nLC-MALDI-MS/MS for GeLC-based protein identification and iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *J Biomol Tech*. 2007;18:226-237
21. Padró T, Peña E, García-Arguinzonis M, Llorente-Cortes V, Badimon L. Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain. *Cardiovasc Res*. 2008;77:211-220.
22. Padró T, Peña E, Molins B, Vilahur G, Badimon L. Effect of nitric oxide on the platelet proteome of thrombin activated platelets. *Eur Heart J*. 2006; 27(Abtract Suppl) (P4537): 753
23. Chung KY, Walker JW. Interaction and inhibitory cross-talk between endothelin and ErbB receptors in the adult heart. *Mol Pharmacol*. 2007;71:1494-1502.
24. Temporini C, Calleri E, Massolini G, Caccialanza G. Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins. *Mass Spectrom Rev*. 2008;27:207-236.
25. Chen P, Liu Y, Kang X, Sun L, Yang P, Tang Z. Identification of N-glycan of alpha-fetoprotein by lectin affinity microarray. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134: 851-860.
26. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med*. 2008;263:528-537.

27. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.* 2007;97:425-434
28. Garcia BA, Smalley DM, Cho H, et al. The platelet microparticle proteome. *Proteome Res.* 2005;4:1516-1521.
29. García A, Watson SP, Dwek RA, Zitzmann N. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24:918-930
30. Fox JE. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost.* 1993;70:884-893
31. Krishna RG, Wold F. Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1993;67:265-98.
32. Wynne KJ, Harney DF, O'Donoghue NM, Stephens G, Fitzgerald DJ. Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics.* 2002;2:642-648.
33. Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer HE. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis.* 2000;21:2622-2636
34. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med.* 1998;19;338:520-531.
35. Vilahur G, Pena E, Padró T, Badimon L. Protein disulphide isomerase-mediated LA419- NO release provides additional antithrombotic effects to the blockade of the ADP receptor. *Thromb Haemost.* 2007;97:650-657.
36. Essex DW, Chen K, Swiatkowska M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood.* 1995;86:2168-2173.

DISCURS DE CONTESTACIÓ

A càrrec de l'Acadèmic Numerari

Molt Il·lustre Dr. Joan Uriach Marsal

*Excel·lentíssim Sr. President,
Molt Il·lustres Senyores y Senyors Acadèmics,
Distingides Autoritats,
Senyores i Senyors,*

Sembla que era ahir quan vaig tenir l'honor i el privilegi de donar la benvinguda a la Dra. Lina Badimón i Maestro com a membre corresponent d'aquesta Reial Acadèmica de Farmàcia de Catalunya. Sempre hem sentit una gran admiració per la fermesa i el rigor del treball que, sense defallir en cap moment, ha forjat com a farmacèutica investigadora, traslladant els seus coneixements arreu del món i portant sempre ben alta la nostra senyera farmacèutica.

Nascuda a Barcelona, ja de petita va donar mostres d'una gran curiositat per tot el que l'envoltava. Mica en mica, va dirigir la seva educació i els seus coneixements cap a la vessant científica i més concretament cap a la investigació en el camp de la salut. No voldria allargar-me massa en aquesta part, donat que ja ho vaig exposar abastament en la seva presentació com a acadèmica corresponent d'aquesta docta casa.

Han passat quasi 7 anys i per això em limitaré solament a comentar, de manera abreujada, tot el que ha fet des de l'any 2003, que no és poc. Citaré només les darreres aportacions al seu currículum:

84 publicacions originals en Revistes Internacionals d'alt impacte científic

14 publicacions de revisió o actualització

27 Capítols de Llibres Nacionals i Internacionals

160 Comunicacions presentades a Congressos Nacionals i Internacionals

13 Tesis Doctorals dirigides

Membre de 16 Societats Científiques

Membre del Comitè Editorial de 18 revistes científiques internacionals

Únic membre associat espanyol de la "European Vascular Genomics Network" (des del 2006)

Convidada per a efectuar 160 ponències (Conferències i Lliçons Magistrals) en Reunions Nacionals i Internacionals.

President de la “*Mediterranean League Against Thromboembolic Diseases Foundation*” (MLTD Foundation)

“*Visiting Professorship*” a la Manchester Metropolitan University

Membre del Comitè Científic Extern de 6 Institucions de Recerca/ Biomedicina Nacionals i 2 Estrangers.

Premis i Distincions :

Distingida amb la «Creu de Sant Jordi» de la Generalitat de Catalunya» (2004)

Soci d'Honor de la Societat Catalana d'Hipertensió Arterial (2004)

President (Chair) del “Working Group on Thrombosis” de la European Society of Cardiology (ESC) (2004)

Membre del “Council for Basic Cardiovascular Science” de la European Society of Cardiology (ESC) (2006-2008)

Nomenada “Distinguished Fellow” (Membre Distingit) de la “International Atherosclerosis Society” (2007).

Escollida membre del “Board” del “Working Group on Coronary Pathophysiology and Microcirculation” de la European Society of Cardiology (ESC) (2008)

Premi “Fundación Lilly Investigación Biomédica Preclínica” (2008)

Premi “Joan Codina Altés” Societat Catalana de Cardiologia (2009)

Soci d'Honor de la “Sociedad Española de Arteriosclerosis” (2009)

I ara, reglamentàriament, em toca fer un petit comentari sobre el seu discurs d'ingrés, sota el títol: **“Trombosi cardiovascular: una àrea en ràpida evolució. Nous abordatges per a l'estudi de les plaquetes”**.

Des del punt de vista científic, avui està totalment demostrada la importància de la plaqueta activada en la gènesi i desenvolupament dels processos trombòtics, associats a la ruptura de plaques arterioscleròtiques, que dona lloc a síndromes coronaris aguts. En són exemples clars l'infart de miocardi, l'angina inestable, l'infart cerebral i les complicacions isquèmiques de la malaltia arterial perifèrica.

Igualment, la utilització de fàrmacs que inhibeixen aquesta activació plaquetària i aquests processos trombòtics està clarament demostrada.

Això explica que es continuïn investigant nous abordatges farmacològics per aconseguir una millor i més efectiva inhibició de l'activació

plaquetària. En aquest sentit, les noves tecnologies aplicades a un millor i més exhaustiu coneixement de la plaqueta i dels mecanismes de la seva activació pot ajudar a assolir aquest objectiu.

En les darreres dècades, ha tingut un desenvolupament extraordinari el que es coneix amb el nom genèric de tecnologia “OMICA”, que inclou diferents disciplines com la GENÒMICA i la METABOLÒMICA, i especialment la PROTEÒMICA.

En el discurs de la Dra Badimón es posa de manifest la importància que està tenint en els darrers anys l'aplicació de la PROTEÒMICA al coneixement i la identificació de diverses proteïnes, així com la transformació que aquestes proteïnes pateixen quan la plaqueta s'activa.

En el procés d'activació de les plaquetes intervien diverses proteïnes que amb aquesta nova tecnologia, la PROTEÒMICA, s'ha pogut caracteritzar i conèixer com canvia la seva estructura quan s'activen.

Part de la investigació realitzada per l'equip de la Dra Badimón ha estat orientada a aquest coneixement, i per això s'han hagut d'aplicar els darrers avenços en la tecnologia d'electroforesi bidimensional i espectrometria de masses, entre d'altres, per aprofundir en el coneixement del perfil proteòmic de les plaquetes en estat basal, i com es modifica aquest perfil un cop han estat activades, tot observant les alteracions que s'hi produeixen, modificacions que fins i tot afecten al seu citoesquelet i, per tant, a la seva morfologia.

En certa forma, conèixer aquestes alteracions ajudarà a dissenyar fàrmacs més específics que permetran interactuar amb aquestes proteïnes per impedir, en darrer terme, l'activació de les plaquetes i així poder prevenir de manera més eficaç els fenòmens trombòtics abans esmentats.

Una de les proteïnes identificada per l'equip de la Dra Badimón, que s'allibera de la superfície plaquetària en el procés d'activació de la plaqueta, i d'interacció d'unes plaquetes amb les altres, es la “Disulfido Isomerasa” o PDI . Aquesta proteïna no s'allibera, o almenys no tant, per fàrmacs donadors d'òxid nítric. Amb aquest descobriment, s'explicaria en part el perquè de l'acció antiagregant plaquetària d'aquests tipus de fàrmacs, i és un exemple de com el coneixement més aprofundit del perfil proteic de la plaqueta, en el seu estat activat, pot permetre l'estudi de nous fàrmacs antiplaquetaris.

La Dra. Badimón posa de manifest que en el futur pròxim hi haurà un increment de la investigació en el coneixement d'aquests perfils proteics de la plaqueta. L'aplicació de la PROTEÒMICA i altres tecnologi-

es emergents permetrà un millor abordatge farmacològic per inhibir-ne l'activació.

Com hem vist, la seva responsabilitat i la gran il·lusió per la recerca farmacèutica l'ha portat a descobrir noves fites en aquest camp, i no vull deixar de recalcar que, malgrat la crisi i els problemes que ens envolten, ella no ha defallit mai, ha buscat noves idees i ha treballat per aconseguir la competitivitat necessària per tirar endavant i amb eficàcia el nostre país.

Sembla que vaig tenir una premonició en finalitzar el meu anterior discurs de presentació, citant aquests versos d'Homer:

*“Tens un greu deure amb els gentils del poble:
Compartir amb ells els plecs del teu mantell...”*

I ho hem vist: aquell mantell s'ha estès i el disseny s'ha complert amb escreix. Sempre ha trobat un ajut en la seva família, tant per part dels seus fills Juan Carlos i Giomar, com el recolzament del seu marit Carles, que ha patit les seves inquietuds i les seves absències. L'enhorabona per a tots tres.

Per acabar, sols em resta felicitar, en nom de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya a la Dra. Badimón, i pregar al Sr. President que faci el lliurament de manera solemne a la nova acadèmica numerària de la medalla i el títol que l'acrediten com a tal, amb el convenciment que en tot moment sabrà fer honor a la confiança que l'Acadèmia posa en ella i que les seves aportacions l'enriquiran i contribuiran a fer-la encara més gran i prestigiosa.

Moltes gràcies a tothom.