

Expertos Invitados

NUEVAS NOCIONES ACERCA DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES GPIIB / GPIIIA



Columnista Experto de SIIC

Autor:

Dermot Cox

Department of Clinical Pharmacology, Royal College of Surgeons in Ireland

Institución:

Royal College of Surgeons in Ireland, Dublín, Irlanda

El descubrimiento del receptor del fibrinógeno plaquetario (GPIIb/IIIa) fue promisorio acerca del desarrollo final de un agente antiagregante de las plaquetas.¹ Dado que la unión del fibrinógeno es un requisito indispensable para la agregación plaquetaria, las drogas que la inhiben fueron consideradas el más poderoso y efectivo agente antiplaquetario que podía esperarse. Se utilizaron tres estrategias para desarrollar los antagonistas GPIIb/IIIa. La primera fue los anticuerpos monoclonales. El anticuerpo 7E3 fue elaborado en humanos y el fragmento fab se comercializó como abciximab.² La segunda estrategia utilizó péptidos de veneno de víbora, que contienen alrededor de 70 aminoácidos (desintegrinas) y son muy potentes antagonistas de esta GP.³ Se incorporaron al comercio como eptifibatide, un pequeño péptido cíclico.⁴ Si bien ambas estrategias producen muy potente efecto, no son activas por vía oral y solamente pueden ser administradas por vía endovenosa. Por lo mismo, su uso en forma rápida parece ser el único posible. Como se consideraba que el tratamiento ideal debía ser oral, varias empresas desarrollaron pequeñas moléculas inhibitoras. La primera fue el tirofiban.⁵ A pesar de que se trata de una pequeña molécula no peptídica, no resultó ser activa a través de la vía deseada y actualmente se la emplea como compuesto intravenoso. Han sido elaborados diversos compuestos activos por vía oral, entre los que se cuentan xemilofiban,⁶ orbofiban,⁷ lotrafiban⁸ y sibrafiban.⁹

Los estudios clínicos favorecen el uso de inhibidores de la GPIIb/IIIa. El abciximab, eptifibatide y tirofiban mostraron beneficios en el tratamiento de síndromes agudos coronarios (SAC)¹⁰ y como adyuvantes en la angioplastia coronaria (AC).¹¹ Hubo gran expectativa cuando estos compuestos de administración oral ingresaron en ensayos clínicos. A pesar de ser más potentes que sus contrapartidas endovenosas, estudios como EXCITE (xemilofiban),¹² OPUS (orbofiban),¹³ BRAVO (lotrafiban)¹⁴ y SYMPHONY (sibrafiban)^{15,16} no mostraron beneficios en el tratamiento. De hecho, hubo tendencia hacia mayor número de eventos en los grupos de tratamiento.¹⁷ Esto plantea un problema muy desconcertante: ¿Cómo puede una droga administrada por vía oral no ofrecer beneficios cuando se compara con otra similar dada por vía endovenosa?

Objetivo

Una diferencia importante entre las drogas orales y las endovenosas la constituyen los distintos objetivos con que fueron utilizadas en las pruebas clínicas. Los preparados intravenosos fueron usados en el SCA o la AC, y mostraron efectividad. Ello confirma el papel de las plaquetas en el SCA y en la oclusión posterior a la AC. Sin embargo, los compuestos orales se emplearon en pacientes de alto riesgo durante uno a dos años para la prevención de eventos posteriores. Estas son estrategias terapéuticas claramente diferentes. Se asumió que los eventos que ocurren en los pacientes con SCA son los

mismos que aquellos que sobrevienen en pacientes con enfermedad cardíaca crónica. Los inhibidores orales fueron usados en esta nueva área terapéutica con un efecto no probado sobre las plaquetas. El problema al emplear una droga en un área terapéutica nueva es la dificultad para explicar el eventual fracaso. Cuando la droga no funciona, ¿ello es debido a la selección de un objetivo inadecuado o a una mala droga? Varios de los pacientes de alto riesgo no lo eran en absoluto, mientras que las tasas de eventos fueron relativamente bajas en el grupo placebo. Posiblemente, las plaquetas no son tan importantes en los eventos de este grupo de pacientes, es decir, el objetivo puede haber sido inadecuado. ¿Hubo problemas con las drogas orales, esto es, eran malas drogas? El tratamiento de pacientes agudos con un compuesto oral hubiera sido un mejor estudio clínico para analizar. Como éste es un grupo de pacientes conocido, para responder la pregunta sería posible confirmar que la droga funciona y determinar los regímenes de dosis apropiados. En consecuencia, nuevos objetivos podrían ser seleccionados y validados.

Biodisponibilidad

Con drogas orales, la biodisponibilidad es un factor importante. Todos los antagonistas GPIIb/GPIIIa que fueron estudiados en ensayos clínicos tenían baja biodisponibilidad (aproximadamente entre 10% y 30%)^{7,18,19} con efectos alimentarios sustanciales. Este fenómeno suponía amplia diferencia entre el pico superior y el inferior de la droga en plasma, lo que habría sido exacerbado en los pacientes que hubieran perdido algunas dosis. Con análisis de 6 meses a 1 año de duración es esperable cierto número de dosis perdidas. La biodisponibilidad no hubiera sido un problema en el caso de la administración endovenosa.

Dosis

Los antagonistas de la GPIIb/IIIa tienen relaciones de dosis-respuesta muy estrechas; además, existe acuerdo acerca de que con el uso de estos fármacos el sangrado es una complicación. En consecuencia, las dosis fueron seleccionadas para minimizar el riesgo de hemorragia.

Este procedimiento estuvo limitado por la elección del ensayo para fijar las dosis. Para varias de las drogas hay una diferencia importante en sus valores de IC₅₀ cuando se comparan dosis bajas de agregación plaquetaria inducida por ADP con agregación plaquetaria inducida por TRAP. En muchos casos la combinación entre el deseo de evitar problemas de sangrado y el uso de un ensayo inapropiado genera la utilización de dosis subterapéuticas sobre los pacientes. Esto es significativo, ya que los beneficios de las drogas endovenosas se manifiestan solamente con niveles elevados de ocupación del receptor. En ciertos casos la dosificación por debajo de lo necesario fue deliberada. Se formó una opinión en los médicos generales acerca de que sería deseable 50% a 60% de la ocupación del receptor para el tratamiento crónico en el grupo placebo mientras que era necesaria el 90% para el tratamiento agudo. Para complicar todavía más las cosas, no había clara indicación del esquema a emplear. ¿Era el 50% de inhibición con ADP o con TRAP? Mientras los antagonistas de la GPIIb/IIIa son eficaces para inhibir la agregación plaquetaria inducida por todos los agonistas, hay una diferencia significativa en el IC₅₀ entre los diferentes tipos y en distintos esquemas.¹⁸ No obstante, no hay evidencia de que bajos niveles de ocupación del receptor provean beneficio para el uso crónico. En estudios clínicos de los compuestos orales hubo evidencia de bajos niveles de ocupación del receptor.²⁰ De hecho, hay inclusive pruebas de que este fenómeno también ocurre en pacientes bajo tratamientos intravenosos.²⁰

Agonismo parcial

Mientras que las dosis subterapéuticas pueden explicar de hecho un nivel reducido de eficacia para los antagonistas orales de la GPIIb/IIIa, no pueden explicar la falta total de beneficio con tendencia hacia el incremento en los eventos trombóticos. Como parte de la fase II del estudio para el orbofiban, nosotros evaluamos los efectos del tratamiento sobre la función plaquetaria. Para nuestra sorpresa, los pacientes tratados mostraban aumento en los marcadores de la activación plaquetaria en comparación con los controles.^{21,22} Esto reforzaría la evidencia acerca de un incremento en los eventos trombóticos en pacientes tratados. No obstante, no explica por qué un agente antiplaquetario puede reforzar más que inhibir la activación plaquetaria. Originalmente, GPIIb/IIIa fue visto sólo como un complejo de unión con el fibrinógeno sobre las plaquetas.

Aunque el hecho de que fue siempre denominado *receptor del fibrinógeno*, nunca se lo consideró verdaderamente como tal. Una de las propiedades clave de los receptores es la de comportarse como traductor de señales, y como la acción intracelular del GPIIb/IIIa es muy corta y no poseía dominios de señales conoddos, no se pensaba que fuese capaz de intervenir en este proceso. Ciertamente, las integrinas en general fueron consideradas como moléculas de adhesión celular y no como receptores. Sin embargo, pronto apareció evidencia indicadora de que las integrinas desempeñaban alguna función en la señalización.

En algunas células, la adhesión a la matriz fue requerida para una función celular normal. Esta adhesión fue muy específica, ya que tenía que involucrar la ligadura de integrinas a uniones especiales. Los receptores de integrinas parecían generar señales accesorias que aplicaban la célula a la función.²³ Pese a la creciente evidencia en favor del papel de las integrinas en la señalización, siguió considerándose que la GPIIb/IIIa carecía de actividad de señalización celular dado que la unión del fibrinógeno ocurrió después de la activación plaquetaria, por lo que no hubo evidencia de que existiera un papel de señalización del GPIIb/IIIa. De todos modos, estas drogas inhiben la agregación, así que, ¿cuál es la diferencia?

Recientemente ha habido una progresiva toma de conciencia sobre la importancia de la GPIIb/IIIa mediada por señales de adentro hacia fuera. Es claro que los dominios citoplasmáticos de la glucoproteína son importantes en la transducción de señales.²⁴ El receptor ha demostrado también poseer actividad de isomerasa de disulfuro.²⁵ Esta capacidad para reubicar las uniones disulfuro puede ser esencial en los procesos de señalización. La unión del fibrinógeno no es el paso final en la agregación, mientras que la señal generada por la unión de éste también es fundamental. La naturaleza de la señal es desconocida; sin embargo, parece ser independiente del tromboxano tal como todos los pacientes que presentan marcadores de activación plaquetaria lo fueron sobre la aspirina.

La capacidad de señalización del GPIIb/IIIa puede ser importante en el fracaso de los agentes orales. La señalización mediada por el receptor sobre sí mismo parece tener escaso efecto, como los antagonistas de la GPIIb/IIIa no tienen efectos detectables sobre la función plaquetaria a cualquier dosis. No obstante, en la presencia de un agonista débil tal como una concentración umbral de ADP, bajas concentraciones de los inhibidores causan aumento en la agregación plaquetaria.²¹ Farmacológicamente, esto ha sido descrito como agonismo parcial. Sin embargo sería más adecuado describirlo como un sistema de función dual de receptor con alto porcentaje de receptores de repuesto. GPIIb/IIIa media la ligadura cruzada de plaquetas vía fibrinógeno y también genera señales de activación. El fibrinógeno, como molécula divalente, tiene tanto la capacidad de ligar en forma cruzada dos receptores como generar una señal mientras que los antagonistas pueden activar el receptor pero no realizar la unión cruzada. Así, hay agonistas completos para la señalización y antagonistas completos para la agregación. Hay elevado porcentaje de receptores de repuesto, y la ocupación de un número relativamente pequeño de receptores por el fibrinógeno es suficiente para provocar la agregación plaquetaria. Igualmente, la ocupación de unos pocos receptores es suficiente para disparar un máximo de señales. Este mecanismo es responsable de la estrecha relación dosis-respuesta con estas drogas.

Además si un escaso número de receptores es ocupado por el antagonista de la GPIIb/IIIa, puede ser generada una señal de activación mientras que al mismo tiempo hay suficientes receptores libres para permitir la agregación que va a acontecer. Esta señal de activación es débil, pero actuará para amplificar otras señales. En el caso de pacientes con SCA, hay numerosas fuentes de estímulos protrombóticos para iniciar un evento trombótico.

Sitios de unión regulados por ligandos

Cuando los inhibidores de la GPIIb/IIIa se unen a ella, ésta sufre cambios de conformación.²⁶ Tales cambios pueden ser identificados por anticuerpos que reconocen epitopes específicos dependientes de la droga, conocidos como sitios de unión regulados por ligandos (SURL). Hay dos clases de SURL con un tipo de epitope que se torna expuesto sobre la unión con la droga (sitios de unión inducidos por ligandos, SUIL)²⁷ y el otro se atenúa sobre la unión con la droga (sitios de unión atenuados por ligandos, SUAL).²⁸ Estos cambios de conformación están asociados con la activación del receptor,

que genera que las plaquetas en reposo fijadas en la presencia del inhibidor y lavadas se vuelvan competentes para ligar el fibrinógeno soluble.²⁹ Esto parece independiente de la activación de la plaqueta y es probablemente debido a que la droga abre el sitio de unión, que permanece abierto después de la exposición al paraformaldehído. D3GP3 es un ejemplo de anticuerpo que reconoce un SUIL, pero no liga a las plaquetas excepto en presencia del antagonista de la GPIIb/IIIa.³⁰ Mab2 es un ejemplo de anticuerpo sensible a SUAL mediado por drogas, mientras que su unión está disminuida en la presencia de algunos antagonistas de la GPIIb/IIIa.³¹

Es posible dividir a estos antagonistas en dos grupos, según sus efectos sobre los SURL. En un grupo está el abciximab, que no tiene actividad SUAL, en tanto que todos los inhibidores de moléculas pequeñas, tanto IV como orales, están en el otro grupo como mediadores de la actividad SUAL.³¹ Todas las drogas clínicamente utilizadas tienen baja actividad SUIL, sugiriendo que ésta puede no tener participación en los efectos protrombóticos de los antagonistas de la GPIIb/IIIa. Los datos clínicos confirman esta división, ya que el abciximab ha demostrado fehacientemente mayor eficacia que las moléculas pequeñas, aun los compuestos IV.³² Tal cosa indica que la inducción de SUAL puede ser la clave de los problemas con los antagonistas de la GPIIb/IIIa.

Farmacocinética y antagonistas de la GPIIb/IIIa

Existe un polimorfismo conocido de la GPIIb/IIIa caracterizado por una sustitución de prolina (PLA₁) por leucina (PLA₂) en la posición 33 de la GPIIIa. Se lo ha tomado como factor de riesgo en la enfermedad cardiovascular.³³ También hay evidencia de que la afinidad de los antagonistas de la GPIIb/IIIa para el receptor está afectada por el polimorfismo de PLA₂.³⁴ En el estudio OPUS, el orbofiban se asoció con mayor número de eventos en la población con PLA₂, mientras que tuvo un efecto reducido sobre el sangrado.³⁵ Esto puede ser explicado por una afinidad menor del orbofiban a la forma PLA₂ del receptor, lo que explicaría los menores efectos sobre la hemorragia (menor inhibición) y el riesgo aumentado (menor inhibición). Los efectos de activación plaquetaria del orbofiban pueden ser mayores sobre la forma PLA₂ de la GPIIb/IIIa.

Qué anduvo mal con los antagonistas GPIIb/IIIa

El fracaso de los antagonistas obedeció a una combinación de factores, varios de los cuales no resultaron exclusivos de los compuestos orales. El primer problema fue la elección del objetivo. El tratamiento crónico con un antagonista de la GPIIb/IIIa en la prevención de futuros eventos fue un objetivo no probado y el grado de inhibición requerido no era conocido. Se ignora si estos eventos en los pacientes crónicos están mediados por plaquetas. Para el caso, se ha sugerido que el espasmo vascular puede ser la causa primaria. Las plaquetas pueden jugar un papel en la secreción vasoactiva de los agentes sólo cuando están activadas.³⁶ El agonismo parcial fue un problema con todos los inhibidores orales pero no difirió de lo que sucedió con los compuestos IV. Sin embargo, en combinación con la baja biodisponibilidad y el tratamiento crónico, este fenómeno podría llevar a una situación de protrombosis. La baja biodisponibilidad lleva a niveles mínimos de la concentración de la droga muy bajos y el tratamiento crónico a una oportunidad mayor de que el paciente pierda una dosis, que genere a su vez concentraciones mínimas aún más bajas. Este fenómeno fue además exacerbado por el papel del polimorfismo PLA₂, que contribuía a valores de inhibición más bajos todavía. La combinación de las concentraciones mínimas bajas y el agonismo parcial causan aumento en la activación plaquetaria. Este problema no existe con los compuestos IV; mientras los pacientes experimentan un nivel plasmático alto continuo de la droga a lo largo del período de tratamiento, también su exposición a la droga es sólo por un tiempo limitado.

Futuro de los antagonistas de la GPIIb/IIIa orales

Pese al fracaso de los inhibidores orales en los ensayos clínicos, hay todavía una esperanza para esta clase de agentes. Uno de los problemas con los ensayos iniciales es que el procedimiento científico básico no se ha completado. Hay limitada comprensión sobre el funcionamiento normal de los antagonistas de la GPIIb/IIIa. Actualmente comprendemos mucho más acerca de los mecanismos de señalización de este receptor. Los inhibidores deberían tener elevada biodisponibilidad para asegurar niveles plasmáticos estables. No deberían poseer actividad agonista parcial a pesar de que se desconoce si esto es posible, porque todas las drogas poseen cierta forma de agonismo

parcial. No deberían inducir tanto SUIL como SUAL. Si bien no hay evidencia trascendente de que alguna de ellas está involucrada en el fracaso de las drogas orales, es prudente minimizar los problemas potenciales. Finalmente, también es importante elegir el objetivo clínico adecuado. La indicación para alguno de los nuevos inhibidores orales debería ser la misma de los compuestos IV. Existe una categoría terapéutica probada y la droga funcionaría eficazmente. La dosis inicial se debe administrar durante una a dos semanas y, si este esquema resulta exitoso, entonces se podría extender la ventana de tratamiento. No obstante, aun para indicaciones en condiciones agudas hay necesidad de preparaciones orales. Una formulación por tal vía sería más económica, más sencilla de administrar y permitiría que más pacientes accedan a esta alternativa terapéutica.

BIBLIOGRAFIA

1. Nachman RL, Leung LL. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. *J Clin Invest* 1982;69:263-9.
2. Lefkowitz J, Ivanhoe RJ, Califf RM, Bergelson BA, Anderson KM, Stoner GL, Weisman HF, Topol EJ. Effects of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Blockade by a Chimeric Monoclonal Antibody (Abciximab) on Acute and Six-Month Outcomes After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction. *The American Journal of Cardiology* 1996; 77: 1045-1051.
3. McLane MA, Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;219:109-19.
4. Scarborough RM. Development of eptifibatide. *Am Heart J* 1999; 138:1093-104.
5. The RESTORE Investigators. Effects of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Blockade With Tirofiban on Adverse Cardiac Events in Patients With Unstable Angina or Acute Myocardial Infarction Undergoing Coronary Angioplasty. *Circulation* 1997;96:1445-1453.
6. Simpfendorfer C, Kottke-Marchant K, Lowrie M, Anders RJ, Burns DM, Miller DP, Cove CS, DeFranco AC, Ellis SG, Moliterno DJ, Raymond RE, Sutton JM, Topol EJ. First Chronic Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Blockade : A Randomized, Placebo- Controlled Pilot Study of Xemilofiban in Unstable Angina With Percutaneous Coronary Interventions. *Circulation* 1997;96:76-81.
7. Nicholson NS, Abood NA, Panzer-Knodle SG, Frederick LG, Page JD, Salyers AK, Suleymanov OD, Szalony JA, Taite BB, Anders RJ. Orbofiban: an orally active GPIIb/IIIa platelet receptor antagonist. *Med Res Rev* 2001;21:211-26.
8. Liu F, Craft RM, Morris SA, Carroll RC. Lotrafiban: an oral platelet glycoprotein IIb/IIIa blocker. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:2673-87.
9. Cannon CP, McCabe CH, Borzak S, Henry TD, Tischler MD, Mueller HS, Feldman R, Palmeri ST, Ault K, Hamilton SA, Rothman JM, Novotny WF, Braunwald E. Randomized Trial of an Oral Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonist, Sibrafiban, in Patients After an Acute Coronary Syndrome : Results of the TIMI 12 Trial. *Circulation* 1998;97:340-349.
10. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Theroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet* 2002;359:189-98.
11. Kleiman NS, Lincoff AM, Flaker GC, Pieper KS, Wilcox RG, Berdan LG, Lorenz TJ, Cokkinos DV, Simoons ML, Boersma E, Topol EJ, Califf RM, Harrington RA. Early percutaneous coronary intervention, platelet inhibition with eptifibatide, and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *PURSUIT Investigators. Circulation* 2000;101:751-7.
12. Kereiakes DJ, Kleiman NS, Ferguson JJ, Masud AR, Broderick TM, Abbottsmith CW, Runyon JP, Anderson LC, Anders RJ, Dreiling RJ, Hantsbarger GL, Bryzinski B, Topol EJ. Pharmacodynamic efficacy, clinical safety, and outcomes after prolonged platelet Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with oral xemilofiban: results of a multicenter, placebo-controlled, randomized trial. *Circulation* 1998;98:1268-78.
13. Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Langer A, Caspi A, Berink P, Lopez-Sendon J, Toman J, Charlesworth A, Anders RJ, Alexander JC, Skene A, Braunwald E. Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial. *Circulation* 2000;102:149-56.
14. Topol EJ, Easton JD, Amarenco P, Califf R, Harrington R, Graffagnino C, Davis S, Diener HC, Ferguson J, Fitzgerald D, Shuaib A, Koudstaal PJ, Theroux P, Van de Werf F, Willerson JT, Chan R, Samuels R, Ilson B, Granett J. Design of the blockade of the glycoprotein IIb/IIIa receptor to avoid vascular occlusion (BRAVO) trial. *Am Heart J* 2000;139:927-33.
15. Newby LK. Long-term oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism with sibrafiban after acute coronary syndromes: study design of the sibrafiban versus aspirin to yield maximum protection from ischemic heart events post-acute coronary syndromes (SYMPHONY) trial. *Symphony Steering Committee. Am Heart J* 1999;138:210-8.

16. The SYMPHONY Investigators. Comparison of sibralfiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. The SYMPHONY Investigators. Sibralfiban versus Aspirin to Yield Maximum Protection from Ischemic Heart Events Post-acute Coronary Syndromes. *Lancet* 2000; 355: 337- 45.
17. Newby LK, Califf RM, White HD, Harrington RA, Van de Werf F, Granger CB, Simes RJ, Hasselblad V, Armstrong PW. The failure of orally administered glycoprotein IIb/IIIa inhibitors to prevent recurrent cardiac events. *Am J Med* 2002; 112: 647-58.
18. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Salyers AK, Taite BB, Szalony JA, Haas NF, King LW, Zablocki JA, Keller BT, Broschat K, et al. SC-54684A: an orally active inhibitor of platelet aggregation. *Circulation* 1995; 91: 403-10.
19. Refino CJ, Modi NB, Bullens S, Pater C, Lipari MT, Robarge K, Blackburn B, Beresini M, Weller T, Steiner B, Bunting S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of a potent, non-peptidic, GP IIb/IIIa receptor antagonist following multiple oral administrations of a prodrug form. *Thromb Haemost* 1998; 79: 169-76.
20. Quinn MJ, Cox D, Foley JB, Fitzgerald DJ. Glycoprotein IIb/IIIa receptor number and occupancy during chronic administration of an oral antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 670-6.
21. Cox D, Smith R, Quinn M, Theroux P, Crean P, Fitzgerald DJ. Evidence of platelet activation during treatment with a GPIIb/IIIa antagonist in patients presenting with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1514-9.
22. Holmes MB, Sobel BE, Cannon CP, Schneider DJ. Increased platelet reactivity in patients given orbofiban after an acute coronary syndrome: an OPUS-TIMI 16 substudy. Orbofiban in Patients with Unstable coronary syndromes. *Thrombolysis In Myocardial Infarction*. *Am J Cardiol* 2000; 85: 491-3, A10.
23. van Noesel C, Miedema F, Brouwer M, de Rie MA, Aarden LA, van Lier RA. Regulatory properties of LFA-1 alpha and beta chains in human T-lymphocyte activation. *Nature* 1988; 333: 850-2.
24. Stephens G, O'Luanaigh N, Reilly D, Harriott P, Walker B, Fitzgerald D, Moran N. A sequence within the cytoplasmic tail of GpIIb independently activates platelet aggregation and thromboxane synthesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 20317-22.
25. O'Neill S, Robinson A, Deering A, Ryan M, Fitzgerald DJ, Moran N. The platelet integrin alpha IIb beta 3 has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 36984-90.
26. Du XP, Plow EF, Frelinger AL, 3rd, O'Toole TE, Loftus JC, Ginsberg MH. Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 1991; 65: 409-16.
27. Frelinger AL, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem* 1991; 266: 17106-11.
28. Quinn MJ, Fullard J, Kerrigan S, Harriott P, Cox D, Fitzgerald DJ. Characterization of a ligand-attenuated binding site on glycoprotein IIb/IIIa. *Thromb Haemost* 2002; 88: 811-6.
29. Cox D, Aoki T, Seki J, Motoyama Y, Yoshida K. Pentamidine is a specific, non-peptide, GPIIb/IIIa antagonist. *Thromb Haemost* 1996; 75: 503-9.
30. Kouns WC, Kirchofer D, Hadvary P, Edenhofer A, Weller T, Pfenninger G, Baumgartner HR, Jennings LK, Steiner B. Reversible conformational changes induced in glycoprotein IIb-IIIa by a potent and selective peptidomimetic inhibitor. *Blood* 1992; 80: 2539-47.
31. Quinn M, Deering A, Stewart M, Cox D, Foley B, Fitzgerald D. Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation* 1999; 99: 2231-8.
32. Kong DF, Califf RM, Miller DP, Moliterno DJ, White HD, Harrington RA, Tchong JE, Lincoff AM, Hasselblad V, Topol EJ. Clinical Outcomes of Therapeutic Agents That Block the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Integrin in Ischemic Heart Disease. *Circulation* 1998; 98: 2829-2835.
33. Di Castelnuovo A, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PLA1/PLA2 and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 626-33.
34. Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PIA2 polymorphism. *American Heart Journal* 2002; 143: 76-82.
35. O'Connor FF, Shields DC, Fitzgerald A, Cannon CP, Braunwald E, Fitzgerald DJ. Genetic variation in glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) as a determinant of the responses to an oral GPIIb/IIIa antagonist in patients with unstable coronary syndromes. *Blood* 2001; 98: 3256-60.
36. Hellstrom HR. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors. *Circulation* 2003; 107: 39e-.

EL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL COMO FACTOR PRONOSTICO Y MARCADOR DE COMPROMISO MIOCARDICO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS - MAZZA



Autor:

María Puyó

Columnista Experta de SIIC

Doctora en Bioquímica (área de especialización: Sistema cardiovascular), Jefa de Trabajos Prácticos, Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Institución:

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Introducción

El factor natriurético atrial (ANF) es una hormona polipeptídica de 28 aminoácidos secretada y sintetizada principalmente por el miocardio atrial en respuesta a cambios en la tensión de la pared.¹ El ANF secretado por las células mioendocrinas tiene propiedades diuréticas, natriuréticas y vasodilatadoras que intervienen en la regulación del equilibrio hidroelectrolítico y de la presión arterial.^{2,3} Por lo tanto, existe una respuesta endocrina cardíaca, mediada por el ANF, que contrarresta la retención de fluidos y la vasoconstricción asociada con la insuficiencia cardíaca crónica (ICC).⁴ El ANF y el péptido natriurético tipo B (BNP), este último aislado por Sudoh y col.,⁵ son liberados constantemente por el corazón y se encuentran aumentados en el plasma de pacientes con distintos tipos de enfermedades cardiovasculares. La hipertrofia cardíaca y la insuficiencia miocárdica aumentan la liberación ventricular de ANF y BNP,⁶ la cual está aún más estimulada por el estiramiento del miocardio auricular y ventricular y por el incremento de los niveles plasmáticos de angiotensina II y endotelina-1.^{7,8} Los pacientes con ICC presentan concentraciones plasmáticas elevadas de ANF, que correlacionan con el grado de disfunción ventricular. El aumento del péptido también está relacionado con el desarrollo de trastornos de conducción (TC) cardíacos.⁹ La enfermedad de Chagas-Mazza, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, es una de las causas de ICC y muerte súbita. Los mecanismos involucrados en la patogénesis de la miocardiopatía (MCP) chagásica no han sido completamente descifrados hasta el momento, pero se conoce la existencia de compromiso inmunológico y del sistema nervioso simpático. La respuesta adaptativa del corazón a la infección por *T. cruzi* podría estar modulada por compuestos endógenos como neurotransmisores, citoquinas y hormonas cardíacas.¹⁰ En un trabajo previo hemos descrito las alteraciones morfológicas miocárdicas y el aumento de los niveles plasmáticos del ANF en un modelo experimental de infección por *T. cruzi* en ratas.¹¹ Por ello, nuestra hipótesis de trabajo fue que la miocarditis producida por la enfermedad de Chagas-Mazza alteraba el sistema natriurético cardíaco no sólo en el modelo experimental sino también en los seres humanos. Por tanto, los objetivos del presente trabajo quedaron así planteados:

1. Investigar la evolución de los niveles plasmáticos del ANF en los diferentes estadios de la enfermedad de Chagas-Mazza (asintomáticos, con TC y con MCP) determinando los niveles de ANF en 4 muestras por paciente (al inicio y 6, 18 y 24 meses después).
2. Analizar la posible utilidad del ANF como factor pronóstico que permitiera determinar durante el período asintomático qué pacientes presentarán compromiso miocárdico y desarrollarán MCP.

Pacientes y métodos

Se estudiaron 6 grupos de pacientes:

- III. Controles sanos (n = 8: 3 mujeres, 5 hombres, edad 39.1 ± 4.1 años).
- IV. pacientes chagásicos en el estadio asintomático (n = 10: 7 m., 3 h., edad 39.8 ± 10.4 a.), con serología positiva evaluada por 3 tests.

- V. pacientes con TC aislados (n = 5: 5 h., edad. 54.4 ± 7.7 a.).
- VI. pacientes chagásicos con TC aislados (n = 10: 3 m., 7 h., edad 58.3 ± 9.4 a.).
- VII. pacientes con MCP (n = 11, 7 m., 4 h., 65.1 ± 8.8 a.).
- VIII. pacientes chagásicos con MCP (n = 12: 8 m., 4 h., 60.4 ± 10.8 a.).

Los estudios complementarios (ECG, ecocardiograma bidimensional, Rx de tórax y análisis de rutina) fueron realizados en todos los pacientes y controles. Todas la personas incluidas en el estudio dieron su consentimiento. Los pacientes con TC aislado presentaron bloqueo completo de la rama derecha; mientras que los pacientes con ICC (89% de origen idiopático y el resto isquémico) estaban estables clínicamente y eran de la clase funcional II-III de la NYHA.

Las muestras de sangre para la determinación de los niveles plasmáticos de ANF fueron obtenidas al inicio y a los 6, 18 y 24 meses. La extracción del plasma y el RIA se realizaron según el método descrito por Sarda y col.¹² Los resultados se analizaron utilizando el test t de Student, con ajuste mediante recta de regresión y test de χ^2 . Se consideró significativa una p < 0.05.

Resultados

Las concentraciones plasmáticas de ANF en los 6 grupos estudiados y a los distintos tiempos se observan en la tabla 1.

TABLA 1. Concentraciones plasmáticas de factor natriurético atrial (ANF) en pacientes en distintos estadios de la enfermedad de Chagas-Mazza (asintomáticos, con trastornos de la conducción [TC] y con miocardiopatía [MCP]) y sus controles.

Grupo	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses
Controles sanos	27 ± 5 (n = 8)	34 ± 4 (n = 7)	31 ± 5 (n = 7)	25 ± 3 (n = 5)
Chagas asintomáticos	32 ± 4 (n = 10)	37 ± 3 (n = 10)	42 ± 8 (n = 9)	47 ± 3 (n = 4)
TC	44 ± 15 (n = 5)	37 ± 6 (n = 5)	39 ± 8 (n = 5)	82 ± 15 (n = 3)
TC + Chagas	31 ± 5 (n = 10)	46 ± 5 (n = 8)	50 ± 10 (n = 10)	93 ± 17 (n = 4)
MCP	111 ± 19 (n = 11)	82 ± 14 (n = 7)	113 ± 11 (n = 6)	238 ± 45 (n = 4)
MCP + Chagas	76 ± 11 (n = 12)	73 ± 10 (n = 10)	108 ± 16 (n = 6)	229 ± 56 (n = 3)

En las primeras 3 muestras (18 meses) no hubo diferencias significativas entre los pacientes chagásicos comparados con sus controles, o sea entre pacientes asintomáticos y los controles sanos; y entre los pacientes con TC y MCP chagásicos y no chagásicos. Como no se encontraron diferencias entre los pacientes infectados y los no infectados, se unieron los grupos y se los comparó según la gravedad de la patología: grupo I (controles sanos y chagásicos asintomáticos); grupo TC; y grupo MCP.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos comparando los niveles de ANF en los grupos a tiempos 0, 6, 18 y 24 meses. Los pacientes del grupo MCP presentaron niveles significativamente aumentados con respecto al grupo I y TC: figura 1a (t = 0): 67% y 64%, p < 0.001; figura 1b (t = 6): 53%, p < 0.001 y 43%, p < 0.01; y 1c=66%, p < 0.001 y 58%, p < 0.01). A los 24 meses se observó aumento significativo en los valores de ANF plasmático en los pacientes asintomáticos (grupo I - Chagas) y con TC con respecto a los controles sanos (figura 1d, 46% y 71%, p < 0.01); y en los pacientes con MCP con respecto a los otros grupos (89%, p < 0.001 vs. control; 80%, p < 0.001 vs. grupo I - Chagas; y 62%, p < 0.01 vs. TC).

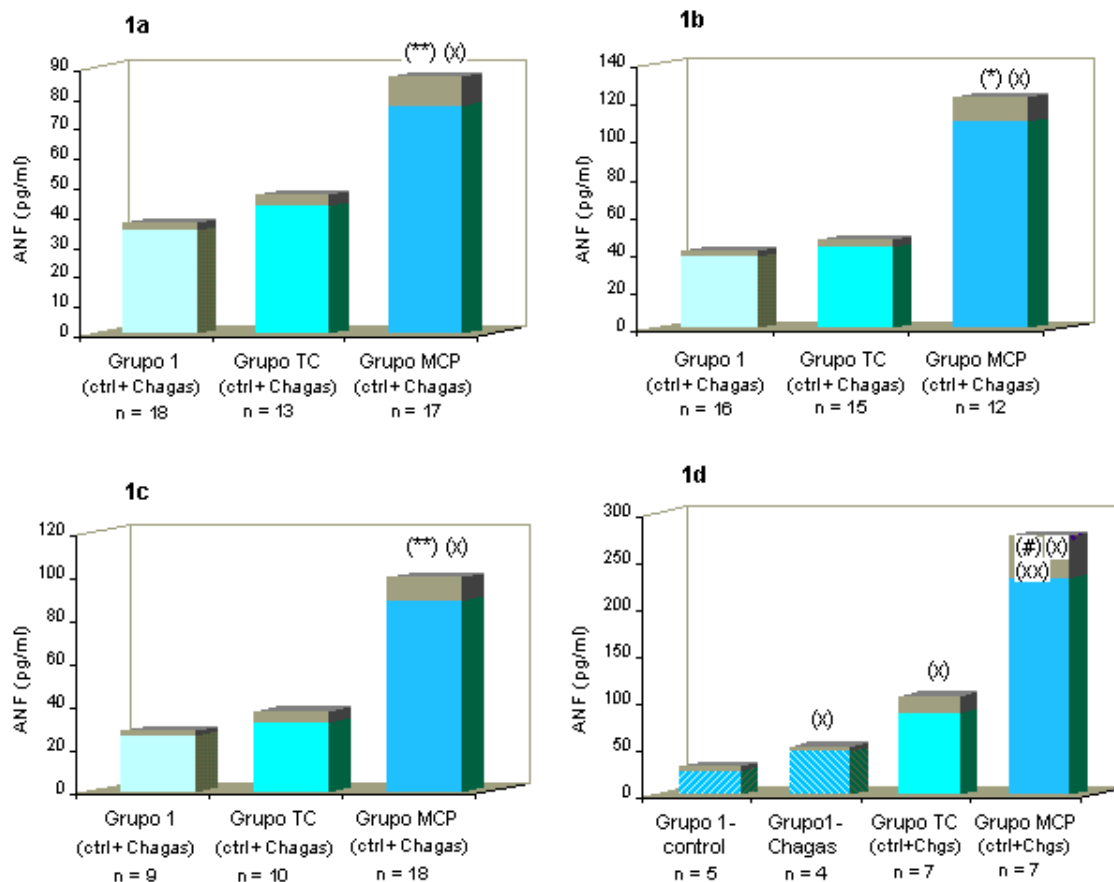


Figura 1. Factor natriurético atrial (ANF) plasmático. Grupo I (controles sanos + pacientes asintomáticos con enfermedad de Chagas). Grupo TC (pacientes con trastornos de la conducción chagásicos y no chagásicos). Grupo MCP (pacientes con miocardiopatía chagásicos y no chagásicos). **1a.** Muestra inicial (tiempo = 0). **1b.** Muestra tiempo = 6 meses. **1c.** Muestra tiempo = 18 meses. (***) $p < 0.001$ vs. grupo I. (*) $p < 0.002$ vs. grupo I, (x) $p < 0.01$ vs. grupo TC. **1d.** Muestra tiempo = 24 meses: grupo I - control (controles sanos), grupo I - Chagas (pacientes asintomáticos), (x) $p < 0.01$ vs. grupo I - control, (#) $p < 0.01$ vs. grupo TC, (xx) $p < 0.001$ vs. grupo I - control y vs. grupo I - Chagas.

Para analizar la utilidad de los niveles del ANF como marcadores pronósticos en las MCP se estudiaron sus concentraciones en los pacientes que fallecieron durante el período de estudio (tabla 2).

TABLA 2. Test de χ^2 para los valores plasmáticos de ANF a tiempo 0 pertenecientes a pacientes con miocardiopatía fallecidos, agrupados en cuartiles.

	$p <$	χ^2	Conclusión
$Q_{0.25} = 59.46$	0.2545	1.2983	No significativo
$Q_{0.5}$ (mediana) = 84.96	0.1469	2.1039	No significativo
$Q_{0.75} = 111.6$	0.0358	4.4056	Significativo

Se correlacionaron los niveles de ANF en la primera muestra de sangre que se les extrajo ($t = 0$) con la causa de deceso (ICC o muerte súbita) producida durante los 24 meses de seguimiento. Fallecieron 16 pacientes con MCP (9 chagásicos); teniendo en cuenta el número de casos, se lo dividió en cuartiles: $Q_{0.25} = 59.46$ pg/ml; $Q_{0.50}$ (mediana) = 84.96 pg/ml; y $Q_{0.75} = 111.6$ pg/ml. Se utilizó el estadístico χ^2 (confianza = 95%) para determinar si la distribución de muertes por encima y por debajo de cada uno de estos niveles era equitativa o si existían diferencias significativas. Los pacientes con MCP, chagásica o no chagásica, con niveles de ANF circulantes superiores a 111.6 pg/ml

tuvieron una proporción de fallecimientos mayor ($\chi^2 = 4.40$, $p < 0.03$) que los que presentaron niveles inferiores a esa cifra. Considerando la concentración de 111.6 pg/ml, el riesgo relativo (RR) fue 2.167, o sea que el grupo de pacientes que inicialmente tenían niveles iguales o superiores a esa cifra tuvo el doble de mortalidad que los que presentaron un nivel inferior.

Discusión

Existen muy pocos trabajos relacionados con los péptidos natriuréticos en la infección por *T. cruzi* y todos describen modelos experimentales de la enfermedad de Chagas. Piazza y col.¹³ encontraron disminución en el contenido de ANF en extractos atriales durante la fase aguda de la infección; y Caliari y col.¹⁴ hallaron alteraciones morfológicas y morfométricas en los gránulos atriales, analizados por microscopía electrónica, al estudiar perros con insuficiencia cardíaca en el mismo período. Por otra parte en un trabajo previo¹⁰ demostramos la presencia de alteraciones morfológicas del miocardio y niveles aumentados de ANF en plasma tanto en el período agudo como en el crónico de la infección por *T. cruzi* en ratas.

En este estudio se analiza por primera vez el nivel de ANF plasmático en pacientes con patologías cardíacas de origen chagásico. La infección por *T. cruzi* en los seres humanos presenta distintos estadios. Solamente el 3% de las personas infectadas desarrollan una miocarditis aguda después de infectarse, mientras que el 97% restante no muestra ningún síntoma de la enfermedad.

Después de 10-20 años, el 30% de ellos desarrolla la MCP crónica chagásica. Hasta que aparecen las alteraciones cardiovasculares los pacientes permanecen en el período llamado asintomático o indeterminado, siendo muy difícil determinar el comportamiento del ANF en la etapa aguda de la infección. Por lo tanto, sólo se pudieron estudiar los que estaban en la fase crónica de la enfermedad.

El ANF plasmático se encontró aumentado en los pacientes chagásicos, pero el incremento fue similar al hallado en pacientes con enfermedades cardíacas de otra etiología. Por lo tanto, los niveles aumentados del péptido no tendrían un origen inmunológico ni serían una consecuencia de la acción directa del parásito sobre la célula miocárdica; sino que derivarían de la función alterada del corazón, especialmente durante el estado dilatado.

Por otra parte, cuando analizamos los niveles de ANF en pacientes chagásicos asintomáticos comparados con los controles sanos, encontramos que estos eran similares en las 3 primeras muestras pero estaban aumentados en la muestra obtenida a los 24 meses de comenzado en estudio; por lo tanto, el análisis de los niveles del péptido podría ser utilizado como factor pronóstico del desarrollo de miocardiopatía en pacientes asintomáticos en el largo plazo. Además, los pacientes chagásicos con niveles de ANF en plasma mayores de 111.6 pg/ml en la muestra inicial tuvieron el doble de mortalidad que los que presentaban valores inferiores del péptido.

En conclusión, en este estudio se mostró la utilidad de los niveles plasmáticos de ANF como marcador de compromiso hemodinámico gradual en pacientes con MCP chagásica, ya evidenciado en pacientes con MCP de otros orígenes.^{14,15} Por otra parte, los niveles aumentados del péptido podrían ser utilizados como marcador precoz del desarrollo futuro de la MCP chagásica en los pacientes asintomáticos; mientras que las concentraciones iniciales iguales o superiores a 111.6 pg/ml del mismo serían un indicio de pronóstico adverso de sobrevida en los pacientes con MCP.

BIBLIOGRAFIA

9. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89-94.
10. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 1990; 70: 665-99.
11. Wei C, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, Mac Gregor CG, Edwards WD, Schaff HV, Burnett JC. Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation* 1993; 88: 1004-9.
12. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature (London)* 1988; 332: 78-81.

13. Davidson N, Naab A, Hanson J, Kennedy N, Coutie W, Struthers A. Comparison of atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and N-terminal proatrial natriuretic peptide as indicators of left ventricular systolic dysfunction. *Am J Cardiol* 1996; 77: 828-31.
14. Schiebinger R, Gómez-Sánchez CE. Endothelin: a potent stimulus of atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria and its dependency on calcium. *Endocrinology* 1990; 127: 119-25.
15. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HYS, Izumo S. Autocrine release of Angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993; 75: 977-84.
16. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321-8.
17. Sterin-Borda L, Borda E. Overview of molecular mechanisms in chagasic cardiomyoneuropathy and achalasia. *Medicina (Bs As)* 1999; 99: 75-83.
18. Scaglione J, Puyó AM, Dupuy HA, Postan M, Fernández BE. Behavior of atrial natriuretic factor in an experimental model of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *J Parasitol* 2001; 87: 923-6.
19. Sarda IR, de Bold ML, de Bold AJ. Optimization of atrial natriuretic factor immunoassay. *Clin Biochem* 1989; 22: 11-5.
20. Piazza L, Rubiolo ER, Hliba E, Santamarina N. Atrial natriuretic factor in experimental Chagas' disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 1992; 87: 323-4.
21. Caliri MV, Lana M, Leite VHR, Tafuri WL. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Path* 1995; 76: 299-307.
22. Gottlieb SS, Kukin ML, Ahern D, Packer M. Prognostic importance of atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 1534-9.
23. Mathisen P, Hall C, Simonsen S. Comparative study of atrial peptides ANF (1-98) and ANF (99-126) as diagnostic markers of atrial distension in patients with cardiac disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53: 41-9.

LA HETEROGENEIDAD MOLECULAR EN EL MIOCARDIO EN DESARROLLO Y SUS IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGIA CARDIACA



Autor:

Diego Franco

Columnista Experto de SIIC

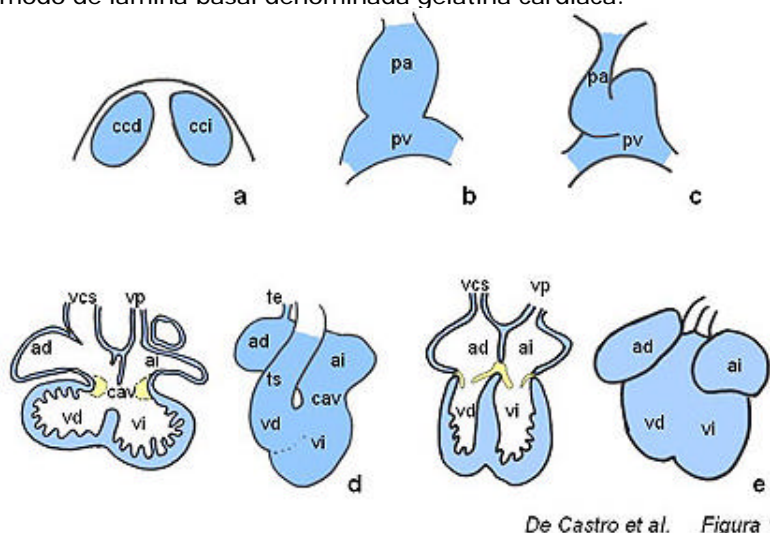
Profesor Asociado en Biología Celular, Embriología Molecular, Cardiogénesis, Expresión y Regulación génica. Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud

Institución:

Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Jaén, España

La formación del corazón es un proceso complejo en el cual intervienen distintos tipos celulares (figura 1). En las primeras fases de desarrollo embrionario, dos regiones simétricas conspicuas del mesodermo se diferencian en tejido promiocárdico, expresando así una serie de factores de transcripción que invariablemente las convierten en miocardiocitos. Estas dos regiones promiocárdicas, denominadas crestas cardíacas, se fusionan en la línea media del embrión en desarrollo y dan lugar a un tubo cardíaco inicial, compuesto de dos capas; una capa interna de endocardio rodeada por una capa externa de miocardio. Entre estas dos capas se localiza una sustancia amorfa y acelular a

modo de lámina basal denominada gelatina cardíaca.¹⁰



De Castro et al. Figura 1

Figura 1. Esquema ilustrativo de las diferentes etapas del desarrollo cardíaco. a, crestas precardiacas; b, tubo cardíaco inicial; c, asa cardíaca; d, corazón embrionario, en el cual se observa el inicio del proceso de septación de las cámaras atriales y ventriculares; e, corazón fetal, en el cual se observa que el proceso de septación se ha completado y las válvulas atrioventriculares se han desarrollado. ad, atrio derecho; ai, atrio izquierdo; cav, canal atrioventricular; ccd, cresta cardíaca derecha; cci, cresta cardíaca izquierda; pa, polo arterial; pv, polo venoso; te, tracto de entrada; td, tracto de salida; vcs, vena cava superior; vp, vena pulmonar; vd, ventrículo derecho; vi, ventrículo izquierdo.

Según se avanza en el desarrollo, el tubo cardíaco inicial se delamina del mesodermo dorsal y sufre invariablemente una torsión hacia la derecha. Es a partir de este estadio cuando las futuras regiones ventriculares y atriales empiezan a vislumbrarse a nivel morfológico, y como veremos más adelante también a nivel molecular. En este estadio embrionario se pueden distinguir cinco regiones claramente delimitadas: el tracto de entrada, las cámaras atriales, el canal atrioventricular, las cámaras ventriculares y el tracto de salida. Es también en este estadio cuando se empieza a observar los primeros signos de septación, dado que entre las cámaras atriales y ventriculares ya se empiezan a esbozar los futuros septos interatrial (septo interatrial primario) e interventricular (porción muscular), respectivamente. Curiosamente, existe una continuidad morfológica entre las regiones del tracto de entrada, canal atrioventricular y tracto de salida a nivel de la curvatura interna, lo cual ha llevado a plantear la hipótesis de que la especificación molecular del miocardio atrial y ventricular acontece exclusivamente en las regiones de la curvatura externa.³ Finalmente cabe resaltar que una de las etapas decisivas durante la morfogénesis cardíaca es la formación y alineamiento de los distintos septos cardíacos, para generar así un órgano pulsátil con doble circuito sanguíneo. De este modo, el corazón embrionario sufre una tabicación del tracto de entrada, canal atrioventricular y tracto de salida que permite obtener entradas y salidas independientes a las cámaras atriales y ventriculares derecha e izquierda, respectivamente. En este estadio se configura también a nivel morfológico el sistema de conducción cardíaco, el cual permite que se produzca la contracción sincrónica y acompasada de las distintas cámaras cardíacas.⁹ En los últimos años hemos experimentado un gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la cardiogénesis. Hemos asistido al descubrimiento de un número importante de factores de transcripción específicos del miocardio, así como se ha establecido la amplia heterogeneidad en proteínas estructurales que subyace al miocardio en formación y que se mantiene en la mayoría de los casos en el corazón adulto.^{5,6,8} En esta revisión, queremos realizar un barrido por los distintos patrones de expresión que se observan en el miocardio en desarrollo, así como en el adulto, e ilustrar cuáles son las implicaciones que dicha heterogeneidad provoca en la práctica clínica. Para ello es importante resaltar cuáles son los mecanismos de especificación celular que acontecen durante el desarrollo. Las células de mesodermo en formación reciben señales de los tejidos contiguos en forma de factores de crecimiento secretados que, mediante la activación de receptores de membrana específicos, provocan directa o indirectamente que unos factores de transcripción se transcriban y por tanto

sean activos. Estos factores de transcripción generan a su vez respuestas en el núcleo que conllevan a la síntesis de proteínas estructurales, tales como proteínas contráctiles, del citoesqueleto o reguladoras del impulso eléctrico. Así pues, la generación de distintos patrones de expresión de los factores de transcripción, proteínas contráctiles/citoesqueleto y proteínas reguladoras del impulso eléctrico es indicativa, respectivamente, de características morfogenéticas, estructurales y funcionales del corazón en formación.

En los primeros estadios del desarrollo cardíaco, distintos factores de transcripción tales como MEF2C, Nkx2.5 y GATA4, entre otros, muestran un patrón de expresión homogéneo a lo largo del tubo cardíaco inicial.⁸ Otros factores de transcripción muestran sin embargo una regionalización en su expresión en los distintos ejes embrionarios; Tbx5 muestran un gradiente ántero- posterior,³ Hand2 (eHAND) muestra una expresión diferencial en el eje dorso- ventral¹ y Pitx2 se expresa exclusivamente en la región izquierda del eje derecha- izquierda.² Dentro de las proteínas estructurales, distintas proteínas sarcoméricas muestran diferencias en el eje ántero -posterior pero no hay evidencias de regionalización en el eje dorso-ventral. En el caso del eje derecha-izquierda, existe una proteína de la matriz extracelular, la flectina, que se expresa exclusivamente en la región izquierda.¹⁴ Por el contrario, no existen evidencias de expresión de ninguna de las proteínas involucradas en la generación o conducción del impulso eléctrico en este estadio (figura 2A).

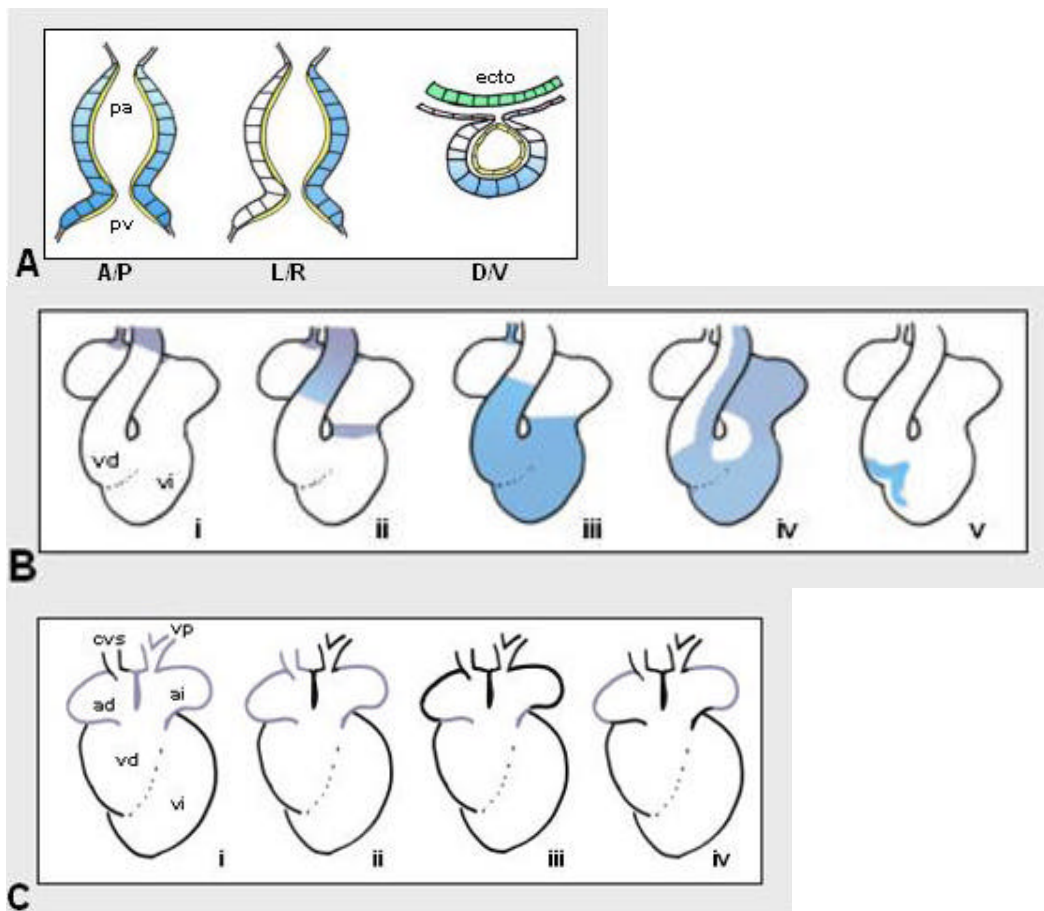


Figura 2. Esquemas representativos de los diferentes patrones de expresión en las distintas etapas del desarrollo cardíaco: A, etapa de tubo cardíaco inicial; B, etapa embrionaria; y C, etapa fetal/adulto. En la etapa de tubo cardíaco inicial (A) existe una regionalización en los tres ejes embrionarios. En el eje anteroposterior (A/P) muestran heterogeneidad en su expresión factores de transcripción tales como Tbx5 y proteínas sarcoméricas tales como α MHC y β MHC, así como proteínas involucradas en el metabolismo del calcio, tales como SERCA2 a y fosfolamban (PBL). En el eje derecha/izquierda (L/R) muestran una expresión diferencial el factor de transcripción Pitx2 y la proteína extracelular flectina. En el eje dorso-ventral (D/V) sólo el factor de transcripción Hand2 muestra diferencias de expresión. En la etapa embrionaria (B) existe una mayor heterogeneidad en la expresión. Hay genes que muestran expresión sólo en las regiones de formación de miocardio (i; p.ej. GATA5 y GATA6), genes que muestran diferencias entre el miocardio primario y el miocardio de

cámara (ii; SERCA2a, PLB, Tbx2, BMP2, BMP4, por mencionar algunos), genes que se expresan tan sólo en las cámaras atriales o en las ventriculares (iii; p. ej. α MHC, β MHC, MLC2a y MLC2v), genes que muestran expresión en el miocardio derivado de la cresta cardiaca izquierda (iv; Pitx2) o genes que parecen demarcar el futuro sistema de conducción ventricular (v; Irx2, Irx3 y Tbx3). Finalmente, en la etapa adulta, la heterogeneidad molecular parece restringirse al miocardio auricular puesto que el miocardio ventricular muestra sólo expresión en gradiente a lo largo de las paredes libres ventriculares. En el miocardio auricular existe heterogeneidad molecular entre el miocardio de las venas cavas (i), el miocardio mediastinal (ii), el miocardio derivado del canal atrioventricular embrionario (iii) y el miocardio de las aurículas propiamente dicho (iv).

En el estadio embrionario, la mayoría de los factores de transcripción muestran un patrón homogéneo, tales como los anteriormente mencionados y otros, tales como GATA5 y GATA6, solo se expresan en aquellas zonas donde se está produciendo aún el reclutamiento de nuevas células miocárdicas.¹² En este estadio existe un refinamiento de la diferenciación dorso-ventral de tal modo que algunos factores de transcripción delimitan las fronteras entre el miocardio primario y el miocardio específico de cámara (atrial y ventricular), como es el caso de Tbx2.¹⁰ A su vez aparecen las primeras diferencias de expresión entre el miocardio sistémico y pulmonar, ilustrados por Hand1 y Hand2.¹³ También aparecen los primeros signos de diferenciación del sistema ventricular de conducción, con la expresión de distintos factores de transcripción, Irx2, Irx3 y Tbx3, en las presuntas áreas de formación del fascículo de His y las ramas derecha e izquierda.⁴ Las diferencias en el eje derecha-izquierda siguen estando representadas por Pitx2, resaltado que dichas diferencias se mantiene como tales en las cámaras atriales pero son convertidas en diferencias dorso-ventral en las cámaras ventriculares.² Los patrones de expresión de las proteínas contráctiles refuerza la heterogeneidad molecular en el eje ántero-posterior y en las regiones de miocardio primario/cámara (miosinas y actinas), así como en los recién creados compartimentos sistémico/pulmonar (miosinas).¹⁶ Dicha heterogeneidad en la expresión de proteínas contráctiles también se extiende al sistema ventricular de conducción cardiaca.

Las proteínas involucradas en la conducción cardiaca muestran diferencias entre las regiones de miocardio primario/cámara (conexinas),¹⁵ mientras que los distintos canales iónicos muestran el mismo tipo de patrón o bien se expresan de forma homogénea en el corazón embrionario (figura 2B).

En el estadio fetal, así como en el corazón adulto, las diferencias de expresión de los distintos factores de transcripción quedan refinadas al eje ántero-posterior, es decir, entre las cámaras auriculares y ventriculares. Por otro lado, las diferencias de expresión dorso-ventral y derecha-izquierda se desvanecen. En definitiva, en los estadios adultos, sólo un número reducido de factores de transcripción siguen expresándose de forma homogénea, tales como Nkx2.5, MEF2C y GATA4, mientras sólo unos pocos se expresan de forma heterogénea en el eje ántero-posterior, como por ejemplo Irx4 y Tbx5. La expresión de proteínas contráctiles sigue la misma tendencia que los factores de transcripción en lo que respecta al miocardio ventricular pero sin embargo se diversifica ampliamente en el miocardio auricular, dando lugar a la diferenciación de al menos cuatro dominios de expresión. Por otro lado, la expresión de canales iónicos es bien homogénea a lo largo del miocardio, tales como los canales de sodio, o muestran diferencias en el eje ántero-posterior, tales como las subunidades auxiliares de los canales de potasio IK,⁷ o bien presentan heterogeneidad entre el miocardio primitivo y el específico de cámara, tales como las subunidades auxiliares de los canales citoplasmáticos de calcio o distintas bombas de calcio mitocondriales (figura 2C).

En esencia, se puede observar que el miocardio en formación es un tejido altamente dinámico que presenta alto grado de heterogeneidad en su expresión génica. Este dato es importante tenerlo en cuenta a la luz de la inminente aplicación de células pluripotentes embrionarias para la reparación del miocardio dañado. En segundo lugar, es importante destacar que dicha heterogeneidad se manifiesta también en el corazón adulto, y de una forma muy especial en las cámaras auriculares. Curiosamente, zonas discretas del miocardio auricular son frecuentemente puntos de reentrada de fibrilación auricular.

Este perfil parece coincidir con la heterogeneidad molecular observada en las aurículas. Sería por tanto interesante ver si existe alteración de la expresión molecular en aquellos pacientes con predisposición a reentradas arritmogénicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Biben, C. and Harvey, R. P. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* 1997 Jun 1; 11(11):1357-69.
2. Campione, M.; Ros, M. A.; Icardo, J. M.; Piedra, E.; Christoffels, V. M.; Schweickert, A.; Blum, M.; Franco, D., and Moorman, A. F. Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol.* 2001 Mar 1; 231(1):252-64.
3. Christoffels, V. M.; Habets, P. E.; Franco, D.; Campione, M.; de Jong, F.; Lamers, W. H.; Bao, Z. Z.; Palmer, S.; Biben, C.; Harvey, R. P., and Moorman, A. F. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 2000 Jul 15; 223(2):266-78.
4. Christoffels, V. M.; Keijser, A. G.; Houweling, A. C.; Clout, D. E., and Moorman, A. F. Patterning the embryonic heart: identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol.* 2000 Aug 15; 224(2):263-74.
5. Fishman, M. C. and Chien, K. R. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development.* 1997 Jun; 124(11):2099-117.
6. Franco, D.; Campione, M.; Kelly, R.; Zammit, P. S.; Buckingham, M.; Lamers, W. H., and Moorman, A. F. Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart. *Circ Res.* 2000 Nov 24; 87(11):984-91.
7. Franco, D.; Demolombe, S.; Kupersmidt, S.; Dumaine, R.; Dominguez, J. N.; Roden, D.; Antzelevitch, C.; Escande, D., and Moorman, A. F. Divergent expression of delayed rectifier K(+) channel subunits during mouse heart development. *Cardiovasc Res.* 2001 Oct; 52(1):65-75.
8. Franco, D.; Dominguez, J.; de Castro Md Mdel, P., and Aranega, A. [Regulation of myocardial gene expression during heart development]. *Rev Esp Cardiol.* 2002 Feb; 55(2):167-84.
9. Franco, D. and Icardo, J. M. Molecular characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart: topographical correlation in normal and congenitally malformed hearts. *Cardiovasc Res.* 2001 Feb 1; 49(2):417-29.
10. Franco, D.; Markman, M. M.; Wagenaar, G. T.; Ya, J.; Lamers, W. H., and Moorman, A. F. Myosin light chain 2a and 2v identifies the embryonic outflow tract myocardium in the developing rodent heart. *Anat Rec.* 1999 Jan; 254(1):135-46.
11. Habets, P. E.; Moorman, A. F.; Clout, D. E.; van Roon, M. A.; Lingbeek, M.; van Lohuizen, M.; Campione, M., and Christoffels, V. M. Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev.* 2002 May 15; 16(10):1234-46.
12. Morrisey, E. E.; Tang, Z.; Sigrist, K.; Lu, M. M.; Jiang, F.; Ip, H. S., and Parmacek, M. S. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998 Nov 15; 12(22):3579-90.
13. Thomas, T.; Yamagishi, H.; Overbeek, P. A.; Olson, E. N., and Srivastava, D. The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness. *Dev Biol.* 1998 Apr 15; 196(2):228-36.
14. Tsuda, T.; Philp, N.; Zile, M. H., and Linask, K. K. Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev Biol.* 1996 Jan 10; 173(1):39-50.
15. Van Kempen, M. J.; Vermeulen, J. L.; Moorman, A. F.; Gros, D.; Paul, D. L., and Lamers, W. H. Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1996 Nov; 32(5):886-900.
16. Zammit, P. S.; Kelly, R. G.; Franco, D.; Brown, N.; Moorman, A. F., and Buckingham, M. E. Suppression of atrial myosin gene expression occurs independently in the left and right ventricles of the developing mouse heart. *Dev Dyn.* 2000 Jan; 217(1):75-85.