

Biología molecular aplicada a la cirugía cardiaca

Palabras clave: Biología molecular, cirugía cardiaca, trasplante cardiaco, xenotrasplante, trasplante miocelular, angiogénesis .

Key words: Molecular biology, cardiac surgery, heart transplant, xenotransplant, myocellular transplantation, angiogenesis.

Recibido: 4/IV/2000
Aceptado: 21/VI/2000

Carlos Riera Kinkel,* Rubén Argüero Sánchez**

* Médico adscrito del Servicio de Cirugía Cardiorácica, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F. (Alumno de la Maestría en Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

** Director del Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. (Tutor de Maestría en Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

Correspondencia:

Carlos Riera Kinkel,

Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Departamento de Cirugía Cardiorácica, Av. Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, 06725, México, D. F. Teléfono (525) 5627-6900 ext. 2313; domicilio (525) 5570-4239.

E-mail: rierac@internet.com.mx

150

Resumen

La cirugía cardiaca plantea la alternativa terapéutica actualmente más efectiva para la resolución de numerosas cardiopatías; dicha circunstancia ocupa a los investigadores debido a que estas últimas constituyen las principales causas de mortalidad en el ámbito mundial. La aplicación de la biología molecular en la cirugía cardiaca hace posible una atmósfera de expectativas muy interesantes para la medicina y la cardiología contemporáneas, que se observa en el terreno de los trasplantes cardiacos, la aterosclerosis, y la angiogénesis. El presente trabajo constituye un sumario de las principales líneas de investigación actual sobre la aplicación de la biología molecular en la cirugía cardiaca; estas consideraciones podrían modificar la calidad de vida de los pacientes, de manera que su análisis racional es indispensable.

Introducción

Una de las áreas médicas que mayores cambios ha aportado a la medicina actual es la biología molecular. Ésta incurre hoy en numerosas patologías

Summary

Cardiac surgery is the actual most effective treatment for cardiomyopathies, issue that makes the researchers more interested in this field, since it is the leading cause of death in the world. The application of molecular biology to the cardiac surgery has created an atmosphere of expectancy and interest for the contemporary medicine and cardiology, which has been released in the heart transplant, atherosclerosis, and angiogenesis.

The present paper makes a summary of the actual research lines, of this application of the molecular biology to the cardiac surgery, considerations that may change the quality of life of our patients, but in a rational way.

como un elemento clave del recurso terapéutico e incluso diagnóstico; consecuentemente se inserta en diversos artículos de publicaciones médicas, internacionales y nacionales, que el médico moderno y particularmente el especialista debe conocer.

La cirugía cardiaca no debe ser la excepción en este reto de incorporar en sus procesos a la biología molecular, pues la conjugación de ambas representa actualmente una alternativa terapéutica importante en numerosas cardiopatías de elevada mortalidad en el mundo. Esta incursión en el ámbito cardiológico ocurre primordialmente en dos áreas: la cardiopatía isquémica y la cirugía de trasplante cardiaco; estas dos últimas son fundamento y justificación del presente análisis, el cual deberá realizarse con prudencia, debido a que conjuntamente con el desarrollo de la biología molecular —en una época de profundos cambios sociales, políticos y económicos influenciados por los países industrializados— ha propiciado una atmósfera de expectativas en la medicina contemporánea en esta nueva etapa de globalización, que persigue una ilimitada necesidad de gasto por la investigación, orientado hacia una meta: crear un producto comercializable, a expensas de la amortiguación de una ciencia diáfana, que persigue desinteresadamente el conocimiento.

En la práctica médica actual es relativamente común ver cómo se perfeccionan tratamientos paliativos de mayor tecnología y más costo, que convierten a los hospitales en palacios tecnológicos, divergentes del criterio humanista que debe caracterizar a la atención médica. De esta forma la biología molecular es considerada como la apoteosis del enfoque reduccionista de la ciencia médica, creando la inadecuada medicina de alta tecnología, que podría propiciar en el país más rico la bancarrota. Así, la medicina actual mantiene esa polaridad, a la que debemos darle su debido sentido, por lo que su análisis es esencial.

La terapia génica y el sistema cardiovascular

Las características de cada célula se determinan mediante la expresión de sus genes, esta última se encuentra condicionada por múltiples variables, así como por la etapa de desarrollo en la que se encuen-

tre. Un ejemplo de esta situación consiste en la producción de actina, muy diferente en el miocardio en comparación con el músculo esquelético, y éste, a su vez, distinto como miocito en la etapa adulta al de la etapa fetal. Se desconocen muchos de los mecanismos de expresión de estos genes.¹

El músculo cardiaco tiene la particularidad de ser un tejido que no experimenta mitosis celular, supliendo con ello su capacidad de hipertrofiarse con base en su producción proteínica.

La terapia génica permite sustituir la producción de una proteína anormal por la producción de otra con características normales.

Se conocen dos formas de producir manipulación génica: la primera es aquella que se produce en células de la línea germinal, las cuales experimentan un gran número de divisiones celulares. Por otro lado está la terapia génica de las células somáticas, las cuales pretenden tratar un solo tipo de tejido, sin afectar las células germinales.²

Las características del músculo cardiaco lo hacen susceptible de la terapia génica de células somáticas. Estas técnicas involucran la introducción de material genético dentro de una célula blanco que permita la expresión del material que la célula somática tiene defectuoso.²

Los factores críticos de esta manipulación dependen de la eficacia de introducir ese material genético, de reducir la toxicidad de esa introducción y de controlar la cantidad de expresión de ese material genético.¹

La transferencia génica presenta el siguiente proceso: a) purificación y clonación del ADN deseado; b) conocimiento de la secuencia de control; c) obtención de la suficiente cantidad de células blanco con el propósito de introducirlo; d) introducción en la célula blanco.¹

Esta introducción puede producirse en laboratorio mediante diversos métodos físicos de eficacia y toxicidad variable. Es común que entre más eficaz es la introducción, ocurre mayor cantidad de células destruidas. El ADN puede precipitarse en fosfato de calcio o dextrano para que se adhiera-

ra a la superficie celular, con el paso de una corriente eléctrica sobre la célula, de manera que la carga negativa del ADN pase dentro de la célula.² Sin embargo, la introducción del material genético también puede realizarse mediante la utilización de vectores virales y no virales.²

En el sistema cardiovascular se han incorporado tanto métodos *in vitro* e *in vivo*. La introducción de ADN mediante plásmidos se construye con facilidad *in vitro*. Sin embargo, esta ruta de aplicación es menos tóxica para las células, pero tiene menor eficacia de introducción y no es aplicable a los tejidos *in vivo*. Otro método no viral es la introducción del ADN mediante lípidos catiónicos, llamados liposomas de ADN, utilizados *ex vivo* o *in vivo*, aunque estos últimos han sido modificados para la utilización de la técnica de complejo liposoma-viral.³

La utilización de virus permite la introducción de ADN o ARN, pero no de ambos. Este material permitirá la codificación para la formación proteínica. Se utilizan dos tipos de virus para la introducción del material genético: retrovirus y adenovirus. Los primeros introducen el ARN; asimismo, contienen transcriptasa reversa para transformarlo en ADN, con el propósito de que posteriormente se incorpore al material genético de la célula somática blanco. Sin embargo, esta técnica requiere que la célula se divida para que se incorpore al material genético original, además de que puede ocasionar mutaciones de este material, al igual que destrucción de la célula.² Los segundos contienen ADN, que puede introducir gran cantidad de material genético sin necesidad de replicación celular, aunque lo anterior provoca reacciones alérgicas, ocasionando inflamación del tejido blanco. La aplicación de este material puede lograrse en el corazón mediante la aplicación intracoronaria⁴ o a través de su inyección directa al miocardio.¹ Esta última es la que alcanza los niveles más altos de introducción.⁵ Células cardíacas también pueden incluir el ADN mediante el complejo adenovirus-polilisina y plásmidos.⁶

La ruta de transferencia génica depende del tipo de plásmidos de ADN y el tipo de virus que contiene el ADN, siendo que esta última puede inyectarse directamente al tejido pero con el inconveniente de producir la expresión no homogénea o a manera de parches, además de la inflamación ocasionada por la inyección, en estas circunstancias se prefiere la vía intravascular.¹

Las células miocárdicas no son las únicas que conforman al corazón, pues además participan células endoteliales y fibroblastos, que también son sensibles a esta manipulación génica bajo las especificaciones de división celular. Ésta mantiene un crecimiento proporcional durante las etapas iniciales del desarrollo; dicha característica se va alterando con la edad, aunado a otros mecanismos fisiopatológicos y a las enfermedades crónico-degenerativas. Las anteriores premisas en lo futuro deben indicar la manipulación génica de estos tejidos.¹

La terapia génica se incrusta en un nuevo concepto que conforma la idea más vanguardista de formar *cirujanos cardíacos moleculares*, considerando la posibilidad de efectuar trasplantes de corazón sin necesidad de inmunosupresión, eliminando las complicaciones que ésta conlleva la dificultad ante el acceso de este tejido, y facilitando la solución del problema de aterosclerosis, hiperplasia de la neointima y la angiogénesis. Estos conceptos provocan la modificación de una terapéutica paliativa a curativa en el nuevo horizonte.²

Trasplante cardíaco

La aplicación de la biología molecular en el proceso del trasplante cardíaco se enfoca en tres áreas generales: reducción de la respuesta inmune, xenotrasplantes y trasplante miocelular.

La respuesta inmune representa una de las premisas que condiciona y determina la sobrevida del injerto cardíaco, así como de las complicaciones referentes a la inmunosupresión. La inyección directa al miocardio,⁷ así como la infusión conti-

nua⁸ de factor de transformación $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), que es una citosina celular con propiedades de inmunosupresión, demuestra un incremento de la sobrevida del injerto cardíaco.⁷ De esta forma, su aplicación como liposoma de ADN, después del pinzamiento aórtico durante la procuración, disminuye las posibilidades de rechazo.⁹

Los xenotrasplantes de corazón de cerdos transgénicos representan una de las áreas más interesantes de la cirugía cardíaca, pues resuelven el problema de demanda de donadores, así como de aspectos éticos y legales, que conlleva el trasplante cardíaco. La utilización de corazones de cerdo tiene una aplicación formidable, en respuesta a esa demanda, debido a que de cada camada es posible obtener diez corazones con periodos de gestación de 114 días, y con seis meses para alcanzar su madurez.¹⁰

Las investigaciones en relación con los xenotrasplantes se abocan a la solución del rechazo hiperagudo, que es determinado por los anticuerpos anti-gal $\alpha 1-3$ expresados en el endotelio; constituye el principal obstáculo para el xenotrasplante, además ocasiona una reacción de complemento: rompe las células endoteliales, provoca hemorragia intersticial, trombosis plaquetaria e infarto.^{10,11} En este contexto, el programa de investigación realizado en la Universidad de Cambridge con el propósito de obtener cerdos transgénicos tiene como enfoque tres áreas principales: reducir el complejo de respuesta del complemento directamente sobre la membrana, bloqueando la proteína cofactor de membrana humana (hMCP); inhibir la actividad de la proteína C59, CD46 moléculas que bloquean la activación del complemento en el humano; y la formación de cerdos transgénicos con la expresión de factor de reducción de la aceleración humana (hDAF), que representa un segmento de DNA con una región 5' no transcrita en el primer exón e intrón del gen de DAF en el humano, que se introduce en el pronúcleo del espermatozoide porcino previo a la fecundación; el resultado es que se obtienen cer-

dos transgénicos a los que se reduce la repuesta del rechazo hiperagudo que se presenta cuando el injerto se realizó en monos.^{1,10,12}

Otra de las líneas de investigación está enfocada a la manipulación de los ligandos de Fas que interactúan con el CD95/Fas, activando las células T y ocasiona la respuesta para la apoptosis del linfocito.^{10,13} La producción transgénica de CTLA4-Ig de las células endoteliales para reducir la respuesta de los receptores CTLA4 y reducir el rechazo.¹⁴ Sin embargo, otra de las limitantes de los xenotrasplantes es la posibilidad de infección mediante retrovirus endógenos de transmisión porcina (PERV).¹⁵

Trasplante de cardiomiocitos

El principio más importante de la terapia génica aplicada a la cirugía cardíaca consiste en la posibilidad de producir una proteína funcional que logre la restauración del tejido en presencia de una cicatriz, como en el caso del infarto del miocardio, propiciar que el cardiomiocito se reproduzca nuevamente o que otros tejidos, como el del músculo esquelético o de los fibroblastos, se diferencien a cardiomiocitos.¹ Por otra parte, la creación de animales transgénicos que puedan modificar la expresión proteínica de los miocitos, como el caso de la sobreexpresión de los receptores $\beta 2$ -adrenérgicos,¹⁶ o bien la manipulación de las proteínas encargadas del movimiento de calcio (proteína fosfolamban)^{1,17} mismas que ocasionan un efecto inotrópico positivo. En circunstancias semejantes, el trasplante de cardiomiocitos en un corazón con insuficiencia cardíaca podría ser parte de la solución.¹

En la tónica de diferencia de la expresión génica, según la etapa de desarrollo en que se encuentra, se ha intentado la implantación de células fetales en miocardio adulto, estas últimas conservan la posibilidad de diferenciarse y dividirse con el objetivo de repoblar el miocardio con una cicatriz ocasionada por un infarto.¹⁸ Los mecanismos de dife-

renciación celular y crecimiento aún no se definen plenamente. Existe un factor determinado por el cardiomiocito, denominado MyoD, que resulta de extraordinaria importancia en la diferenciación celular; en este sentido, su introducción mediante un adenovirus propicia que estos fibroblastos se diferencien como cardiomiocitos.^{19,20}

Hiperplasia de la íntima

Una de las áreas de mayor interés en la cirugía cardíaca y en la cardiología intervencionista, es el tema de la hiperplasia de la íntima, esa situación condiciona la reestenosis de los vasos y de las anastomosis, con oclusión de los injertos vasculares; este tipo de situaciones reducen el periodo eficaz del procedimiento de revascularización miocárdica, angioplastia y provoca que la aterosclerosis se perpetúe.

Existen diversos genes que regulan la respuesta inflamatoria y proliferativa del músculo liso y, por lo tanto, disminuyen la hiperplasia de la neoíntima.¹ Estas estrategias están encaminadas a inhibir la interpretación del gen inhibidor de las metaloproteasas,²¹ mediante la aplicación de un adenovirus introducido con el gen que codifica la reducción de la expresión del factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF).²² La introducción de un adenovirus a células musculares lisas con el gen para la expresión de la oxidosintetasa²³ y la donación de una proteína inhibidora del retinoblastoma, en su forma no fosforilada,²⁴ han demostrado utilidad en la reducción de la progresión y desarrollo de la neoíntima.

Angiogénesis

Uno de los temas más interesantes de la cirugía cardíaca es la posible manipulación genética o quirúrgica de la respuesta del proceso angiogénico, pues éste plantea expectativas de vida más larga a pacientes con cardiopatía isquémica o bien la posibilidad de alguna terapéutica a

pacientes que ya no la tenían. Tal es la situación de la producción de proteínas involucradas en la angiogénesis y la apertura de colaterales —el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)— mediante recombinación génica, o bien de introducción del gen necesario utilizando como vehículo un adenovirus, ya sea para su administración intracoronaria, intramuscular o intrapericárdica.²⁵⁻³¹

Conclusión

Sería difícil describir con detalle cada uno de los temas tratados; sólo se plantea un panorama general del espectro aplicativo actual de la biología molecular en la cirugía cardíaca, esta situación repercutirá en mejorar la calidad de vida y los periodos libres de enfermedad de nuestros pacientes. Sin embargo, debemos mantenernos expectantes y cautelosos con los cambios, con el fin de elegir de manera racional la terapéutica más adecuada, en favor de nuestros pacientes.

Agradecimientos

A CONACYT por su apoyo en el programa de becas para maestría en ciencias médicas.

Referencias

1. Entwistle J, Wechsler A. Role of Gene Therapy in Cardiac Surgery. In: Franco K, Verrier. *Advanced Therapy in Cardiac Surgery*. B.C Decker Inc. Hamilton. Ontario, Canadá. 1999. p. 527-532.
2. Cox T, Sinclair J. Biología Molecular en Medicina. En: *Biología Molecular y el futuro de la Medicina*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España: 1998: 334-345.
3. Akoi M, Morishita R, Muraishi A, et al. Efficient *in vivo* gene transfer into Heart in the rat myocardium infarction model using the HVJ (hemagglutinating virus of Japan): liposome method. *J Moll Cell Cardiol* 1997; 29: 949-959.
4. Donahue JK, Kikkawa K, Johns DC. Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the Heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4664-4668
5. Wang J, Ma Y, Knechtle SJ. Adenovirus-mediated gene transfer into rat cardiac allografts. *Transplantation* 1996; 61: 1726-1729.

6. Kohout TA, O Brian JJ, Gaa ST, et al. Novel adenovirus component system that transfects cultured cardiac cells with high efficiency. *Circ Res* 1996; 1996; 78: 971-977.
7. Qin L, Ding Y, Bromberg JS. Gene transfer of transforming growth factor (I prolong murine cardiac allograft survival inhibiting cell-mediated immunity. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1981-1988 (abstract).
8. Brauner R, Wu L, Laks H et al. Intracoronary gene transfer of immunosuppressive cytokines to cardiac allografts: method and efficacy of adenovirus-mediated transduction. *J Thorac Cardiovascular Surg* 1997; 113: 1059-1066.
9. Dalesandro J, Akimoto H, Gorman CM et al. Gene therapy for donor hearts. *Ex vivo* liposome – mediated transfection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 416-422.
10. Schmoedel M, Wallwork J, White D. Cardiac Xenograft Organs from transgenic pigs. En : Franco K, Verrier E. *Advanced Therapy in Cardiac Surgery* B.C Decker Inc. Hamilton. Ontario, Canadá. 1999. p . 520-526.
11. Sharma A, Okabe J, Birch P et al. Reduction in the level of gal (a1,3) gal in transgenic mice and pigs by the expression of an a(1,2) fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7190-7195.
12. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH. Inhibition of component- mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. *Transplantation* 1991; 52: 530-533.
13. Bellgrau D, Gold D, Selawry H. A role for CD95 ligands in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377: 630-632.
14. Guinan EC, Gribben JG, Bouswsitis VA et al. Pivotal role of the B7: CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994; 84: 3261-3282.
15. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997; 3: 282-286 (abstract).
16. Milano CA, Allen LF, Rockman HA et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta-2 adrenergic receptor. *Science* 1994; 264: 582-586.
17. Luo W, Grupp IL, Harrer J et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of b-agonist stimulation. *Circ Res* 1994; 75: 401-409.
18. Loer J, Patterson M, Quinones MJ, et al. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat: potential method for repair of infarcted myocardium?. *Circulation* 1996; 94(Suppl 11a): 332-336.
19. Murry CE, Kay MA, Barrosek T, et al. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* 1996; 98: 2209-2217.
20. Tam SKC, Gu W, Nadal- Ginard B, Vlahakes GJ. Molecular cardiomyoplasty: potential cardiac gene therapy for chronic heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 918-924.
21. Forough R, Koyama N, Hasenstab D et al. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell function *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res*. 1996; 79: 812-820.
22. Hanna AK, Fox JC, Neschis DG, et al. Antisense basic fibroblast growth factor gene transfer reduces neointimal thickening after arterial injury. *J Vasc Surg* 1997; 25: 320-325.
23. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion-*in vivo* transfer of endothelial-cell nitric-oxide synthases gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1137-1141.
24. Chang MW, Barr E, Seltzer J et al. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of retinoblastoma gene product. *Science* 1995; 267: 518-522.
25. Mulhauser J, Merrill MJ, Pili R et al. VEGF 165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis *in vivo*. *Circ Res* 1995; 77: 1077-1086.
26. Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F, Yamada K, Tomaru T, Kimura, Morita T. Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am Heart J* 1995; 130; 6: 1182.
27. Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 1995; 129; 5: 924-931.
28. Lazarous D, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robinson G, Stiber J, Correa R, Epstein S, Unger E. *Circulation* 1995; 91: 145-153.
29. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS, Manning WJ, Sellke FW, Simons M. Basic Fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 1994; 94; 2: 623-630.
30. Battler A, Scheinowitz M, Bor A, Hasdai D, Vered Z, Segni E, Varda-Bloom N, Nass D, Savion N. Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 2001-2006.
31. Giordano FJ, Ping P, McKirman, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. *Nat Med* 1996; 5: 534-539.