



ARTÍCULO DE OPINIÓN

Inhibir la contractilidad sin provocar necrosis: ¿sería útil en miocardiopatía hipertrófica? Modelo experimental de administración intramiocárdica de toxina botulínica y de wortmanina

Francisco Javier Roldán-Gómez^{a,*}, Natalia Pavón-Martínez^b,
Faustino Gálvez-Pérez^c y Jesús Vargas-Barrón^d

^a Departamento de Ecocardiografía, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México D.F., México

^b Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México D.F., México

^c Cirugía plástica y reconstructiva, Hospital Ángeles del Pedregal, México D.F., México

^d Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México D.F., México

Recibido el 26 de abril de 2012; aceptado el 28 de junio de 2012

PALABRAS CLAVE

Miocardiopatía
hipertrófica;
Administración
intramiocárdica;
Toxina botulínica;
Wortmanina;
México

KEYWORDS

Hypertrophic
cardiomyopathy;
Intramyocardial
administration;
Botulinum toxin;
Wortmannin;
Mexico

Resumen En este artículo se presenta una idea original: inhibir la contracción miocárdica en forma regional y selectiva sin inducir necrosis. Se propone como una posible opción terapéutica en miocardiopatía hipertrófica asimétrica obstructiva, y se plantean 2 modelos farmacológicos basados en la administración intramiocárdica de toxina botulínica y de wortmanina.

© 2012 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

Inhibiting contractility without necrosis: Would it be helpful for hypertrophic cardiomyopathy? Experimental model of intramyocardial botulinum toxin and wortmannin

Abstract The purpose of this paper is to introduce a new idea: local inhibition of contractility without necrosis. It's potential usefulness in hypertrophic cardiomyopathy treatment is discussed and 2 pharmacological models, administering botulinum toxin and wortmannin directly in the myocardium are disclosed.

© 2012 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Published by Masson Doyma México S.A. All rights reserved.

* Autor para correspondencia. Departamento de Ecocardiografía, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, C.P. 14080, México D.F., México. Teléfono: +55732911x1212.

Correo electrónico: roldanjavo@yahoo.com (F.J. Roldán-Gómez).

Introducción

En la miocardiopatía hipertrófica asimétrica obstructiva, un grosor exagerado e irregular en ciertas áreas del músculo cardíaco puede provocar obstrucción al flujo de salida del ventrículo izquierdo, insuficiencia mitral y muerte súbita. Por otro lado, la desorganización de los miocitos y la fibrosis intersticial de los que se acompaña predisponen al desarrollo de arritmias ventriculares, causa última de gran parte de los decesos relacionados a esta patología¹.

El beneficio farmacológico es limitado y como posibles soluciones paliativas se están llevando a cabo resecciones quirúrgicas de músculo y provocación de infartos regionales utilizando oclusores coronarios, como los stents cubiertos, la embolización o la administración directa de alcohol en las coronarias que irrigan la zona hipertrófica. La seguridad de estos procedimientos no se encuentra bien documentada a largo plazo² e, indudablemente, provocan un daño tisular extenso. Con este tipo de tratamientos se estaría agregando un nuevo sustrato arritmogénico a pacientes que, como ya se ha comentado, presentan un alto riesgo de desarrollar arritmias letales y muerte súbita.

El inhibir la contractilidad en la zona que condiciona la obstrucción sin producir daño tisular sería una interesante propuesta terapéutica. Por un lado, se evitaría el gradiente dinámico secundario al engrosamiento y desplazamiento sistólicos. Por otro, si se logra que el efecto sea lo suficientemente prolongado, el consecuente incremento en el estrés parietal y la pérdida del tono muscular pondrían en marcha mecanismos de remodelación ventricular, la expansión de la zona tratada y una disminución permanente en el grado de obstrucción.

Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo es que se puede inhibir farmacológicamente la contractilidad en áreas seleccionadas del miocardio sin ocasionar un grado significativo de daño celular, inflamación o fibrosis. Para ello, es necesario encontrar un fármaco que idealmente posea las siguientes características: que sea tolerado por el miocardio, que interfiera con los componentes celulares de la contracción miocárdica inhibiendo su engrosamiento sistólico, que tenga un efecto exclusivamente local sin extenderse a otras áreas del miocardio y sin efecto sistémico a las dosis requeridas, y que la duración de su efecto sea lo suficientemente prolongado como para activar mecanismos de remodelación ventricular que persistan más allá del efecto farmacológico.

Para encontrar este medicamento se proponen 2 intervenciones farmacológicas, con posibilidades de interferir en los mecanismos de contracción miocárdica. La primera correspondería al uso de toxina botulínica, que bloquea la liberación de acetilcolina. La segunda a la wortmanina, un potente inhibidor de la de la cinasa-3 de fosfatidil inositol (PI3-K) y de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, por sus siglas en inglés). En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron antecedentes sobre la aplicación intramiocárdica directa de ninguno de los 2 fármacos, así como tampoco de sus efectos *in vivo* sobre la movilidad ventricular. Para conocer estos efectos se propone un modelo experimental con ratas Wistar de un peso de 350 ±

30g. Este peso permitirá una valoración adecuada con ecocardiografía a través de transductores de alta frecuencia. Se requiere de un grupo tratado y un control por cada uno de los 2 modelos farmacológicos, para corroborar que los efectos que se observen no son consecuencia de la acción del diluyente o debidos a la punción. Al tratarse de una especie pequeña, la aplicación del fármaco deberá ser directamente en el miocardio. En especies mayores podría considerarse la aplicación intracoronaria a través de técnicas previamente descritas³, evitando la toracotomía y sus complicaciones.

Toxina botulínica

La toxina botulínica es producida por una bacteria anaerobia Gram positiva llamada *Clostridium botulinum* y es considerada el más letal agente biológico conocido. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la liberación de acetilcolina a nivel de las terminaciones nerviosas colinérgicas, escindiendo la proteína necesaria para la fijación y liberación de sus vesículas. Cuando es administrada por vía intramuscular se produce una denervación química con debilidad muscular y parálisis sin daño celular. Sus efectos clínicos se observan dentro de la primera semana de la aplicación y la duración se prolonga por 3 meses o más. A partir de este momento, la transmisión neuromuscular comienza su recuperación hasta alcanzar la normalidad. Las investigaciones en el terreno cardiovascular se han centrado primordialmente en sus efectos sobre la regulación autonómica del corazón y sus efectos en las alteraciones del ritmo⁴. Se conocen 7 serotipos de toxina botulínica nombrados por letras de la A a la G. El tipo A de la toxina es el más potente y se utiliza en una gran cantidad de patologías relacionadas con hiperactividad muscular, pudiendo durar el efecto hasta 4 meses. En su presentación comercial contiene 100 unidades LD₅₀ de toxina. Una unidad corresponde a la dosis letal media para un ratón por vía intraperitoneal⁵. Estudios de biodistribución muestran que tras su inyección, difunde lentamente por el músculo, sufre un rápido metabolismo sistémico y se excreta por vía urinaria. En el músculo la cantidad administrada se reduce aproximadamente a la mitad en 10 horas. En el punto de inyección se une a grandes moléculas proteicas, mientras que en el plasma se une a moléculas pequeñas, lo que indica un rápido metabolismo sistémico del sustrato. En las 24 horas posteriores a la inyección, 60% de la sustancia marcada se excreta por la orina. Probablemente la toxina se metaboliza mediante proteasas y los componentes moleculares se reciclan a través de los circuitos metabólicos normales. Por la naturaleza de este producto no se tienen los estudios habituales de absorción, distribución, biotransformación y eliminación. Se cree que la distribución sistémica de las dosis terapéuticas de la toxina botulínica es muy pequeña. Estudios clínicos, realizados con técnicas electromiográficas de fibra única, muestran una actividad muscular electrofisiológica aumentada en músculos alejados del punto de inyección, sin estar acompañada de ningún signo o síntoma clínico.

En el músculo cardíaco no se encuentra placa neuromuscular y la transmisión del impulso se realiza a través de un *syncitio*. Sin embargo, hay estudios en los que se muestra una acción directa sobre la actividad espontánea de los miocitos en cultivos de células aisladas⁶. Se

desconocen los posibles efectos de la aplicación intramiocárdica directa de toxina botulínica y es por tanto, de interés construir un modelo experimental *in vivo* que permita observar tanto su tolerabilidad como los efectos agudos y crónicos en la contractilidad. Considerando que en la rata pueden existir efectos sistémicos al inyectar 4 unidades, se propone una dosis intramiocárdica de 2.5 unidades que no generarían efectos colaterales a nivel sistémico y sí un efecto local sobre los cardiomiocitos.

Wortmanina

Un modelo farmacológico más específico para el propósito de nuestra hipótesis sería el que interfiera directamente con los componentes celulares de la contracción miocárdica, esto es, con la interacción entre los filamentos de actina y la cabeza de la miosina, la dinámica del calcio (Ca^{2+}) y la hidrólisis del ATP. La wortmanina es un antibiótico que se obtiene del hongo *Talaromyces wortmannii* y tiene diferentes acciones dependiendo de su concentración: a 3 nM inhibe a PI3-K, a 200 nM tiene acción inhibitoria sobre la MLCK⁷, arriba de 300 nM no afecta la contractilidad y a dosis iguales o mayores a de 1 μM disminuye la contracción basal sin suprimir los transitorios de Ca^{2+} . A esta misma concentración también inhibe el efecto inotrópico positivo de larga duración inducido por endotelina 1 en el miocardio ventricular canino⁸.

En un trabajo publicado por Nakanishi et al.⁹ se encontró que la wortmanina inhibe la contracción de la pared de la aorta torácica al ser estimulada con cloruro de potasio (KCl), además del efecto de inhibir a PI3-K. Su acción es irreversible⁹, lo que la convierte en un agente ideal para los objetivos del presente trabajo. Con base a estos antecedentes se propone utilizar una concentración de 1 μM para disminuir la contracción basal. La wortmanina es una molécula hidrofóbica y, por tanto, el vehículo debería ser un aceite vegetal que carezca de efectos sobre la contracción cardíaca.

Discusión

Es la primera ocasión en la que se propone una inhibición regional de la contracción miocárdica a través de fármacos que no provocan necrosis tisular. En pacientes con hiperactividad miocárdica y/o un grosor parietal exagerado que como en la miocardiopatía hipertrófica pueden llegar a poner en riesgo la vida, este tratamiento abriría una nueva ventana de oportunidad. Se podría disminuir el desarrollo de gradientes dinámicos y, probablemente, estimular un proceso de remodelación a nivel ventricular. Este mismo objetivo es el que se persigue en la actualidad a través de miectomías quirúrgicas y provocando infartos selectivos. Sin embargo, debido a la lesión tisular que se produce, estos tratamientos estarían agregando nuevas comorbilidades a pacientes que ya presentan un riesgo elevado de desarrollar arritmias ventriculares y muerte súbita. Este hecho aunado al beneficio limitado de la terapia farmacológica, son los motivos principales para la búsqueda de soluciones alternativas.

Cualquier sustancia capaz de interferir con la contracción muscular podría ser sujeta a valoración, especialmente si interactúa con la contracción del músculo estriado

cardíaco. Sólo a través del desarrollo de modelos experimentales se podrá encontrar el fármaco apropiado, conocer sus efectos, hallar las dosis mínimas necesarias y comprobar su tolerabilidad. En este trabajo se propone un modelo experimental con 2 diferentes fármacos: la toxina botulínica y la wortmanina. La primera tiene un mecanismo indirecto a través de la inhibición en la liberación de acetilcolina y, aunque el corazón no cuenta con placa neuromuscular, el modelo se propone con base a indicios de acción directa sobre miocitos aislados⁶ y a la ausencia de estudios que investiguen los efectos de su aplicación intramiocárdica. Adicionalmente, su aplicación permitirá conocer los efectos sobre la regulación autonómica, la estabilidad eléctrica y la tolerancia del miocardio a su aplicación directa. La segunda actúa a través de un efecto directo sobre los componentes de la contracción miocárdica. Hay estudios sobre sus efectos bioquímicos a diferentes concentraciones⁹, y ensayos sobre fibras musculares aisladas con diferentes respuestas en músculo esquelético y en los cardiomiocitos¹⁰. En base a la revisión de la literatura, a que no hay antecedentes sobre su aplicación intramiocárdica y a que no es posible controlar su concentración a nivel tisular, es difícil predecir sus efectos en nuestro modelo. Proponemos una concentración de 23.34 nM/ μl sobre la base teórica de desensibilizar las fibras contráctiles del cardiomiocito a la acción del Ca^{2+} ⁹. De no obtener los resultados deseados, sería necesario experimentar con dosis diferentes e intentar controlar y cuantificar la concentración del medicamento en el miocardio. En cuanto a la forma de administración se propone la inyección intramiocárdica, debido a que el modelo en ratas no permite otras opciones para obtener un efecto local. En modelos que utilicen especies de mayor tamaño se propondría una forma menos invasiva como es la administración intracoronaria de los medicamentos.

Conclusión

La aplicación de sustancias que inhiban localmente la contractilidad miocárdica sin ocasionar daño celular es una propuesta novedosa y original, que abre un nuevo campo de investigación en el terreno cardiovascular.

Financiamiento

No se recibió patrocinio de ningún tipo para llevar a cabo este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. McKenna WJ, Iglesias LM. Identificación y tratamiento de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica y riesgo de muerte súbita. *Rev Esp Cardiol*. 2000;53:123-30.
2. Gimeno JR, Tome MT, McKenna WJ. Ablación septal alcohólica en la miocardiopatía hipertrófica, una oportunidad para aprovechar. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:314-8.
3. Thomas CN. Local intracoronary heparin delivery with a micro-porous balloon catheter. *Am Heart J*. 1996;132:969-72.

4. Oh S, Choi EK, Zhang Y, et al. Botulinum toxin injection in epicardial autonomic ganglia temporarily suppresses vagally mediated atrial fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2011;4:560–5.
5. Pérez HP, Rubio C, Pozuelo MR, et al. Botulismo y toxina botulínica. *Rev Toxicol*. 2003;20:8–12.
6. Kimura K, Kimura H, Yokosawa N, et al. Negative chronotropic effect of botulinum toxin on neonatal rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244:275–9.
7. Maag D, Maxwell MJ, Hardesty DA, et al. Inositol polyphosphate multikinase is a physiologic PI3-kinase that activates Akt/PKB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:1391–6.
8. Chu L, Norota I, Ishii K, et al. Wortmannin inhibits the increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity induced by cross-talk of endothelin-1 with norepinephrine in canine ventricular myocardium. *J Pharmacol Sci*. 2009;109:193–202.
9. Nakanishi S, Takahashi SKI, Kawahara K, et al. Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J Biol Chem*. 1992;267:2157–63.
10. Hong SJ, Chang CC. Novel inhibition of contractility by wortmannin in skeletal muscle. *Br J Pharmacol*. 1998;124:849–56.