

Biopsia de músculo esquelético: ¿alternativa diagnóstica del daño cardíaco por adriamicina?

Dra. Miriam Strauss,* Dra. Rosa Maita,* Dr. Guillermo Anselmi*

RESUMEN

Introducción. La respuesta celular miocárdica versus esquelética postestrés tóxico por adriamicina, ha dado esperanzas de sustituir la toma de muestra endomiocárdica por la del músculo esquelético, como opción menos invasiva. La similitud subcelular entre ambos tejidos musculares sustenta la posibilidad del reemplazo. No obstante, se desconoce si tal similitud es extensiva a otros niveles de organización de la materia.

Objetivo. En este trabajo se evalúa la respuesta a nivel molecular del tejido muscular cardíaco y esquelético ante la adriamicina, al comparar la expresión, acumulación o ambos procesos de proteínas de estrés.

Materiales y métodos. Ratas macho Sprague Dawley de 62 g p.c., fueron distribuidas en cinco grupos al azar: control (agua destilada iv 0.1 mL), 15, 30 45 y 60 minutos postratamiento con 15 mg/kg p.c. de adriamicina (ADR) (iv 0.1 mL). De los homogenatos de porciones de pared ventricular izquierda del corazón y del miembro posterior del músculo esquelético, se determinó la expresión de Hsp70, por Western blotting.

Resultados. El anticuerpo monoclonal anti-Hsp70 reconoció bandas de Hsp70 en ambos tejidos. La diferencia en la densidad óptica entre las bandas cardíacas vs esqueléticas en función de los tiempos postratamiento no fue estadísticamente significativa. La expresión de Hsp70 inducida por ADR fue similar para ambos tejidos.

Conclusión. El reemplazo de la toma de muestras endomiocárdicas por la toma de muestras de músculo esquelético representa una alternativa potencial de la evaluación de la respuesta cardíaca al estrés tóxico por adriamicina, menos invasiva e igualmente informativa, que requiere seguir siendo investigada.

Palabras clave: Adriamicina, Hsp70, biopsias endomiocárdicas, daño cardíaco, músculo esquelético, L-carnitina.

ABSTRACT

Introduction. Skeletal, as opposed to myocardial post-stress cellular response to adriamycin has raised hopes replacing endomyocardial biopsy sampling by skeletal muscle sampling as a less invasive option. The subcellular similarity between the two tissues supports this possibility. However, it is not known whether this similarity extends to other levels of organization.

Objective. This research evaluates the cardiac and skeletal muscle tissue response to adriamycin at molecular level, by comparing the expression and/or accumulation of stress proteins in both tissues.

Materials and methods. Male Sprague Dawley rats of 62 g body weight were randomized in five groups: control (distilled water iv 0.1 mL) 15, 30, 45 and 60 min post-treatment with 15 mg/kg body weight of adriamycin (ADR) (iv 0.1 mL). Hsp expression of the homogenates of left heart ventricular wall sections and of the skeletal muscle of the posterior limb was determined by Western blotting.

Results. The monoclonal anti-Hsp70 antibody recognized Hsp70 bands in both tissues. The difference in optic density between the cardiac and skeletal bands in relation to the post-treatment times was not statistically significant. Adriamycin-induced Hsp70 expression was similar for both tissues.

Conclusions. The replacement of endomyocardial sampling by skeletal muscle sampling represents a potential alternative in the evaluation of cardiac response to adriamycin stress, since it is less invasive but equally informative. This alternative requires further investigation.

Key words: Adriamycin, Hsp70, endomyocardial biopsies, muscle similarity, skeletal muscle, L-carnitin.

* Sección de Biología Celular. Instituto de Medicina Tropical. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela, Caracas

dad Central de Venezuela. Apartado Postal 47019. Caracas 1041-A. Venezuela Tel: 00 58 212 6053650 Fax: 00 58 212 2434685 correo electrónico: mstraussve@yahoo.com Recibido: diciembre, 2003. Aceptado: marzo, 2004.

Correspondencia: Dra. Miriam Strauss. Sección de Biología Celular. Instituto de Medicina Tropical. Facultad de Medicina. Universi-

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicas.com.mx

En niños con cáncer la población de sobrevivientes está en continuo crecimiento³ debido a la eficacia de la terapia con adriamicina (ADR), potente antibiótico antitumoral¹ de valiosa acción². No obstante, la gran potencialidad antitumoral de la ADR suele acompañarse de toxicidad en numerosos órganos, la más severa de las cuales ocurre en el miocardio^{1,4,5}. La fase temprana de la cardiotoxicidad, se expresa con hipotensión, taquicardias y arritmias que responden favorablemente al tratamiento^{1,5-7}. En cambio, la fase tardía de cardiotoxicidad es permanente e irreversible^{1,5-8}. En niños, este tipo de cardiomiopatía se expresa por alteraciones del grosor de la pared ventricular izquierda, su contractilidad y su crecimiento⁹. A nivel subcelular, se observa destrucción de membranas, de las mitocondriales y del retículo sarcoplasmático, e incluso degeneración celular generalizada^{6,10}. La evaluación de los daños tóxicos con métodos diagnósticos invasivos como la toma de biopsia endomiocárdica (TBE), puede causar un daño adicional al producido por la ADR.

El incremento de la población de jóvenes sobrevivientes al cáncer ha hecho necesario el desarrollo de estrategias de atenuación, eliminación, o ambos problemas, de los efectos indeseables de la ADR y otras opciones menos peligrosas e igualmente informativas que la TBE para evaluar la respuesta cardíaca al tratamiento con ADR. La similitud de la respuesta ultraestructural a la ADR observada entre el músculo cardíaco y el esquelético a nivel nucleolar, en sistemas *in vivo*¹¹ e *in vitro* (resultados no publicados) podría ser de capital importancia para evitar la TBE. No obstante, se desconoce si la similitud subcelular entre ambos tejidos musculares corresponde a un patrón de similitud de miocardio y músculo esquelético en los distintos niveles de organización de la materia. Por lo tanto, es necesario evaluar la respuesta molecular ante el efecto tóxico de la ADR como mecanismo endógeno de respuesta celular a través de la determinación bioquímica de la expresión, acumulación o ambos, de proteínas del choque térmico o de estrés, en ambos tejidos musculares. En este trabajo se estudia la expresión de Hsp70 entre células musculares cardíacas y esqueléticas expuestas a ADR con el propósito de evaluar la existencia de un parámetro en la respuesta

molecular ante el estrés de ambos tejidos musculares, para optar por el estudio de músculo esquelético para el diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon ratas macho Sprague Dawley de 62 g p.c. (Bioterio del IVIC). Se distribuyeron en cinco grupos al azar (tres cada uno): el control y los tratados durante 15, 30, 45 y 60 min postratamiento con 15 mg/kg p.c. de ADR (SIGMA) por vía intravenosa, disueltos en 0.1 mL de agua destilada. El grupo control recibió un volumen equivalente de agua destilada por la misma ruta. Luego de la administración de la droga y finalizado el tiempo de exposición a la misma, las ratas se sacrificaron en una cámara con vapores de cloroformo. Se procedió a tomar y homogeneizar porciones de la pared ventricular izquierda del corazón (PVI) y del miembro posterior del músculo esquelético (MEP), para determinar la expresión de Hsp70 (anti-Hsp70 monoclonal de SIGMA) mediante la técnica de Western blotting. Las bandas de reconocimiento de Hsp70 fueron valoradas por densitometría, empleando el programa Multi-análisis de BIO-RAD. Los valores de densidad óptica (DO) de ambos tejidos musculares fueron analizados a través de un ANOVA de dos vías en un modelo aleatorizado: homogeneidad de varianza, distribución normal de las muestras e independencia de las muestras.

Los animales fueron tratados de acuerdo a las normas de la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del US National Institute of Health (NIH).

RESULTADOS

Hubo diferencias entre animales controles y tratados, en ambos tejidos. En los tratados, el reconocimiento comparado de Hsp70 entre PVI y MEP, fue similar en todos los tiempos postratamiento (Figura 1). La diferencia entre las DO promedio de las bandas de reconocimiento de Hsp70 correspondientes a PVI y MEP en los diferentes tiempos postratamiento considerados, no fue estadísticamente significativa ($0.6447 > 0.001$) (Figura 2). A los 30 min se observó reducción del valor de DO promedio para músculo cardíaco y esquelético, respecto a los controles y los

tiempos 15 y 45 min postratamiento. En tanto, los menores valores de DO promedio se registraron a los 60 min. para ambos tejidos musculares con respecto a los controles y demás tiempos postratamiento.

DISCUSIÓN

La toma de biopsias endomiocárdicas para valorar el estado del miocardio en pacientes tratados con antraciclinas, incluyendo la población infantil, debe ser repetida durante el tratamiento. Esto limita su empleo por la agresión que representa a un órgano ya afectado por los efectos cardiotóxicos de la droga¹². Se ha demostrado que las dosis acumulativas de

adriamicina en humanos, particularmente en niños y en animales experimentales, se acompaña de mayor daño cardíaco^{9,18,19}. En tal sentido los trabajos de Merski y cols.¹¹ sobre la similitud ultraestructural entre el músculo esquelético y el cardíaco después del tratamiento con ADR se corroboran con la similitud molecular de los sistemas de protección endógena hallados en el presente trabajo. La acumulación de Hsp70 en el núcleo y más específicamente en el nucléolo se ha sugerido como posible explicación molecular de las alteraciones de la forma^{10,13}.

Entre las proteínas de choque térmico, la Hsp70, la Hsp72 y la Hsp73 se localizan en el citosol y en el núcleo de las células de mamíferos, con una homología

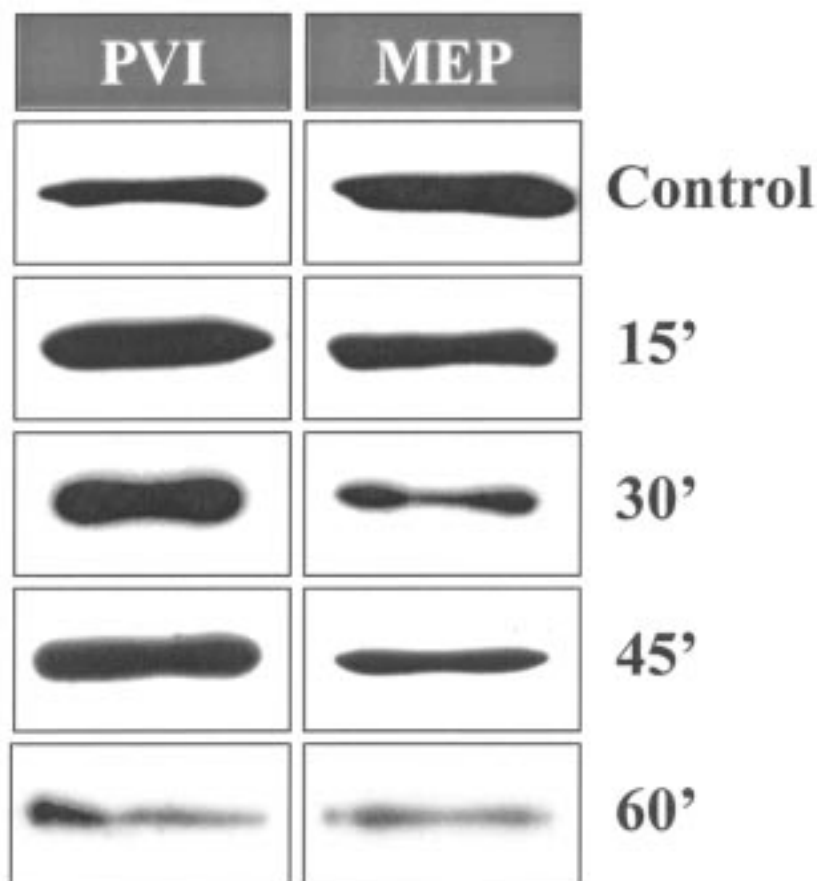


Figura 1. Reconocimiento de bandas de Hsp70, mediante separación e inmovilización proteica por electroforesis en geles de policrilamida (10% en presencia de SDS y condiciones disociantes) de muestras de la PVI y MEP, provenientes de ratas expuestas a 15 mg/kg de p.c. de ADR durante 15', 30', 45' y 60'. Para la inmunodetección se empleó un anticuerpo monoclonal anti Hsp70 (1:5000), y un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón (1:4000), acoplado a peroxidasa.

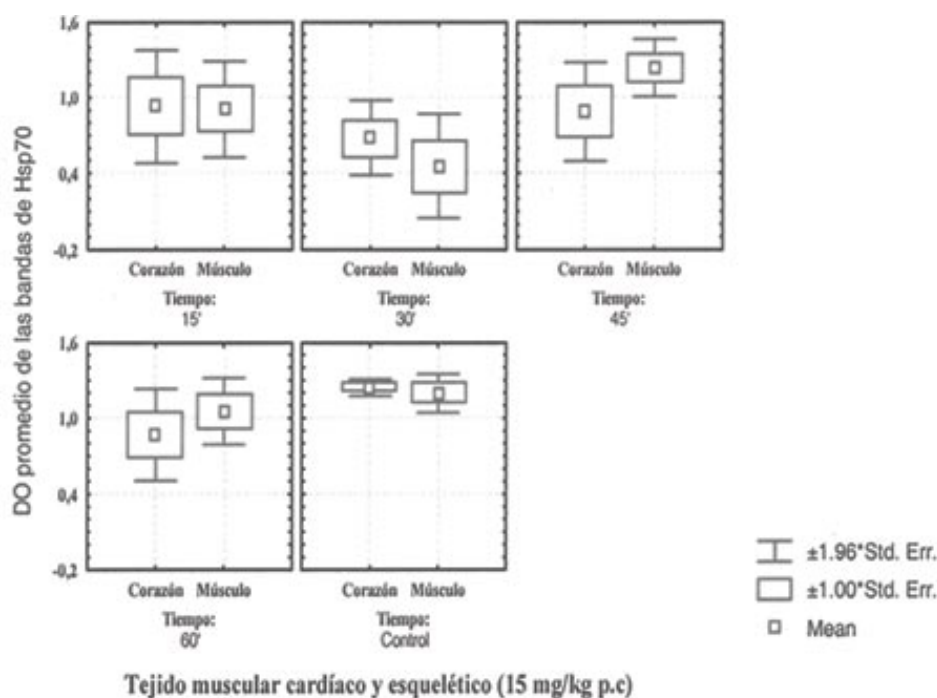


Figura 2. DO promedio de las bandas de reconocimiento de Hsp70 en función del tejido muscular cardíaco y esquelético, en los tiempos postratamiento considerados con mg/kg p.c. de ADR. La diferencia en la DO promedio, en función de los tiempos postratamiento considerados entre tejido muscular cardíaco y esquelético no fue estadísticamente significativa ($0.6447 > 0.001$); en contraste con la diferencia observada entre las DO promedio de los tiempos post-tratamiento, la cual es estadísticamente diferente ($0.0027 < 0.01$).

extensiva en su secuencia. La isoforma Hsp73 se expresa constitutivamente, en tanto que la Hsp72 se debe a estrés inducible¹⁴. En este trabajo, el reconocimiento de Hsp70 pudiera estar vinculado con el reconocimiento de las isoformas constitutivas en controles. Tales Hsps pre-existentes se deben a la respuesta celular rápida a condiciones adversas, como la exposición a ADR. En los animales tratados, el reconocimiento de Hsp70, similar en ambos tejidos musculares, pudiera estar vinculado a un reconocimiento de ambas isoformas, debido al estrés celular que causa la ADR. La reducción del reconocimiento de Hsp70 en ambos tejidos musculares a los 30 min pudiera deberse a la acción deletérea sobre la homeostasis proteica de este agente antineoplásico, particularmente por su efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas y la desnaturalización de las existentes^{15,16}. La inhibición de la síntesis de proteínas que ejerce la ADR, también pudiera afectar los mecanismos endógenos de citoprotección como las

proteínas de choque térmico¹⁷. Por otra parte, a los 60 min del tratamiento, el reconocimiento observado, pudiera estar más bien vinculado al retorno a las condiciones homeostáticas celulares y a la activación de mecanismos de regulación de la expresión de las Hsps.

La comparación de la respuesta de daño celular entre el miocardio y el músculo esquelético por ADR y el análisis estadístico que confirma la similitud molecular, permite sugerir que hay un paralelismo, al menos experimentalmente, entre ambos tejidos musculares, que se expresa por acumulación de Hsp70. Por esta razón se sugiere sustituir la toma de muestras endomiocárdicas por la toma de muestras de músculo esquelético, como alternativa para conocer el daño cardíaco por adriamicina. Esta propuesta requiere seguir siendo investigada.

Dado que la administración de L-carnitina disminuye significativamente los efectos cardiotoxicos indeseables de la adriamicina a corto y a largo plazo,

tanto en humanos como en animales experimentales, sin afectar la actividad antitumoral de la droga,^{18,20} se estudian la respuesta muscular cardíaca y esquelética a largo plazo con dosis acumulativa de adriamicina con y sin protección de L-carnitina. Lo anterior permitiría evaluar si la respuesta del músculo cardíaco y esquelético es similar tanto en la situación de toxicidad como en la de cardioprotección.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por el CDC-UCV y por Laboratorios ELMOR SA. Agradecemos el importante apoyo técnico de la Histotecnóloga Marianela Rodríguez y de la Lic. Noraidys Porras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fu LX, Waagstein F, Hjalmarson A. A new insight into adriamycin-induced cardiotoxicity. *Intern J Cardiol* 1990;29:15-20
2. Wang JJ, Cortes E, Sinks LF, Holland JE. Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. *Cancer* 1971;28:837-43
3. Schuler D, Horvath E, Koos R, Kajtar P, Zimonyi I, Virag I, Masat P, Garami M, Borsi JD. Safety of dexrazoxane in children with ALL undergoing anthracycline therapy: preliminary results of a prospective pilot study. *Hematol Oncol* 1997;14:93-4
4. Montvale NJ. Adriamycin PFS (computer program). MS-DOS version. Physicians desk reference. Medical Economics Data Production Company 1996
5. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharm* 2002;41:431-44
6. Singal PK, Deally CMR, Winberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: A concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:817-28
7. Doroshow JH. Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *N Engl J Med* 1991;324:843-5
8. Shan K, Lincoff MA, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 1996;125:47-58
9. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SD. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991;324:808-15
10. Tobin TP, Abbott BC. A stereological analysis of the effect of adriamycin on the ultrastructure of rat myocardial cell in culture. *J Mol Cell Cardiol* 1980;12:1207-25
11. Merski J, Daskal Y, Busch H. Comparison of adriamycin-induced nucleolar segregation in skeletal muscle, cardiac muscle and liver cells. *Cancer Treat Rep* 1978;62:771-8
12. Pegelow CH, Popper RW, Wit SA, King OY, Wilbur JR. Endomyocardial biopsy to monitor anthracycline therapy in children. *J Clin Oncol* 1984;2:443-6
13. Abe T, Fukamachi Y, Kanazawa Y, Furukawas H, Shimizu K, Hirano T, Kasai H, Kashimura M, Higashi K. Inhibition of nucleolar function and morphological change by adriamycin associated with heat shock protein 70 accumulation. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:945-51
14. Ellis S, Killender M, Anderson RL. Heat-induced alterations in the localization of Hsp72 and Hsp73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2000;48:321-32
15. Jeyaseelan R, Poizat C, Wu HY, Kedes L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Biol Chem* 1997;272:5828-32
16. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727-41
17. Löw-Friedrich I, von Bredow F, Schoeppe W. In vitro studies on the cardiotoxicity of chemotherapeutics. *Chemother* 1990;36:416-21
18. Anselmi G, Strauss M, Chazzin G, Eleizalde G, Machado I, Pulido C, Alvarez M, Mathinson Y. Adriamycin cardiotoxicity. An experimental diagnostic, treatment and prevention study. Prevention of adriamycin (ADM) cardiotoxicity with L-carnitine. Experimental and clinical data. Proceedings, World Congress of Paediatric Cardiology and Cardiac Surgery. París, Francia 1993
19. Strauss M, Anselmi G, Hermoso T, Tejero F. Carnitine promotes heat shock protein synthesis in adriamycin-induced cardiomyopathy in a neonatal rat experimental model. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2319-25
20. Zeidán Q, Strauss M, Porras N, Anselmi G. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002;34:315-21