



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Troponina I: Relevancia molecular y clínica en  
cardiopatía isquémica y otras condiciones clínicas  
que afectan la interpretación de la prueba.**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARÍA ESPERANZA GONZÁLEZ NAVARRO

México, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente César Domínguez Camacho

Vocal Laura Peniche Villalpando

Secretaria María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez

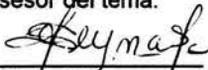
1er suplente Rosalinda Velázquez Salgado

2º suplente Eduardo Cumming González

**Sitio donde se desarrolló el tema**

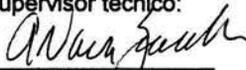
Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México.

Asesor del tema:



\_\_\_\_\_  
QBP. María del Socorro Cecilia  
Reyna Rodríguez

Supervisor técnico:



\_\_\_\_\_  
Dr. Arnulfo H. Nava Zavala

Sustentante:



\_\_\_\_\_  
María Esperanza González Navarro

## DEDICATORIAS

A mis padres Ana y Jaime

Por su paciencia y por su apoyo, pero sobre todo por sus enseñanzas y por la educación que me dieron fuera de las aulas.

A mis hermanas Ana Laura y Raquel

Por ser ambas diferentes y grandes ejemplos y por los momentos de diversión de verdaderas amigas.

A mi cuñado Jorge

Por compartir conmigo el orgullo de ser Universitaria y Puma de corazón.

A mi amor Carlos

Por su compañía y apoyo, por siempre llevarme de la mano y por estar a mi lado en esta nueva etapa.

A mi sobrinita Ana Paula

Simplemente por llegar

A mis amigas las Caraos Mirén, Andrea e Irais

Por ser grandes compañeras y sobre todo por ser las mejores amigas para olvidar los momentos difíciles durante estos años de carrera.

A mi gran amiga Ruth

Por compartir no solo la carrera sino también tantas experiencias en el deporte y en la diversión.

A mis amigos Betito, Emilio y Lalo

Por ser parte del equipo en los buenos y en los malos momentos

## AGRADECIMIENTOS

A Cecy y a su familia

Por tolerar tardes de trabajo y dedicarme tiempo y así lograr sacar adelante este proyecto.

Al Dr. Amulfo Nava

Quien me brindó toda su ayuda, apoyo y opinión profesional durante el desarrollo de este tema.

A Lupita, Bibis, Nancy, Ara, Ale y José

De quienes aprendí mucho durante mi estancia en el Laboratorio de urgencias del Instituto Nacional de Cardiología y quienes me apoyaron con consejos para hacer de este un proyecto útil.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por hacer de mi una profesionista entregada y orgullosa de ser Universitaria

## INDICE GENERAL

PÁG.

OBJETIVOS.....	13
1. ANTECEDENTES.....	14
1.1 HISTORIA DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	15
1.1.1 Fase I: Marcadores enzimáticos.....	15
1.1.2 Fase II: Marcadores Proteicos.....	16
1.1.3 Fase III: Estudios clínicos.....	18
1.1.4 Fase IV: Pruebas de Punto de Cuidado (POCT).....	19
1.2 LIBERACIÓN DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DESPUÉS DE UNA ISQUEMIA MIOCÁRDICA Y NECROSIS.....	19
1.2.1 Concepto de "alta especificidad, bajo valor de corte".....	20
1.2.2 Concepto de daño reversible.....	22
2. MECANISMOS CELULARES.....	25
2.1 ESTRUCTURA DE LOS MIOCITOS.....	25
2.1.1 Miocitos, miofibrillas y sarcómero.....	25
2.1.2 Sarcolema, discos intercalados y retículo sarcoplásmico.....	27
2.1.3 Proteínas contráctiles.....	29
2.1.3.1 Estructura del filamento grueso.....	29
2.1.3.1.1 Miosina.....	29
2.1.3.2 Estructura del filamento delgado.....	30
2.1.3.2.1 Actina.....	31
2.1.3.2.2 Troponina y Tropomiosina.....	31
2.2 ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	34
2.2.1 Puentes cruzados en reposo y en trabajo.....	34
2.2.1.1 Puentes cruzados en el reposo: puentes cruzados bloqueados y débilmente unidos en estado diastólico.....	35

2.2.1.2	Puentes cruzados en el trabajo: interacciones moleculares que generan el trabajo de los miofilamentos.....	36
2.2.2	Activador Troponina-Tropomiosina- $Ca^{2+}$ .....	37
2.2.3	Inhibición por la TnI.....	37
2.2.3.1	Posición del péptido inhibidor.....	37
2.2.3.2	Dominio de la TnC al que se une la región inhibidora de la TnI.....	38
2.2.3.3	Modelos moleculares de la región inhibidora que se une a la TnC.....	39
2.2.3.3.1	Modelo Molecular de la región inhibidora de la TnI unida a la TnC.....	39
2.2.3.3.2	Modelo del complejo de TnI-TnC.....	41
2.2.4	Unión del $Ca^{2+}$ a la TnC.....	42
2.2.4.1	Estructura cristalina de TnC.....	42
2.2.4.2	La contracción muscular se activa por la unión del $Ca^{2+}$ a sitios de baja afinidad.....	42
2.2.4.3	Modelo de la transición inducida por el $Ca^{2+}$ en el dominio $NH_2$ -terminal de la TnC.....	44
2.2.5	La TnC elimina la inhibición dada por la TnI .....	44
2.2.5.1	Sitios de TnC involucrados en las interacciones dependientes e independientes de $Ca^{2+}$ con TnI.....	45
2.2.5.2	Las interacciones dependientes de $Ca^{2+}$ se dan entre los dos dominios de TnC y las regiones inhibidora y COOH-terminal de la TnI.....	45
2.2.5.3	Las interacciones independientes de $Ca^{2+}$ ocurren entre la región COOH-terminal de la TnC y la región $NH_2$ -terminal de la TnI.....	46

2.2.5.4	Organización antiparalela de la interacción TnI-TnC....	46
2.2.5.5	Movimiento dependiente de $Ca^{2+}$ de las regiones inhibidora y COOH-terminal de la TnI con respecto a la TnC y a la actina.....	47
2.2.6	Papel de la TnT y de la Tropomiosina.....	48
2.2.6.1	La TnT liga al complejo de la troponina con la tropomiosina.....	49
2.2.6.2	Papel de la TnT en el mecanismo regulador.....	49
2.2.6.3	Transmisión de la señal de unión de $Ca^{2+}$ de la TnC a la TnI.....	50
2.2.6.4	Señalización entre TnI-TnC, TnC-TnT y TnT-Tm.....	52
2.2.6.5	Resumen de eventos moleculares que disparan la transición Diástole/Sístole.....	55
2.2.7	Interacciones moleculares que mantienen y potencian la activación de los miofilamentos.....	56
2.2.8	El complejo Tn-Tm adapta la actividad del miofilamento a las demandas hemodinámicas.....	58
2.2.8.1	La fosforilación de las proteínas modula la activación de los miofilamentos.....	60
2.2.8.2	La activación de los miofilamentos depende de la longitud del sarcómero y de la carga sanguínea.....	61
3.	TROPONINA I EN ISQUEMIA MIOCARDICA.....	64
3.1	CINETICA DE LA TROPONINA I.....	64
3.2	COMPORTAMIENTO DE LA cTnI EN ISQUEMIA CARDIACA.....	76
4.	OTRAS CONDICIONES CLÍNICAS QUE AFECTAN LA CONCENTRACIÓN DE cTnI.....	79
5.	PRUEBAS PARA LA DETERMINACIÓN DE TROPONINA I.....	82
5.1	ANTECEDENTES.....	82

5.2	PRINCIPIOS PARA LA SELECCIÓN DE PRUEBAS.....	83
5.3	ESTANDARIZACIÓN DE ENSAYOS.....	84
5.4	TOMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	87
5.4.1	Frecuencia de muestreo.....	87
5.4.1.1	Circunstancias especiales.....	87
5.4.2	Condiciones de Muestreo.....	88
5.4.3	Preparación de la muestra.....	88
5.5	CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS ACTUALES PARA cTnl.....	90
5.5.1	Sistema de Inmunoensayo ACCESS® .....	90
5.5.2	Sistema Stratus II® .....	95
5.5.3	Sistema AxSYM® .....	96
5.5.4	Sistema de Inmunoensayo Opus™ plus.....	99
6.	DISCUSIÓN.....	103
7.	CONCLUSIONES.....	109
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	110

## INDICE DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1.1 Historia de los marcadores de daño miocárdico.....	21
Figura 1.2 Selección de los valores de corte y su efecto en la detección de daño miocárdico menor.....	24
Figura 2.1 Representación esquemática del músculo.....	26
Figura 2.2 Representación de los filamentos grueso de miosina y delgado de actina.....	32
Figura 2.3 Episodios de la contractilidad del músculo cardíaco.....	34
Figura 2.4 Modos de activación de los miofilamentos cardíacos delgados.....	38
Figura 2.5 Organización del complejo de troponina.....	43
Figura 2.6 Organización de la Interacción de los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina.....	48
Figura 3.1 Isquemia concebida como desequilibrio entre oferta y demanda de Oxígeno.....	64
Figura 3.2 Diversas manifestaciones de la isquemia cardíaca.....	65
Figura 3.3 Esquema de la glucólisis.....	67
Figura 3.4 Formación de la célula espumosa.....	69
Figura 3.5 Cascada de la coagulación.....	69
Figura 3.6 Fases de la liberación de cTnT y de cTnI después de un IAM.....	72
Figura 3.7 Productos modificados de la cTnI inducidos por la isquemia.....	75
Figura 5.1 Esquema de la reacción del ensayo de tipo competitivo del sistema ACCESS®.....	92
Figura 5.2 Esquema de la reacción del ensayo tipo sándwich de 1 paso del sistema ACCESS®.....	93
Figura 5.3 Esquema de la reacción del ensayo tipo sándwich de 2 pasos del sistema ACCESS®.....	94
Figura 5.4 Equipo de inmunoensayo ACCESS®.....	95
Figura 5.5 Equipo de Inmunoensayo STRATUS® II .....	95
Figura 5.6 Secuencia de reacciones del ensayo MEIA del sistema AxSYM®.....	97
Figura 5.7 Equipos de inmunoensayo AxSYM y AxSYM Plus.....	99

Figura 5.8 Equipo de inmunoensayo Opus®..... 99

**INDICE DE TABLAS****PÁG.**

Tabla 1.1 Características de los marcadores bioquímicos de daño miocárdico.....	17
Tabla 1.2 Resultados de pacientes con daño miocárdico menor e isquemia reversible .....	23
Tabla 3.1 Medición de las diferentes formas de cTnI.....	72
Tabla 3.2 Cinética de la liberación de cTnI en pacientes con IAM.....	73
Tabla 3.3 Alteración progresiva de la cTnI con el incremento de la severidad de la isquemia.	75
Tabla 5.1 Detalles de los ensayos comerciales para troponina cardiaca.....	101

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>AE</b>	Angina Estable
<b>AI</b>	Angina Inestable.
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>CK</b>	Creatin Kinase (Creatina cinasa)
<b>CKMB</b>	Fracción MB de la creatina cinasa
<b>CLIA</b>	Inmunoensayo con quimioluminiscencia
<b>CLR</b>	Cadena ligera reguladora.
<b>cTnl</b>	Troponina I cardiaca
<b>cTnT</b>	Troponina T cardiaca
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>ECLIA</b>	Inmunoensayo con electroquimioluminiscencia.
<b>EKG</b>	Ecocardiograma.
<b>FNT-<math>\alpha</math>.</b>	Factor de necrosis tisular alfa
<b>FPIA</b>	Inmunoensayo con polarización y fluorescencia.
<b>IAM</b>	Infarto Agudo de Miocardio
<b>IFCC C-SMCD</b>	International Federation of clinical Chemistry. Committee for standardization of markers for cardiac disease
<b>IFCC</b>	International Federation Of Clinical Chemistry (Federación Internacional de Química Clínica)
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Ip</b>	Péptido Inhibidor
<b>MEIA</b>	Micropartícles enzymatic immunoassay (Inmunoenzayo enzimático con micropartículas.)
<b>NACB</b>	National academy of clinical biochemistry (Academia nacional de bioquímica clínica)
<b>OMS</b>	Organización mundial de la Salud.
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva.
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C.
<b>POCT</b>	Point of care tests (Pruebas de punto de cuidado)
<b>PTCA</b>	Angioplastia Coronaria Transluminal Percutánea.
<b>REA</b>	Tecnología de atenuación de energía radiante.
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RS</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>SCA</b>	Síndrome(s) Coronario(s) Agudo(s)
<b>Segmento ST</b>	Se refiere al segmento del la señal del electrocardiograma que va desde la onda S hasta la onda T
<b>Tm</b>	Tropomiosina
<b>TnC</b>	Troponina C
<b>TnCmr</b>	Troponina C de músculo rápido
<b>Tnl</b>	Troponina I
<b>TnT</b>	Troponina T
<b>Tnlmr</b>	Troponina I de músculo rápido

## OBJETIVOS

En el presente proyecto pretendemos:

1. Hacer una revisión de las troponinas, especialmente la troponina I cardiaca, enfocándonos en los siguientes puntos:

- a. ¿Qué son?
- b. ¿En dónde están?
- c. ¿Cómo están formadas?
- d. ¿Cuál es su importancia en la contracción muscular?

2. Determinar ¿Cómo ocurre la degradación de las troponinas?

3. Establecer la importancia de la determinación de troponina en casos de Isquemia.

4. Interpretar cómo la estructura y bioquímica de las troponinas influyen en los aspectos analíticos de los ensayos disponibles para su determinación.

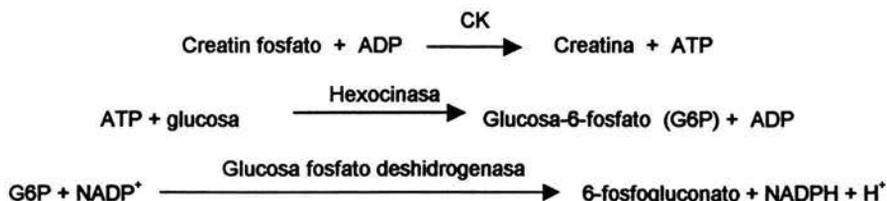
## 1. ANTECEDENTES

La medición de los marcadores cardíacos en sangre ha sido lo primordial para el diagnóstico de IAM por casi 50 años. El campo ha evolucionado desde la medición de la actividad de las enzimas hasta las concentraciones de masa de las proteínas utilizando inmunoensayos automatizados no isotópicos. Con el cambio de la práctica clínica, los marcadores cardíacos ahora son necesarios para detectar la presencia de un infarto menor en pacientes con angina inestable (AI). Los resultados de los estudios han demostrado que los pacientes con troponina elevada presentan un mayor riesgo de IAM y de muerte a corto plazo. El desarrollo reciente involucra el uso de marcadores cardíacos para seleccionar la terapia más apropiada para los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA). El éxito de los nuevos marcadores cardíacos como la troponina se debe a su alta especificidad de tejido cardíaco y a la existencia de ensayos con bajos límites de detección. Las enzimas tradicionales como la CK o la CKMB se cree que son liberadas únicamente en situaciones de necrosis miocárdica irreversible. En el caso de la troponina cardíaca, las observaciones clínicas y estudios en animales sugieren que la troponina citosólica libre ha de ser liberada en la isquemia irreversible además de los casos de daño celular irreversible. El subcomité para la estandarización de marcadores cardíacos de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC S-SCM) ha recomendado el uso de dos valores de corte para la troponina cardíaca para diferenciar el daño miocárdico menor del normal y del IAM. Un valor de corte bajo debe detectar eventos isquémicos irreversibles en algunos casos <sup>(1)</sup>.

## 1.1 HISTORIA DE LOS MARCADORES BIOQUIMICOS

### 1.1.1 FASE I: MARCADORES ENZIMÁTICOS

En la Figura 1.1, fases I a IV se muestra una breve historia del uso de biomarcadores séricos en la enfermedad cardiaca <sup>(1)</sup> y en la tabla 1.1 se presentan las características de los marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica <sup>(2)</sup>. El primer marcador para diagnóstico de IAM fue descrito en 1954 por Karmen y colaboradores<sup>(3)</sup>, quienes utilizaron a la Aspartato aminotransferasa (AST) anteriormente llamada glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) sérica. En un solo año, los mismos investigadores describieron el uso de la Lactato Deshidrogenasa (LD) en IAM<sup>(4)</sup>. En 1960, la Creatincinasa (CK) fue descrita por primera vez para ser usada en pacientes con IAM<sup>(5)</sup>. El ensayo enzimático acoplado fue desarrollado por Oliver <sup>(6)</sup> y modificado por Rosalki<sup>(7)</sup> unos cuantos años después, y se ha convertido en la base del ensayo estándar de la IFCC para la CK<sup>(8)</sup>:



Muy rápido se reconoció que la especificidad de la AST, LD y CK no era tan alta para las enfermedades cardiacas, y que el daño hepático y de músculo esquelético, y la hemólisis producían resultados falsos positivos. Sin embargo la medición de las isoenzimas se hizo para mejorar la especificidad de la medición total de las enzimas. Los ensayos para CK y para isoenzimas de LD inicialmente fueron desarrollados utilizando electroforesis. Puesto que este ensayo consumía tiempo y era difícil de automatizar, pronto se desarrollaron los ensayos de inmunoinhibición que hicieron uso de anticuerpos específicos que se unían estéricamente e inhibían a la subunidad M de la fracción CK-MM y CK-MB. En ausencia

de la CK-BB y de macro formas de CK, la actividad enzimática residual se debía a la subunidad B de la fracción CK-MB. Este ensayo permanece siendo popular debido a su bajo costo, y a su disponibilidad en analizadores químicos clínicos generales. Una modificación a este ensayo fue la introducción de un paso de precipitación (inmunoprecipitación), según el cual se añadía un segundo anticuerpo precipitado al ensayo el cual reconocía al primero. El anticuerpo precipitado permite una determinación en blanco, mientras remueve a las isoenzimas CK-MM y CK-MB y a las isoenzimas de LD <sup>(1,9 y 10)</sup>.

#### **1.1.2 FASE II: MARCADORES PROTEICOS**

Los primeros marcadores para enfermedad cardíaca fueron las enzimas cuya actividad era medida para determinar la extensión del daño cardíaco. El desarrollo de la medición con inmunoensayos permitió la determinación de la concentración de la enzima, lo cual no dependía de si la enzima estaba activa o no. Estos "ensayos de masa" también permitieron la medición de proteínas marcadoras las cuales no eran enzimáticas. Esto llevó a que se investigaran muchos otros potenciales marcadores de daño cardíaco. Utilizando radioinmunoensayos (RIA), la mioglobina fue la primera proteína marcadora investigada para los casos de IAM <sup>(11)</sup>. (Figura 1.1, fase II). La mioglobina aparece en la sangre después de la necrosis del miocardio <sup>(9)</sup> antes que las enzimas cardíacas como AST, CK o LD debido a su bajo peso molecular de 17 KDa. Sin embargo, el RIA no era un método conveniente de rutina y para análisis estadístico, y no hubo un interés clínico en este ensayo hasta que se desarrollaron los inmunoensayos automatizados no isotópicos y estuvieron disponibles a principios de la década de los 90's <sup>(12)</sup>. La mioglobina no se usa rutinariamente en muchos hospitales alrededor del mundo

Tabla 1.1

CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE NECROSIS MIOCÁRDICA					
Marcador Bioquímico	Peso Molecular (Daltons)	Especificidad cardíaca	Dependencia de la función renal	Aumento Precoz	Duración de la elevación
Mioglobina	18 000	NO	SI	1-3 horas	12-24 horas
CK <sub>total</sub>	85 000	NO	NO	4-8 horas	36-48 horas
CK-MB	85 000	++	SI	3-4 horas	24-36 horas
cTnT	37 000	++++	SI	3-4 horas	10-14 días
cTnI	23 500	++++	SI	4-6 horas	4-7 días

El primer ensayo manual para masa de CK-MB fue descrito en 1985, utilizando anticuerpos anti CK-M y anti CK-B. Un año después, se desarrolló un anticuerpo monoclonal anti CK-MB en la universidad de Washington en San Luis. Hoy, virtualmente, todos los ensayos comerciales de masa de CK-MB hacen uso de este anticuerpo monoclonal ya sea como anticuerpo de captura o de señal. La CK-MB aún se considera el marcador de oro para IAM.

Los ensayos para troponina T cardíaca (cTnT) y para troponina I cardíaca (cTnI), fueron desarrollados a finales de la década de los 80's<sup>(61 y 13)</sup>. La troponina cardíaca es superior a la CK-MB porque la troponina de músculo esquelético es estructuralmente diferente de la troponina cardíaca, y no hay reactividad cruzada de anticuerpos en los ensayos de la generación actual. La mioglobina y la CK-MB del corazón son idénticas a la encontrada en músculo esquelético. Debido a las restricciones de patente, los ensayos para cTnT están disponibles de un solo fabricante, (Roche Boehringer Mannheim Corporation), mientras que los ensayos para cTnI están disponibles en múltiples compañías. Un aspecto importante para la

cTnI es la estandarización de los resultados del ensayo. Esto es el objetivo principal de la IFCC S-SCM.

### 1.1.3 FASE III: ESTUDIOS CLÍNICOS

En la figura 1.1, fase III, se muestra un resumen de las pruebas clínicas importantes y de sus conclusiones. En 1979, la OMS publicó una guía sobre los criterios para diagnosticar IAM, lo cual requiere de dos de las siguientes tres condiciones: una historia clínica positiva de dolor pectoral, resultados electrocardiográficos inequívocos y/o una serie de resultados anormales de las enzimas. Aunque han sido propuestas algunas revisiones sobre estas recomendaciones, estos criterios aun son de uso general.

Han habido grandes estudios clínicos históricos que han sido conducidos y que han dejado un impacto significativo en la práctica de la cardiología y en el papel de los marcadores séricos cardiacos <sup>(14)</sup>. El estudio de "Trombólisis en Infarto Miocárdico" (TIMI) comenzó en 1987 y compara a la estreptocinasa intravenosa con el activador de plasminógeno de tejido. El estudio "Uso Global de Estrategias para abrir Arterias Coronarias Obstruidas" (GUSTO) inició en 1993 y examina múltiples estrategias trombolíticas. Desde estos inicios, han habido varios estudios más TIMI y GUSTO que se han dirigido a aspectos continuos. Aunque estos no se enfocaron principalmente en los marcadores cardiacos, se recolectó sangre de los pacientes y se realizaron estudios de forma paralela con las muestras tomadas.

Los primeros en demostrar el uso de la cTnT para estratificar el riesgo fueron Hamm y colaboradores <sup>(15)</sup>. Estos investigadores mostraron en 84 pacientes, que aquellos con AI y concentraciones anormales de cTnT tenían una incidencia de muerte en hospitales por IAM significativamente más alta que un grupo de pacientes con AI con resultados negativos de troponina. Estas observaciones preliminares fueron confirmadas por varios estudios publicados simultáneamente en 1996 por ejemplo el estudio GUSTO-IIa para cTnT y el TIMI-IIIb para cTnI. Habiendo demostrado la utilidad de los marcadores cardiacos para la estratificación del riesgo,

el siguiente paso era determinar si los pacientes con AI de alto riesgo eran prospectos para ser tratados y reducir el riesgo a corto plazo. Dos estudios con fármacos aleatorios han sido conducidos utilizando heparina de bajo peso molecular (dalteparin) y un inhibidor de glicoproteína IIb/IIIa (abciximab). Estos estudios mostraron que los pacientes con AI con concentraciones normales de cTnT tenían una incidencia menor de eventos cardiacos cuando el tratamiento con fármacos era dado mientras se comparaba con un placebo. No se observó un beneficio por encima del placebo en pacientes con AI con valores normales de cTnT.

#### **1.1.4 FASE IV: PRUEBAS DE PUNTO DE CUIDADO (POCT)**

La figura 1.1, fase IV, se presenta para completar la historia, y para proveer de una visión de los importantes estudios publicados en relación a las POCT relacionadas con marcadores cardiacos en enfermedad cardiaca isquémica. Collison publicó un artículo con una descripción detallada sobre estas pruebas <sup>(16)</sup>.

### **1.2 LIBERACIÓN DE LOS MARCADORES BIOQUIMICOS DESPUÉS DE UNA ISQUEMIA MIOCÁRDICA Y NECROSIS**

Una pregunta importante para la interpretación de la liberación de un marcador cardiaco en sangre de pacientes con SCA es el origen subcelular de la liberación del marcador. Por varios años se ha sabido que las enzimas tradicionales como la CK y la LD son liberadas desde pools citosólicos hacia la circulación por los sistemas linfáticos cardiacos. La CK-MB exhibe una liberación monofásica después de un IAM y un daño miocárdico menor irreversible. Debido al alto peso molecular de estas enzimas estas proteínas no se filtran a través de la membrana a menos que el miocito esté dañado irreversiblemente. La troponina cardiaca se encuentra ligada a la Tm de músculo estriado como parte de un complejo de 3 subunidades: T, I y C <sup>(17)</sup>. Cerca del 6 a 8% de la TnT y del 2.8 al 4.1 % de la TnI se encuentran en el citosol como subunidades

libres <sup>(18)</sup> . Después de un IAM y de un daño miocárdico menor irreversible, la liberación de la cTnT es bifásica, con una liberación inicial debida al pool libre en el citosol, y una liberación prolongada debida al daño del aparato contráctil. Una pregunta importante es si la cTnT o la cTnI atraviesan o no la membrana de la célula miocárdica en la isquemia reversible. El peso molecular de estas proteínas de 21-24 KDa a 33-35 KDa respectivamente, es substancialmente menor que el de la CK y LD <sup>(18)</sup> . Los datos de estudios clínicos han mostrado que la troponina cardiaca a menudo se incrementa en pacientes con valores normales de CK, CK-MB y LD en un grupo de pacientes con SCA. Existen dos explicaciones para estas observaciones: 1) la alta sensibilidad y especificidad de la troponina cardiaca permite usar bajos valores de corte y una mejor detección de un daño miocárdico menor, y 2) la troponina es liberada tanto en casos de isquemia reversible (forma citosólica) como en casos de isquemia irreversible (forma citosólica y estructural).

### **1.2.1 CONCEPTO DE “ALTA ESPECIFICIDAD, BAJO VALOR DE CORTE”**

El hallazgo clínico de concentraciones anormales en pacientes en quienes se ha excluido IAM y en quienes los ensayos de masa de CK-MB están por debajo de un valor discriminatorio para infarto se denomina “daño miocárdico menor” <sup>(19)</sup> . Esta situación ocurre aproximadamente en el 20-40% de los pacientes con AI. Las diferencias en como las concentraciones de corte son seleccionadas entre los dos ensayos es la causa de estas observaciones. Para los marcadores no-específicos tales como la CK-MB, las concentraciones de corte han sido elegidas tradicionalmente para diferenciar entre individuos normales, pacientes con angina estable (AE), y pacientes con AI e individuos con IAM <sup>(20)</sup> (Figura 1.2). El uso de valores de corte más bajos causaría resultados positivos en pacientes y sujetos con daño o enfermedad de músculo esquelético. Debido a que la troponina cardiaca es un marcador muy específico, se puede elegir una concentración de corte muy baja para diferenciar entre pacientes normales o pacientes con AE y pacientes con daño causado por AI e IAM, sin

importar que el rango para resultados falsos positivos se vea substancialmente incrementado. El hecho de que la troponina se encuentre en mayor cantidad en tejido que la CK-MB, también hace a estos ensayos mas sensibles para daño miocárdico irreversible menor. Los casos #1 al

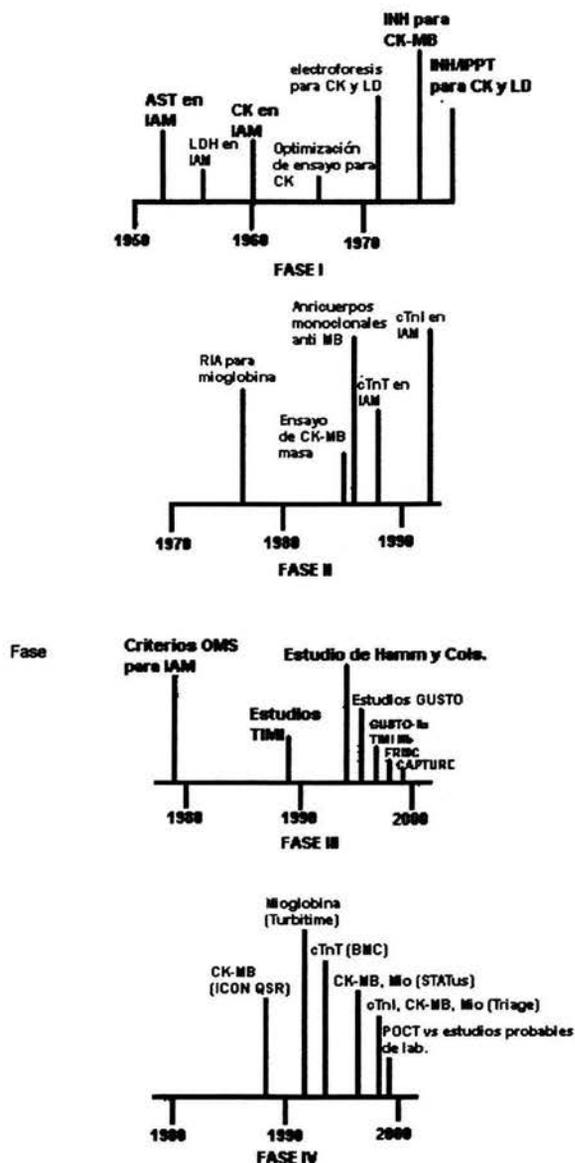


Figura 1.1 Fase I: Uso de Enzimas como marcadores no específicos de IAM; Fase II: evolución de la medición de la concentración de la masa de proteínas y enzimas; Fase III: Uso de marcadores altamente sensibles y específicos para estratificar el riesgo y elegir la terapia adecuada; IV: tecnología cualitativa y cuantitativa de punto de cuidado para marcadores cardiacos .

7 de la tabla 1.2, enlistan los resultados de pacientes con daño miocárdico menor documentado que tienen concentraciones anormales de troponina cardiaca y de CK-MB que se encuentran por debajo del valor de corte para IAM. Haciendo un análisis retrospectivo dentro de los tres meses seguidos a la presentación inicial del paciente en el hospital antes de la muerte cardiaca o de IAM se confirma que se había sufrido un daño miocárdico menor al momento de la presentación. El uso de valores de corte bajos no explica todos los datos que comparan a la TnT con la CK-MB <sup>(1)</sup>.

### **1.2.2 CONCEPTO DE DAÑO REVERSIBLE**

Esta hipótesis sugiere que durante la anoxia causada por el bajo flujo sanguíneo y por la isquemia miocárdica, hay un filtrado de proteínas de bajo peso molecular, tales como la cTnT y cTnI, hacia el torrente sanguíneo. Aún cuando los miocitos estén en un estado reversible, la recuperación del flujo sanguíneo en estos pacientes podría resultar en una recuperación total de las células peligrosamente afectadas. Como se resume en una revisión previa, esta hipótesis es sugerida por varias observaciones clínicas y resultados en animales de laboratorio <sup>(1)</sup>.

Tabla 1.2

RESULTADOS DE PACIENTES CON DAÑO MIOCÁRDICO MENOR E ISQUEMIA REVERSIBLE <sup>a</sup>		
Número de paciente	CK-MB <sup>b</sup>	cTnT o cTnI
1	3.0	1.00 (T)
2	7.7	14.5 (T)
3	1.9	1.79 (I)
4	3.3	3.02 (I)
5	4.1	4.87 (I)
6	4.4	0.92 (I)
7	4.7	4.90 (I)
CK-MB negativa		
8	< 0.6	0.10 (T)
9	< 0.6	0.13 (T)
10	< 0.6	0.21 (T)
11	< 0.6	1.17 (I)
12	< 0.6	1.43 (I)
13	< 0.6	1.45 (I)
14	< 0.6	1.58 (I)

<sup>a</sup> Todos sufrieron muerte cardíaca subsecuente o IAM dentro de los 3 meses posteriores a la presentación inicial.

<sup>b</sup> CK-MB de Opus Plus Ø. Límite superior normal 5.0 µg/L. Valor de corte para IAM ≥ 10.0 µg/L, cTnT medida en ES300 (Roche BMC) y cTnI en Opus Plus (Dade Behring). Rango normal 0-0.04 y 0.50 µg/L, respectivamente. Valor de corte para IAM 0.20 y 2.0 µg/L, respectivamente. Datos tomados de los insertos de los paquetes excepto para los valores de corte de IAM de cTnT.

Los casos # 8 a 14 de la tabla 1.2 enlistan los resultados de los pacientes confirmados con daño miocárdico menor y en quienes la concentración de CK-MB estaba por debajo del límite de detección. Estos casos no encajan en la hipótesis de que la troponina cardíaca es capaz de detectar el daño cardíaco de mejor manera debido a que se puede usar un valor de corte mas bajo para la CK-MB. Es posible que en algunos de estos casos, la concentración de CK-MB fuera negativa debido a que ésta ya había regresado a valores normales antes que la troponina. Como sea, en algunos de estos casos, tanto la concentración de CK-MB como la de troponina estaban normales inicialmente y solo la troponina se hizo cuantificable en muestras subsecuentes. En estas situaciones, la aparición de troponina cardíaca en sangre podía haber sido el resultado del daño por isquemia reversible. Los estudios clínicos en pacientes que pasan por angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), terapia con radioablación, y cardioversión transtorácica, han mostrado que la troponina cardíaca puede ser liberada en

casos de daño miocárdico menor que no va acompañado de incrementos significantes de CK-MB.

La hipótesis es que la liberación de la troponina cardiaca en la isquemia reversible se origina del pool citosólico de proteína libre y no de los elementos estructurales. Si esta suposición es correcta, la detección incrementada de troponina en estos pacientes no se puede explicar con el alto contenido de troponina en el tejido en relación con la CK-MB. El contenido libre en el citosol de cTnT es cerca de 0.8 mg/g (7% x 10.8 mg/g) y 0.17 mg/g (3.5 % x 5 mg/g), lo cual es más bajo que el contenido total en el citosol de CK-MB de 1.4 mg/g en peso húmedo.

Si la cTnT y la cTnI son liberadas hacia la sangre en situaciones tanto reversibles como irreversibles de isquemia, entonces se apoya la recomendación hecha por el IFCC C-SMCD de que se deben de usar dos valores de corte para la interpretación de los resultados de troponina cardiaca. El primer valor se establece en el límite superior normal y permite la detección de un daño miocárdico menor. El segundo se establece para diferenciar entre una AI y un IAM, y se usa para detectar la presencia de un daño irreversible (Figura 1.2). Este último valor de corte sería consistente con el que se usa actualmente para la CK-MB. Estas hipótesis y propuestas están siendo dejadas así para estimular discusiones y experimentación en un futuro <sup>(1)</sup>.



Figura 1.2 La selección de los valores de corte y su efecto en la detección de daño miocárdico menor. Debido a la no-especificidad de la masa de CK-MB, los valores de corte son seleccionados para diferenciar entre la AI e IAM. Los pacientes con daño miocárdico menor tendrán resultados por debajo del valor de corte. El uso de un valor de corte más bajo, resultaría en un incremento de resultados falsos positivos en pacientes con daño o enfermedad de músculo esquelético. Para los marcadores que son altamente específicos como la troponina cardiaca, un valor de corte bajo puede ser usado para detectar la presencia de un daño miocárdico menor sin generar un gran número de resultados falsos positivos.

## 2. MECANISMOS CELULARES

### 2.1 ESTRUCTURA DE LOS MIOCITOS

#### 2.1.1 Miocitos, miofibrillas y sarcómeros

Los miocitos ventriculares (fibras miocárdicas) normalmente presentan una longitud de 100 a 120  $\mu$  y 15 a 25  $\mu$  de diámetro. Los miocitos auriculares son más pequeños; los miocitos del sistema de conducción (fibras de Purkinje) son más grandes en ambas dimensiones. Cada miofibrilla está formada por numerosas fibrillas estriadas dispuestas en sentido longitudinal, las cuales, a diferencia de lo que sucede en el músculo esquelético, están parcialmente separadas por inclusiones citoplasmáticas que contienen mitocondrias y túbulos.

Cada *miofibrilla* está compuesta por sarcómeros iguales, dispuestos longitudinalmente y separados por dos líneas oscuras adyacentes, las **líneas Z**. Los **sarcómeros** ocupan cerca del 50% de la masa de las fibrillas cardíacas y se ordenan de manera que los extremos de las miofibrillas adyacentes están alineadas, obteniéndose así una imagen estriada. Los sarcómeros varían entre 1.6 y 2.2  $\mu$ , según la longitud del músculo. El centro del sarcómero está ocupado por una banda oscura, la **banda A** (banda anisotrópica o birrefringente que rota la luz polarizada) y tiene una longitud de 1.5  $\mu$ . La banda A está limitada por dos bandas más delgadas, denominadas **bandas I** (isotrópicas) de longitud variable en función de la longitud del sarcómero. Las bandas de los sarcómeros reflejan la superposición de los filamentos constituidos por proteínas contráctiles. Los **filamentos delgados** de actina están unidos a cada línea Z y se proyectan en sentido longitudinal hacia el centro de los sarcómeros, en donde se superponen con los **filamentos gruesos** compuestos de moléculas de miosina (figura 2.1). Las interacciones entre filamentos gruesos y delgados en la banda A generan la fuerza y el acortamiento del miocardio, ya que los filamentos se deslizan uno sobre otro conservando constante su longitud <sup>(21)</sup>.

El núcleo esta colocado en el centro de las fibrillas miocárdicas. Entre los miocitos adultos, lo común es encontrar fibrillas binucleadas. Las mitocondrias que constituyen cerca del 20% del volumen de las fibras son estructuras elípticas de aproximadamente  $2 \text{ a } 5 \mu \times 0.5 \mu$  y están situadas entre y junto a las miofibrillas, también debajo del sarcolema. Las mitocondrias presentan repliegues o crestas, que se proyectan hacia el centro desde su membrana superficial y contienen las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico. La gran proximidad de las mitocondrias a los filamentos contráctiles facilita la transferencia de ATP de su lugar de producción a los lugares de utilización durante el proceso contráctil <sup>(21)</sup>.

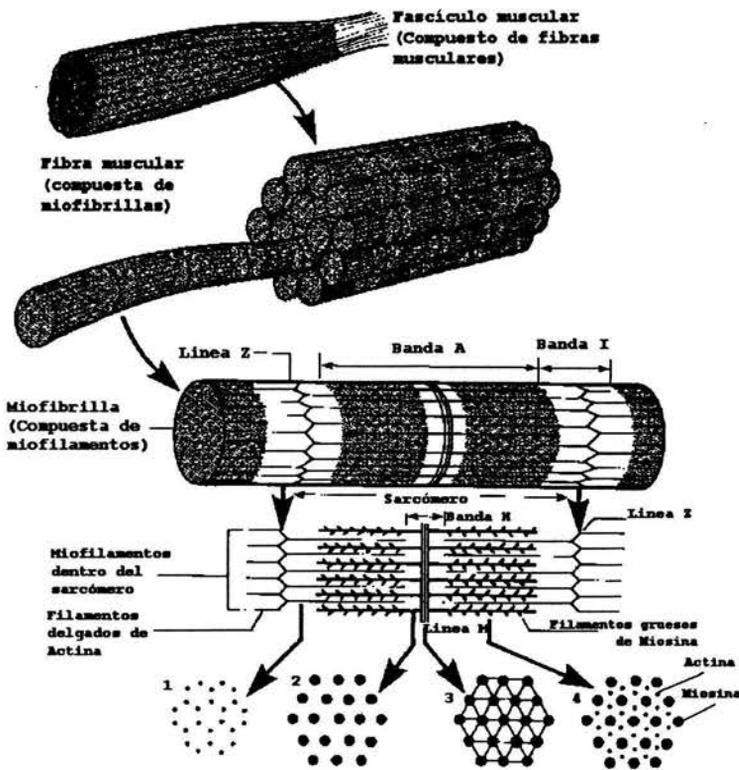


Figura 2.1. Diagrama que representa un músculo típico. Se muestran los filamentos delgados de actina y los filamentos gruesos de miosina en su arreglo para formar los miofilamentos del sarcómero. <sup>(22)</sup>

Los lisosomas son vesículas delimitadas por una membrana con un diámetro aproximado de 0.1  $\mu$  y se localizan cerca del polo del núcleo, contienen enzimas hidrolíticas latentes capaces de producir la lisis de las membranas y otros componentes celulares.

Las fibras miocárdicas que inician la actividad intrínseca en el corazón, esto es, las fibras automáticas o de marcapaso, son un poco menores que las fibras ventriculares. Las fibras del tejido específico de conducción, las fibras de Purkinje, son mucho mayores que las fibras contráctiles: contienen menor número de miofibrillas y mayores cantidades de citoplasma claro y de glucógeno, además de una vasta red externa de capilares y pequeñas terminales nerviosas.

Las fibras miocárdicas están rodeadas por una abundante red de capilares, filamentos delgados de tejido conectivo y pequeñas terminaciones nerviosas amielínicas que se encuentran libres en el espacio extracelular. Estas terminaciones nerviosas no presentan uniones específicas con las fibras cardíacas pero sí vesículas terminales con gránulos que contienen mediadores químicos. Estos mediadores son la acetilcolina que se encuentra principalmente en aurículas, fibras marcapaso y tejido de conducción específico, y la noradrenalina que, además de encontrarse en estos mismos tejidos, se encuentra también en los ventrículos: cuando se liberan, ambos mediadores químicos actúan sobre receptores localizados en la superficie de la membrana de fibras adyacentes.

Los miocitos auriculares, pero no así los ventriculares, contienen también gránulos específicos densos que representan la fuente de la hormona natriurética auricular, la cual quizá desempeñe un papel importante en el metabolismo del agua y la sal, por tanto, en el control de la presión arterial.

### **2.1.2 Sarcolemma, discos intercalados y retículo sarcoplásmico.**

Cada fibra cardíaca está separada por una membrana externa, el *sarcolemma*, que presenta invaginaciones a lo largo de las líneas Z de los sarcómeros. El sarcolemma esta

formado por una delgada capa (7 a 9 nm) bimolecular de fosfolípidos, el *plasmalema*, que es el sitio de la polarización eléctrica. Inmediatamente fuera del plasmalema, la membrana basal, está el *glucocáliz* de 50 nm de espesor a su vez compuesto de una capa interna y una externa. El plasmalema es la principal membrana semipermeable situada entre el citoplasma intracelular y el glucocáliz que contiene cargas negativas a las cuales se une el  $\text{Ca}^{2+}$  y que separa la fibra de su matriz extracelular. Las fibras miocárdicas adyacentes están conectadas entre sí en sus extremos por una porción engrosada del sarcolema llamada disco intercalado, segmento que es la unión estrecha, y que representa un sitio de baja resistencia para transmitir la actividad eléctrica entre las fibras cardíacas <sup>(21)</sup>.

Las fibras miocárdicas también están conectadas entre si mediante una red delgada de filamentos de colágena, microfibrillas delgadas y microtiras, que desempeñan un papel importante en la orientación de las fibras, distensibilidad del tejido y transmisión de la fuerza entre las fibras. Las fibras elásticas están compuestas de microfilamentos de glucoproteína y elastina amorfa. Este esqueleto contribuye de manera importante en la constitución de las propiedades diastólicas de los ventrículos y limita el grado con que el corazón se dilata en caso de sobrecarga de volumen.

La doble capa de fosfolípidos del plasmalema actúa como una barrera iónica y conserva la elevada concentración intracelular de potasio, en comparación con el potasio extracelular y la baja concentración intracelular de sodio con respecto al sodio extracelular, así como el calcio. El calcio citoplásmico es del orden de  $10^{-7}$  M ; el calcio extracelular es de  $10^{-3}$  M. Los gradientes iónicos a través de la membrana se mantienen al menos mediante 3 sistemas en el sarcolema, dos de los cuales necesitan energía proveniente del ATP: 1) la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , que es una ATPasa que intercambia sodio intracelular ( $\text{Na}_i^+$ ) por potasio extracelular ( $\text{K}_o^+$ ); 2) el intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ , que normalmente intercambia calcio intracelular ( $\text{Ca}_i^{2+}$ ) por Sodio extracelular ( $\text{Na}_o^+$ ); y 3) una bomba dependiente de ATP que extrae  $\text{Ca}^{2+}$ . Los potenciales de acción que son

fundamentales para controlar el acoplamiento excitación-contracción, están mediados por canales iónicos sensibles a voltaje.

Cerca de las líneas Z, el sarcolema presenta amplias invaginaciones, el *Sistema T*, que presenta ramificaciones longitudinales y transversales en el interior de las fibras cardiacas. Muy próximo, pero sin estar en continuidad con el sistema T, se encuentra el *retículo sarcoplásmico* (RS), que es una compleja red de canales intracelulares limitados por una membrana celular que se anastomosan entre si y presenta un diámetro aproximado de 30 nm; este sistema de túbulos rodea a cada miofibrilla y desempeña un papel importantísimo en la excitación del músculo. A diferencia del sistema T, el RS no tiene conexión con el medio extracelular. En los sitios en donde el RS se acerca a los túbulos en T o al sarcolema, el retículo se ensancha y forma dilataciones saculares en forma de cisternas. En estos lugares, el RS y el sistema T están separados por fisuras de 10 a 12 nm. La despolarización del sarcolema al propagarse a través del sistema en T, libera  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, el cual activa los filamentos contráctiles. Al igual que el sarcolema, el RS, presenta una matriz de dos capas formadas de fosfolípidos <sup>(21)</sup>.

### 2.1.3 Proteínas contráctiles

El aparato contráctil consta de filamentos superpuestos parcialmente, en forma de bastones, con una longitud constante, tanto en reposo como durante la contracción.

#### 2.1.3.1 Estructura del filamento grueso

2.1.3.1.1 *Miosina* (Figura 2.2). Los filamentos más gruesos, compuestos de moléculas de miosina, sólo se encuentran en la banda A, tienen un diámetro aproximado de 100 a 150 nm con extremos afilados, y miden de 1.5 a 1.6  $\mu$  de longitud <sup>(21 y 23)</sup>. Los filamentos de miosina son agregados perfectamente ordenados de 300 moléculas de esta proteína dispuestas longitudinalmente con peso molecular aproximado de 500 000 Da; se conservan paralelos y ordenados entre sí por el efecto de conexiones centrales en la línea M. Cada molécula de

miosina presenta una cola en forma de bastón de alrededor de 130 nm de longitud, y una cabeza en forma de dos estructuras esféricas en grupo de tres, con una separación de 14.3 nm entre cada grupo. En consecuencia existen 50 de estos conjuntos en cada mitad del filamento grueso, que rotan, de forma que una cabeza aparece alineada cada 43 nm; cuando se activa el músculo, forman uniones o puentes con los filamentos de actina, generando fuerza y produciendo acortamiento de las fibras. La miosina por si sola es capaz de disociar el ATP, es decir, actúa como una ATPasa que se inhibe por  $Mg^{2+}$  y se activa por pequeñas cantidades de  $Ca^{2+}$ . Cuando la miosina se combina con la actina se forma un complejo de actomiosina que posee una actividad enzimática todavía mayor para utilizar ATP y que se estimula fundamentalmente por  $Mg^{2+}$ . La actomiosina constituye la enzima fisiológicamente activa para desarrollar fuerza durante la contracción. Mediante la tripsina, una enzima proteolítica, la molécula de miosina se separa en dos fragmentos: la *meromiosina ligera* y la *pesada*. En esta última se encuentran las cabezas en forma de dos estructuras esféricas que son los sitios de actividad enzimática de la ATPasa.

La miosina se puede separar en tres componentes, las isoenzimas  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$ , que presentan una composición diferente en la cadena pesada. Existen únicamente dos subunidades de cadena pesada químicamente diferentes, la  $\alpha$  y la  $\beta$ .  $V_1$  y  $V_3$  están formados por  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$  mientras que  $V_2$  está formado por  $\alpha\beta$ . La ATPasa de la miosina y la velocidad intrínseca del músculo ( $V_{max}$ ) dependen de las proporciones de estas isoenzimas que están presentes, siendo que  $V_1$  es rápida y  $V_3$  es lenta.

### 2.1.3.2 Estructura del filamento delgado

Los tres principales componentes del filamento delgado del músculo esquelético son la actina, la tropomiosina y el complejo de la troponina <sup>(24)</sup>.

**2.1.3.2.1 Actina** (Figura 2.2). Los filamentos delgados que tienen una longitud de  $1.0 \mu$  en fibra ventricular, son una doble espiral alfa que consta de dos cadenas de actina con peso molecular de 47 000 Daltons y un diámetro de 55 nm. Se sabe que existen dos isoformas de actinas denominadas isoforma  $\alpha$ esquelética (fetal) e isoforma  $\alpha$ -cardiaca (adulto) <sup>(25)</sup>. Los filamentos de actina se extienden desde la línea Z a través de la banda I hasta llegar a la banda A. La banda A del sarcómero es la región en donde se superponen los filamentos gruesos y delgados, en tanto que la banda I sólo contiene filamentos delgados. La polaridad de la actina determina la dirección del movimiento de los puentes cruzados cuando la actina funciona en el sarcómero. Los filamentos delgados de actina en los extremos opuestos del sarcómero inhiben la formación de puentes cruzados cuando los filamentos delgados presentan doble superposición a longitudes cortas del sarcómero.

**2.1.3.2.2 Troponina y Tropomiosina** (Figura 2.2). Estas proteínas son las que controlan la contracción; constituyen cerca del 10% del total de las proteínas de las miofibrillas y se relacionan con el filamento delgado. La tropomiosina (**Tm**) es una proteína en forma de bastón de 400 nm de longitud y de 20 a 30 nm de diámetro, con un peso molecular de 70 000 Da. Presenta la forma de dos espirales, cada una de las cuales se sitúa cerca del surco entre las cadenas de actina. La Tm forma una cadena continua a través de la porción central del filamento de actina, mientras que el complejo de troponina se localiza a intervalos de 365 nm. La troponina puede separarse en tres componentes: 1) la **troponina C (TnC)**, factor excitador de calcio, que se une al  $Ca^{2+}$ , 2) la **troponina I (TnI)**, un factor inhibidor de la ATPasa de la actomiosina estimulada por el  $Mg^{2+}$ , y 3) la **troponina T (TnT)**, necesaria para que funcione todo el complejo de la troponina y sirve para que el complejo de la troponina se una a la actina y la Tm <sup>(17, 21, 25, 26, 27)</sup>

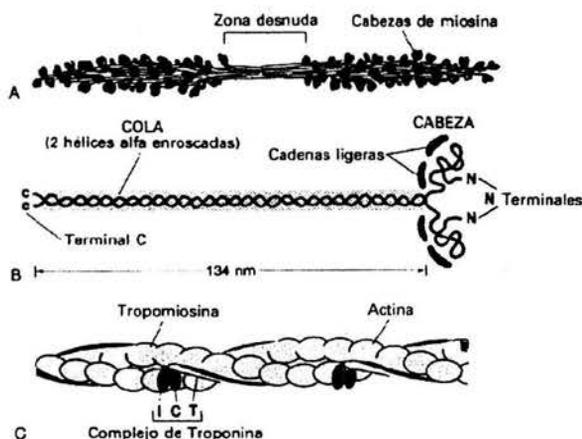


Figura 2.2.

A, filamento grueso de miosina de músculo esquelético; B, molécula de miosina formada por dos cadenas pesadas y cuatro ligeras; C, filamento muscular delgado que muestra la posición de la Tm y la Tn a lo largo del filamento de actina. (21)

Cuando faltan estas proteínas reguladoras de la contracción las proteínas contráctiles actina y miosina interactúan y se activan por completo; para ello, sólo se necesita la presencia de  $Mg^{2+}$  y ATP para iniciar la reacción que lleva a la contracción muscular. Sin embargo en presencia de troponina y Tm, se inhibe la formación de puentes cruzados entre miosina y actina. Cuando el calcio se une a la TnC, se inhibe la unión de la TnI con la actina, lo cual a su vez produce un cambio en la conformación de la Tm, de forma que ésta, en lugar de inhibir, favorece la formación de puentes cruzados; por ello, el  $Ca^{2+}$  puede considerarse como desinhibidor ya que inactiva a un inhibidor de la reacción entre actina y miosina. La inhibición de la interacción entre actina y miosina se debe a que el calcio, al unirse al complejo de la troponina, altera la configuración de la Tm, la cual a su vez modifica la disposición de los sitios activos a lo largo del filamento de actina (17).

Al producirse la despolarización celular, el  $[Ca^{2+}]$  intracelular aumenta de  $10^{-7}$  hasta cerca de  $10^{-5}$  M. El  $Ca^{2+}$  se liga a la troponina, y los bastones de actina se desplazan hacia el centro del sarcómero. Una vez efectuado este primer paso, una cabeza de la miosina unida a la

actina expulsa sus productos de hidrólisis del ATP, se une a otra molécula de ATP y se despegas del sitio de unión con la actina. Luego, la cabeza de miosina vuelve a tomar su orientación original y el ciclo se repite: la cabeza de miosina se une a un monómero diferente de actina en un sitio más distante en el filamento de actina. Por lo tanto, el proceso de acortamiento del músculo cardiaco consisten en un cambio relativo en la posición de los dos filamentos contráctiles; es decir, los filamentos de actina se deslizan sobre los de miosina por un proceso en el cual se produce fuerza en muchos puentes transversales. Si al músculo no se le permite acortarse, es decir, si se produce una contracción isométrica (en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ), la meromiosina pesada no sufre ningún cambio en su conformación, se conservan los puentes entre actina y miosina, y es el ADP en vez del ATP el que permanece unido a la miosina. La fuerza desarrollada es proporcional a la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a la TnC, la cual a su vez se relaciona con el  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular y con la longitud inicial de sarcómero. La liberación sucesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponina produce la relajación (Figura 2.3)

Existen unas proteínas más pequeñas llamadas cadenas ligeras que se localizan en las cabezas de miosina, éstas experimentan fosforilación produciendo cambios no bien precisados en la actividad enzimática de la miosina. Se ha dicho que la actividad de ATPasa de la actomiosina aumenta al incrementar el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en el interior de las fibras, que es un probable mecanismo por el cual la estimulación  $\beta$ -adrenérgica ejerce su efecto inotrópico positivo. Tal cambio es compatible con la respuesta mecánica del músculo cardiaco a las catecolaminas para producir un incremento en la velocidad de acortamiento ( $V_{\max}$ ) en condiciones sin carga.

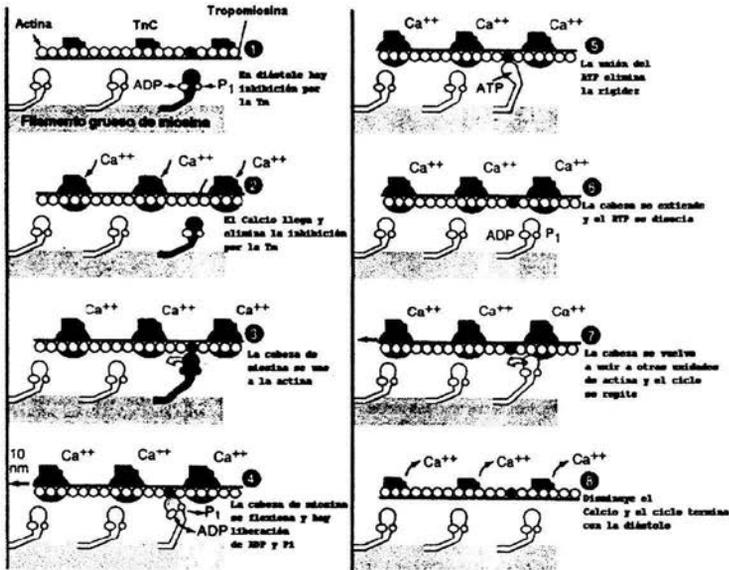


Figura 2.3 Episodios de la contractilidad del músculo cardíaco <sup>(21)</sup>. El ciclo de los puentes cruzados empieza con la relajación en diástole (etapa 1), cuando la tropomiosina (Tm) que es la línea negra horizontal continua, bloquea la unión de las cabezas de miosina con la actina. Al comienzo de la sístole (etapa 2), el  $Ca^{2+}$  se combina con la troponina C (cTnC) de forma que la Tm ya no bloquea a la actina y por tanto las cabezas de miosina se pueden unir y luego "flexionarse", con la liberación de ATP y fosfato inorgánico ( $P_i$ ) (etapa 3). Hay un estado de "rigidez" que aparece de manera transitoria (etapa 4). El ATP se mueve al mismo sitio de unión sobre la cabeza de miosina que dejó libre el  $ADP$ , a fin de liberar la cabeza de miosina (etapa 5). Después de que el ATP se disocia en  $ADP$  y  $P_i$  por efecto de la ATPasa de miosina, la cabeza se extiende (etapa 6) para volverse a unir a otras dos o cuatro unidades de actina más distalmente (etapa 7). Las etapas 1 a 7 se repiten hasta que la concentración de  $Ca^{2+}$  en la fibra cardíaca disminuye al comienzo de la diástole (etapa 8).

## 2.2 ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

### 2.2.1 PUENTES CRUZADOS EN REPOSO Y EN TRABAJO.

El hecho de haber aclarado la biología estructural de la interfase actina-miosina, ha contribuido para entender el estado de los puentes cruzados en el músculo en reposo y las bases moleculares para saber como trabajan los puentes cruzados en el músculo activo <sup>(28)</sup>.

Esta información es esencial para aclarar y entender cómo la reacción actina-miosina es activada y como la interacción "puente cruzado-filamento delgado" modula esta activación.

#### **2.2.1.1 Puentes cruzados en el reposo: puentes cruzados bloqueados y débilmente unidos en estado diastólico. (Figura 2.4)**

En estado de reposo los miofilamentos se pueden alargar libremente; el ciclo de un puente cruzado y la generación de fuerza se cierran. A concentraciones relativamente bajas de  $Ca^{2+}$ , se impone un estado relajado en la reacción actina-miosina por la presencia de Tn-Tm. Para saber como las proteínas del filamento delgado actúan para mantener un estado diastólico habría que contestar lo siguiente: ¿Está bloqueada la unión de un puente cruzado a la actina, o existe solo un estado de unión débil?, si es que hay bloqueo, ¿Involucra éste solo a la Tropomiosina o tal vez a la Tnl y/o a la TnT?

Desde un punto de vista meramente teórico, durante la diástole, la unión de los puentes cruzados con la actina se encuentra bloqueada debido a un impedimento estérico que involucra a la Tm. Sin embargo no queda claro si este modelo (bloqueo estérico), deba de ser considerado como un modelo útil desde el punto de vista didáctico del estado diastólico de los miofilamentos, que sea fácil de entender. El bloqueo estérico implica que no haya interacciones de puentes cruzados en el estado relajado, aunque existe considerable evidencia de que una porción substancial de los puentes cruzados se une débilmente al filamento delgado en el estado relajado <sup>(29)</sup>. La evidencia reciente indica que, 1) el ciclo de la ATPasa puede ocurrir sin la disociación de la unión de los puentes cruzados con la actina y 2) los puentes cruzados débilmente unidos no generadores de fuerza se unen con una cinética rápida de apagado y encendido.

### 2.2.1.2 Puentes cruzados en el trabajo: interacciones moleculares que generan trabajo de los miofilamentos.

Lo que entendemos de las bases físicas de la interacción actina-puente cruzado tuvo un gran avance gracias a reportes proporcionados por modelos basados en el ajuste de imágenes por micrografía crioelectrónica utilizando estructuras atómicas de la F-actina y de la Miosina S-1<sup>(30 y 31)</sup>. El mecanismo por el cual el músculo estriado desarrolla fuerza y se acorta, está basado en la idea de que las cabezas de miosina (puente cruzado o miosina S-1) sobresalen del filamento grueso y reaccionan con las actinas del filamento delgado en un ciclo de reacción que recibe energía del ATP<sup>(32)</sup>. La superficie de unión para las regiones NH<sub>2</sub>-terminal de la miosina abarca 2 actinas e incluye tanto a la región NH<sub>2</sub>-terminal como la COOH-terminal de la actina. Uno de los pasos en el ciclo, es aquel en el que un puente cruzado libre de nucleótido se une fuertemente a la actina de una manera rigurosa que involucra contactos extensos entre la miosina y el filamento delgado. Esta interfase esta formada de una combinación de interacciones complementarias, hidrofóbicas y iónicas así como de puentes de hidrógeno. La unión de un nucleótido inicia un cambio substancial en la interfase actina-miosina, lo que provoca la disociación y eventual generación del llamado "golpe de fuerza" impulsado por la hidrólisis del ATP.

Los contactos electrostáticos entre el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la cadena ligera de la miosina cargada positivamente, y los residuos del extremo COOH-terminal de la actina cargados negativamente, forman una región secundaria de contacto entre los puentes cruzados y el filamento delgado. Aunque el papel fisiológico de la unión entre la cadena ligera de miosina y la actina aún no es claro, existe evidencia importante de que la interacción puede modular de manera significativa la proporción de ciclos de los puentes cruzados así como el nivel de potenciación del filamento delgado. Ambas propiedades parecen ser elementos importantes para determinar la cinética de transición de los miofilamentos entre el estado sistólico y el diastólico.

## 2.2.2 ACTIVADOR TROPONINA-TROPOMIOSINA-CALCIO

Las fibras musculares que carecen de troponina y de Tm (o las mezclas de miosina y actina purificadas) cuentan con una actividad de la  $Mg^{2+}$ -ATPasa relativamente alta que es insensible a las concentraciones de  $Ca^{2+}$  (33). La adición de Tm, la cual se une a la actina de manera cooperativa, puede inhibir o elevar esa actividad (28), dependiendo de la relación actina:miosina. La adición de el complejo purificado de la troponina a estos sistemas, inhibe a la ATPasa cuando el  $Ca^{2+}$  se encuentra en concentraciones submicromolares y dispara su actividad a concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$ . Es importante notar que el mecanismo de control de la troponina, involucra la inhibición de una interacción que de otra manera sería favorable y fuerte entre la actina y la miosina, una característica común en los sistemas donde se necesita que la respuesta a un estímulo sea rápida, concertada, y altamente sensible.

## 2.2.3 INHIBICIÓN POR TROPONINA I

La TnI, es una proteína globular básica que contiene aproximadamente 180 aminoácidos (PM 20 000), y se une a la actina, a la Tm, a la TnT, y a la TnC. La TnI purificada, inhibe a la ATPasa de la actomiosina por si sola, independientemente del  $Ca^{2+}$ . Tanto la unión a la actina como su actividad inhibidora se ven potenciadas por la Tm (26).

### 2.2.3.1 Posición del péptido inhibidor

Por medio de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (ERMN) se logró determinar la estructura secundaria en solución de un péptido inhibidor de 12 residuos (Ip) unido a la TnC, la cual a su vez, se encontraba unida al  $Ca^{2+}$ . Se encontró que el péptido de unión (inhibidor) tiene dos regiones  $\alpha$ -hélicoidales (residuos 104-108 y 112-115) separadas por una curva que involucra dos prolina centrales (residuos 109 y 110). Estos péptidos inhibidores poseen aproximadamente la mitad de la actividad inhibidora de toda la TnI en bases molares (26).



Figura 2.4. Esquema que describe los modos de activación de los miofilamentos cardíacos delgados dados por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -TnC y por "puentes cruzados fuertes". La figura muestra como los filamentos delgados son activados por el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la TnC y por la unión del puente cruzado.<sup>(34)</sup>

### 2.2.3.2 Dominio de la TnC al que se une la región inhibidora de la TnI.

La región inhibidora de la TnI y los péptidos inhibidores, se han entrelazado con ambos dominios, el  $\text{NH}_2$ -terminal y el  $\text{COOH}$ -terminal, de la TnC. Sin embargo sorprende el hecho de que en la estructura cristalina de la TnC, la cual evitaría la unión, los dos dominios están separados por un  $\alpha$ -hélice central de 31 residuos. Esta aparente paradoja se podría resolver con la hipótesis de que, en solución, la hélice central de la TnC, se curva o en parte se desenrolla, permitiendo así la aproximación de los dos dominios. Esta idea originalmente se basó en la técnica de transferencia de energía de fluorescencia y otras más, realizando experimentos con TnC libre, pero aún permanece abierta la pregunta de si la TnC está extendida o es más compacta en el complejo de la Troponina. Experimentos más recientes sugieren una conformación más extendida para la TnC. Pero con todo esto, la distancia y

orientación relativa observadas en la estructura cristalina de los dos dominios de la TnC no parecen ser características importantes en el mecanismo regulador de esta subunidad <sup>(28)</sup>.

Las investigaciones realizadas llegaron a la conclusión, tomando en cuenta los hallazgos del entrelazamiento de los dominios, de que parece que la hélice central de la TnC puede construir por lo menos una parte del sitio de unión de la región inhibidora de la TnI <sup>(28)</sup>.

Aunque no se ha determinado directamente el péptido exacto de 12 residuos (Ip) de unión en la TnC, se sugiere que la superficie hidrofóbica del Ip podría estar haciendo contactos con la cavidad hidrofílica del dominio COOH-terminal de la TnC. En otros experimentos se entrelazó la Gly104 del péptido inhibidor con el residuo 156 de la TnC y se realizó un modelo del péptido inhibidor uniéndose a la cavidad hidrofílica del dominio COOH-terminal de la TnC. Aún así, este modelo, no apunta hacia posibles contactos del péptido inhibidor con el dominio NH<sub>2</sub>-terminal de la TnC. Además no queda claro de manera inmediata como la disociación del dominio inhibidor de la actina y su unión al dominio COOH-terminal de la TnC, presumiblemente dependiente de el intercambio Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> en los sitios III y IV (Figura 2.2), pudiera ocurrir lo suficientemente rápido para contar en la cinética de desarrollo de tensión inducida por Ca<sup>2+</sup> bajo condiciones fisiológicas.

### **2.2.3.3 Modelos moleculares de la región inhibidora que se une a la TnC**

**2.2.3.3.1 Modelo molecular de la región inhibidora de la TnI unida a la TnC.** Los estudios realizados de la interacción entre la cadena pesada y la cadena ligera reguladora de la miosina, sirven como base para la construcción del modelo molecular de la interacción entre la TnC y la región inhibidora de la TnI. Se ha observado que la secuencia de 14 residuos comenzando en la posición 98 en la región inhibidora de la TnI (KLFDLRGKFKRPPL) tiene cierto grado de homología con los motivos IQ (por consenso IQXXRGXXRXXΦ, donde X es cualquier aminoácido y Φ es un residuo hidrofóbico voluminoso) que son motivos que se encuentran en una variedad de sitios de unión entre las cadenas ligeras de miosina y la calmodulina (CaM).

Se empezó construyendo el modelo comparando las estructuras tridimensionales de los dominios NH<sub>2</sub>-terminal en el modelo (Ca<sup>2+</sup>)<sub>r</sub>-TnC y en la cadena ligera reguladora de la estructura cristalina del dominio regulador de la miosina del molusco. Esto reveló que las hélices A, B y C de las dos proteínas están virtualmente sobrepuestos, a pesar del hecho de que la hélice C es aproximadamente 4 aminoácidos más corta en la cadena reguladora. Los dominios COOH-terminal de ambas proteínas pueden también ser sobrepuestos. El ligando helicoidal que conecta los dos dominios globulares de la TnC es 3 aminoácidos más corto y no es helicoidal en la cadena ligera reguladora, haciendo el moldeado de esta parte aún más complicado. Los residuos 88 a 94 de esta región ligante fueron, por tanto, moldeados como un lazo extendido para poder llevar a ambos dominios globulares en sus mismas y respectivas orientaciones, como en la cadena ligera reguladora. Finalmente la región inhibidora de la TnI fue moldeada en la misma conformación de los residuos 805 a 836 de la cadena pesada de la miosina. Este alineamiento coloca a la prolina de la posición 109 de la TnI en la misma posición que la Trp824 en la curva de la cadena pesada de la miosina. Este modelo de la región inhibidora de la TnI fue deducido con el modelo de la TnC de una manera similar a la del complejo CLR-cadena pesada de miosina. En el modelo resultante del complejo TnC-región inhibidora de la TnI, la región inhibidora helicoidal de la TnI por el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la curva (residuos 90 a 107) encaja en la cavidad hidrofóbica del dominio COOH-terminal de la TnC y se extiende hasta cerca del extremo NH<sub>2</sub>-terminal al lado de la parcialmente desdoblada hélice central de la TnC. La curva de la región inhibidora y los residuos hasta su extremo COOH-terminal (residuos 108 a 121) hacen contactos exclusivamente con el dominio NH<sub>2</sub>-terminal de la TnC. Esta curva dirige la porción COOH-terminal de la  $\alpha$ -hélice de la región inhibidora de manera que encaja en la cavidad hidrofóbica del dominio NH<sub>2</sub>-terminal de la TnC sin requerir de una aproximación muy cercana de los dominios de la TnC. Aunque este modelo es congruente con los resultados del entrelazamiento de TnI-TnC y los estudios de unión de dominios antes discutidos, sería necesario tener en cuenta que es un modelo de naturaleza

conceptual y que aquí se presenta principalmente como una manera de ilustrar como la TnC y la región inhibidora de la TnI pueden interactuar de forma similar a aquella bien caracterizada en los complejos proteína "mano EF"- péptido <sup>(26 y 33)</sup>.

**2.2.3.3.2 Modelo del complejo de TnI-TnC.** Recientemente se propuso un modelo estructural del complejo TnI-TnC saturado de  $\text{Ca}^{2+}$  basado en las dimensiones y orientaciones relativas de las dos proteínas dentro del complejo, lo cual se dedujo en experimentos con rayos X y dispersión de neutrones. En este modelo, ambas proteínas adoptan estructuras altamente alargadas cuyos centros de masa casi coinciden y cuyos ejes largos están alineados en forma paralela (o antiparalela) en el complejo. La hélice central en la TnC está completamente extendida, y los dominios  $\text{NH}_2$ - y  $\text{COOH}$ - terminales orientados el uno con respecto al otro. La TnI está aún más extendida que la TnC, con dos dominios de similar estructura "toroidal", conectados por un hélice central de aproximadamente 7 nm. En este modelo la masa de la TnI está distribuida igualmente sobre las dos mitades de la TnC: los dominios  $\text{NH}_2$ - y  $\text{COOH}$ -terminales de la TnI coronan las superficies exteriores de los dos dominios de la TnC, de manera similar a un halo, mientras las hélices espirales centrales de la TnI a lo largo de toda la longitud de la estructura de la TnC, hacen contacto con la hélice central de la TnC y con las cavidades hidrofóbicas expuestas de ambos dominios de la TnC. Ya que estos residuos inhibidores descansan justo en el extremo  $\text{COOH}$ -terminal del residuo central de la TnI, una orientación antiparalela de las dos proteínas implicaría que la región inhibidora interactúa predominantemente con el dominio  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnC <sup>(33)</sup>.

## 2.2.4 UNIÓN DEL CALCIO A LA TnC

La TnC (PM 18 000) es la subunidad de la troponina que se une al  $\text{Ca}^{2+}$  y que es necesaria para que se de la interacción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con la actomiosina en los sistemas reconstituidos con proteínas musculares purificadas *in vitro*. Cuando la TnC es removida selectivamente de fibras musculares superficiales mediante el lavado con soluciones de EDTA, las fibras resultantes con menor concentración de TnC se muestran permanentemente relajadas a cualquier concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al agregar TnC exógena se recupera la contracción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (33).

### 2.2.4.1 Estructura cristalina de la TnC.

La estructura cristalina de la TnC revela una proteína en forma de mancuerna con dos dominios globulares conectados por una larga hélice central. Cada dominio está hecho de dos sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (mano -EF). Este motivo se ha denominado así por aparecer entre las hélices E y F de la Troponina C y consta de 2  $\alpha$ -hélices aproximadamente perpendiculares separadas por una espiral de 12 aminoácidos en la cual se encuentran los ligandos para unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Los 4 sitios de unión al calcio se numeran del I al IV de acuerdo al orden de la estructura primaria (Figura 2.5).

### 2.2.4.2 La contracción muscular se activa por la unión del $\text{Ca}^{2+}$ a sitios de baja afinidad.

Bajo condiciones fisiológicas la cinética de unión del calcio a sitios de alta afinidad en los dominios COOH-terminal se espera que esté limitada por el intercambio  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , el cual, es muy lento para contribuir en la cinética del desarrollo de la tensión inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y la relajación de las fibras musculares superficiales. Por otro lado la cinética de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los sitios de baja afinidad del dominio  $\text{NH}_2$ -terminal, es rápido, sugiriendo que la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a estos sitios (I y II) es el evento inicial para suprimir la inhibición de la interacción con la actomiosina.

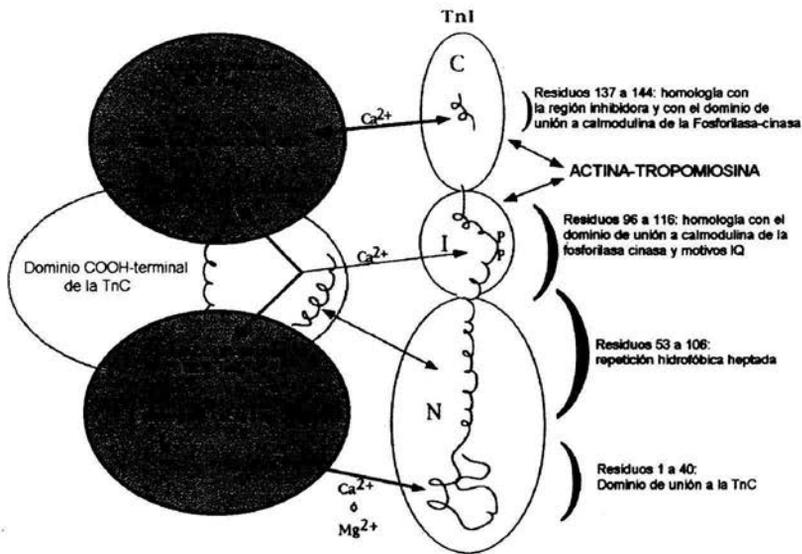


Figura 2.5. Organización del complejo de Tn. La TnI y la TnC interactúan entre sí de manera antiparalela con interacciones independientes de  $Ca^{2+}$  dadas entre los residuos 1-40 de la región NH<sub>2</sub>-terminal de la TnI y la región C-terminal de la TnC, y por interacciones dependientes de  $Ca^{2+}$  entre la región inhibidora y C-terminal de la TnI y el dominio N-terminal de la TnC, así como entre la región inhibidora de la TnI y el dominio C-terminal de la TnC. <sup>(33)</sup>

La TnC puede ser dividida en un dominio NH<sub>2</sub>-terminal que se une específicamente al  $Ca^{2+}$  y en un dominio COOH-terminal estructural que se une a  $Ca^{2+}$  o a  $Mg^{2+}$ .

En la estructura cristalina de la TnC, los dos sitios COOH-terminal de  $Ca^{2+}$  y de  $Mg^{2+}$  son ocupados por el  $Ca^{2+}$ , mientras que los dos sitios específicos para  $Ca^{2+}$  en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal se encuentran vacíos, lo que se aproxima más a la estructura del músculo relajado donde los dos sitios COOH-terminal se espera que sean ocupados por  $Mg^{2+}$ . En la estructura cristalina, el dominio COOH-terminal ocupado con  $Ca^{2+}$ , posee una cavidad hidrofóbica la cual se ha propuesto como el sitio de unión para las otras subunidades de la Troponina. No se sabe si esta cavidad también queda expuesta en presencia de  $Mg^{2+}$  por lo tanto no queda claro si este sitio es accesible bajo cualquier condición o únicamente en presencia del  $Ca^{2+}$ .

#### 2.2.4.3 Modelo de la transición inducida por $\text{Ca}^{2+}$ en el dominio $\text{NH}_2$ -terminal de la TnC.

Debido a la significativa homología en la estructura y en la secuencia entre los dos dominios de la TnC, se ha propuesto que en la unión con el  $\text{Ca}^{2+}$ , el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnC adopta una conformación similar a la observada en la estructura cristalina del dominio COOH-terminal cuando es ocupado por el  $\text{Ca}^{2+}$ . En este modelo una superficie hidrofóbica en el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal, la cual se oculta cuando los sitios I y II están desocupados, queda expuesta para soportar la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a estos sitios <sup>(33)</sup>.

#### 2.2.5 LA TnC ELIMINA LA INHIBICIÓN DADA POR TnI

La señal de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  con la TnC se transmite al filamento delgado por una serie de cambios en las interacciones de la TnC con las otras subunidades de troponina. Ya que la TnI se une tanto al complejo actina-Tm como a la TnC, los cambios inducidos por el  $\text{Ca}^{2+}$  en las afinidades relativas de la TnI por el complejo actina-Tm y por la TnC siempre han sido un tema central en el conocimiento de la regulación por la troponina <sup>(33)</sup>.

La TnI y la TnC se unen con una muy alta afinidad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y esta afinidad decae en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Debido a la alta afinidad observada entre la TnI y la TnC, tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la TnI y la TnC permanecen sin duda asociadas bajo las condiciones de relajación y de contracción encontradas en el músculo. Por lo tanto, la asociación/disociación del complejo TnI-TnC como un todo regulado por el  $\text{Ca}^{2+}$ , puede ser excluido como un posible mecanismo regulador cinéticamente competente. A esto le sigue el hecho de que las interacciones dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  están en el mecanismo regulador del corazón, mientras que las interacciones independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  están involucradas en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo.

### 2.2.5.1 Sitios de la TnC involucrados en las interacciones dependientes e independientes de $\text{Ca}^{2+}$ con la Tnl.

Los estudios de las interacciones entre los fragmentos de la TnC y la Tnl completa (Figura 2.5) sugieren que la TnC tiene por lo menos tres regiones que deben de interactuar con la Tnl: los sitios de unión a metales II y III interactúan con la Tnl de una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la presencia del sitio IV es necesaria para la interacción con la Tnl en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (33).

### 2.2.5.2 Las interacciones dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ se dan entre los dos dominios de la TnC y las regiones inhibidora y COOH-terminal de la Tnl.

Se ha observado que el fragmento proteolítico de la Tnl (residuos 96 a 116) que une a la actina y que inhibe a la ATPasa de la actomiosina también se une a la TnC. Por esto se sugiere que en el corazón, el mecanismo regulador, es un movimiento de la región inhibidora de la Tnl dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (35), que se propaga desde la actina hasta la TnC. La unión de los péptidos inhibidores correspondientes a los residuos 104 a 115 o 96 a 116 a toda la TnC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  varía desde  $0.63$  a  $5.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , mientras que aquellas uniones medidas en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  o ausencia de metales divalentes varían desde  $0.7$  hasta  $9.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Como se esperaba que esta región de la Tnl se uniera a la Actina-Tm en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , puede ser que solo la interacción en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  tenga relevancia fisiológica.

Los fragmentos 103 a 182 y 1 a 156 de la Tnl recombinante ( $\text{Tnl}_{103-182}$  y  $\text{Tnl}_{1-156}$ ) que contienen tanto a la región inhibidora (residuos 103 a 116) y los residuos en su extremo COOH-terminal (residuos 117 a 156), se unen al dominio  $\text{NH}_2$ -terminal recombinante de la TnC (N-TnC) mas fuertemente que a fragmentos que carecen de cualquiera de estas regiones. Por otro lado un fragmento  $\text{NH}_2$ -terminal de la Tnl ( $\text{Tnl}_{1-96}$ ) no se une a N-TnC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Mg}^{2+}$  a concentraciones micromolares de péptido. También se ha observado que la  $\text{Tnl}_{103-182}$  se une al dominio COOH-terminal recombinante de TnC (C-TnC) pero con una afinidad

relativamente mas débil. Los complejos anteriores que involucran la TnI<sub>103-182</sub> con TnC, N-TnC o con C-TnC solo se observan en presencia de Ca<sup>2+</sup> a concentraciones micromolares de proteína.

### **2.2.5.3 Las interacciones independientes de Ca<sup>2+</sup> ocurren entre el dominio COOH-terminal de la TnC y la región NH<sub>2</sub>-terminal de la TnI.**

Los fragmentos proteolíticos derivados de la región NH<sub>2</sub>-terminal de la TnI (residuos 1 a 21 y 1 a 47) se unen a la TnC. En estudios iniciales de la dependencia del Ca<sup>2+</sup> de esta interacción no se pudo concluir nada ya que algunos reportaban la dependencia del Ca<sup>2+</sup> mientras que en otros solo se observó la formación del complejo en ausencia del Ca<sup>2+</sup>. Recientemente se ha acumulado evidencia de que existe un componente independiente de Ca<sup>2+</sup> en la interacción, como resultado de estudios realizados con TnI recombinante. Los fragmentos de TnI que carecen de 102 residuos en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal han disminuido las interacciones independientes de Ca<sup>2+</sup> con la forma natural de TnC , mientras que las interacciones dependientes de Ca<sup>2+</sup> permanecen intactas.

Por otro lado también se demostró que la región NH<sub>2</sub>-terminal de la TnI se une al dominio COOH-terminal de la TnC observando que: 1) se forma un complejo entre TnI<sub>1-98</sub> y la TnC en presencia de Ca<sup>2+</sup> o de Mg<sup>2+</sup> , 2) estos complejos son debilitados por mutaciones que eliminan los sitios de unión a metales en las regiones III y IV de la TnC pero no por mutaciones que eliminan la unión específica de Ca<sup>2+</sup> a los sitios I y II y 3) El segmento 1-98 de la TnI se une al segmento C-TnC en presencia de Ca<sup>2+</sup> o de Mg<sup>2+</sup> , pero no se une al segmento N-TnC en las mismas condiciones.

### **2.2.5.4 Organización antiparalela de la interacción TnI-TnC.**

Las observaciones antes mencionadas sugieren que las regiones de la TnI implicadas en su unión con actina y su actividad inhibidora, también interactúan con el dominio regulador NH<sub>2</sub>-terminal de la TnC en una forma dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Por otro lado la región NH<sub>2</sub>-terminal

de la TnI interactúa con el dominio estructural COOH-terminal de la TnC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Mg}^{2+}$ . Por lo tanto, se ha propuesto, que el complejo TnI-TnC se encuentra en un arreglo antiparalelo como se explica en la sección 1.2.3.3.2 (figura 2.5). En ese modelo la interacción de los dominios reguladores de las dos proteínas requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que los dos dominios estructurales pueden interactuar en presencia ya sea de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Mg}^{2+}$ .

#### **2.2.5.5 Movimiento dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ de las regiones inhibidora y COOH-terminal de la TnI con respecto a la TnC y a la actina.**

Las consideraciones antes mencionadas parecen indicar que las regiones inhibidora y COOH-terminal de la TnI están involucradas tanto en el efecto inhibitorio de la TnI sobre la ATPasa de la actomiosina como en su interacción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con el dominio  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnC <sup>(35)</sup>. Esta actividad de unión dual, ha sido interpretada históricamente, sugiriendo que una porción de la TnI genera el interruptor real que se mueve entre la actina y la TnC en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulando, por lo tanto, alguna característica conformacional del filamento delgado. Se ha demostrado experimentalmente que en la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la TnC, la Cys 133 en la región COOH-terminal de la TnI de conejo, se aleja 1.5 nm de la Cys 374 de la actina y se acerca 0.7 nm a la Cys98 de la TnC. En la figura 2.6 se muestra como este movimiento, en el contexto de la naturaleza antiparalela del complejo TnI-TnC, puede ser incorporado en un modelo de la transición inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  en el filamento delgado. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 2.6 B), los sitios específicos para  $\text{Ca}^{2+}$  en la porción  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnC, se encuentran vacíos, mientras que los sitios para  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  en la porción COOH-terminal están ocupados por  $\text{Mg}^{2+}$ . En este estado las regiones inhibidora y COOH-terminal de la TnI están unidas a la actina-Tm, manteniendo al filamento delgado en una conformación en la cual la interacción con la actomiosina es débil, mientras que la región  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnI (residuos 1-40) está unida al dominio COOH-terminal de la TnC. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  al dominio  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnC deja expuesta una cavidad hidrofóbica, la cual incrementa la afinidad

del dominio por las regiones inhibidora y COOH-terminal de la TnI, causando el alejamiento de estas regiones de sus sitios de unión en la actina-Tm (figura 2.6 C). Esto, entonces, permite un cambio estructural en el filamento delgado que activa a la ATPasa de la actomiosina.

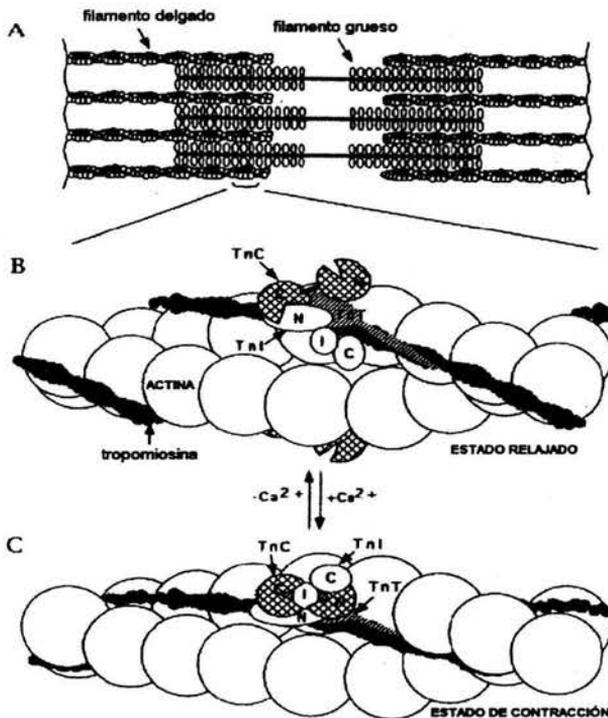


Figura 2.6. A) Organización del sarcómero que muestra la interdigitación de los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de Actina. B) Modelo de la interacción Tn-Tm-Actina en ausencia de  $Ca^{2+}$ , donde los sitios para  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  en el dominio C-terminal de la TnC están ocupados con  $Mg^{2+}$ , mientras que los sitios específicos para  $Ca^{2+}$  en el dominio N-terminal están vacíos. C) La unión del  $Ca^{2+}$  al sitio específico para  $Ca^{2+}$  en el dominio N-terminal de la TnC aumenta la afinidad del dominio para el sitio inhibidor y el sitio C-terminal de la TnI lo que trae como resultado su liberación de la actina y de la Tm. <sup>(33)</sup>

### 2.2.6 PAPEL DE LA TnT Y DE LA TROPOMIOSINA

La organización del filamento delgado (Figura 2.1) tiene implicaciones importantes en el mecanismo de control, ya que la unión del  $Ca^{2+}$  a un complejo de troponina, presumiblemente controla la estructura de siete monómeros de actina vía la Tropomiosina. Los complejos vecinos de troponina no tienen contacto entre sí, ni tienen contacto con más de la mitad de los siete monómeros de actina dentro de cada unidad reguladora. Aún así, la unión de  $Ca^{2+}$  a los filamentos delgados es cooperativa y la troponina posiblemente inhibe las interacciones de los

siete monómeros de actina con la miosina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido a que la Tm forma un filamento continuo a lo largo de cada hebra de la doble hélice de actina, estas observaciones sugieren que la información puede ser propagada a lo largo (y/o a través) del filamento delgado entre unidades reguladoras vía Tm y/o actina.

#### **2.2.6.1 La TnT liga al complejo de la Troponina con la Tm.**

La TnT es una proteína estructuralmente asimétrica. Su dominio COOH-terminal globular (TnT-2, dominios 159 a 259) media su interacción con la TnI y con la TnC, así como la unión cercana al residuo Cys190 de la Tm. El dominio  $\text{NH}_2$ -terminal de la TnT (TnT-1, residuos 1 a 158) descansa extendido a lo largo del tercio COOH-terminal de la espiral enroscada de Tm desde el residuo Cys190 del extremo COOH-terminal de la Tm donde se traslapa con el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal de la molécula de Tm adyacente (Figura 2.1). Las interacciones inmediatas de la TnT con la Tm, han sugerido que esta debe de estar involucrada en la cooperatividad de la unión de la Tm a la actina y/o en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al filamento delgado.

#### **2.2.6.2 Papel de la TnT en el mecanismo regulador.**

El control de la actividad de la ATPasa de actomiosina-Tm dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  por el complejo binario TnI-TnC solo ha sido observado a relaciones TnI:actina significativamente mayores a los valores fisiológicos de 1:7, aunque la cantidad real de TnI que se une por cada siete monómeros de actina, nunca ha sido cuantificada paralelamente bajo las mismas condiciones. Se ha encontrado que en ausencia de TnT, la TnC puede remover a la TnI de su sitio de unión con el complejo actina-Tm independientemente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando la relación TnI:actina es aproximadamente 1:7. La TnT fue necesaria para mantener al complejo de troponina unido al complejo actina:Tm bajo esas condiciones. Además la máxima actividad de la ATPasa observada en una mezcla de actomiosina-Tm-TnI-TnC +  $\text{Ca}^{2+}$  es aproximadamente igual a aquella observada en una mezcla actomiosina-Tm, mientras que la

adición de TnT, incrementa la inhibición en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y activa a la ATPasa de la actomiosina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a niveles por arriba de los vistos con actomiosina:Tm solas. Aún así la TnT debe estar haciendo mas que solo incrementar la afinidad de la troponina por el filamento delgado ya que parece estar involucrada en 1) propagación del efecto inhibitor en los siete monómeros de actina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  vía Tm , 2) eliminación del efecto inhibitor de los siete monómeros de actina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , y 3) activar a la ATPasa de la actomiosina a niveles por arriba de aquellos de la actomiosina-Tm. Estas observaciones sugieren que el mecanismo de inhibición de la TnI o regulación por el complejo binario TnI-TnC, deben de ser diferentes de aquel efectuado por el complejo ternario de troponina, el cual es fisiológicamente mas relevante <sup>(26)</sup> .

#### **2.2.6.3 Transmisión de la señal de unión al $\text{Ca}^{2+}$ de la TnC a la TnI.**

Los eventos críticos iniciales que disparan el movimiento y los cambios de estado de la Tm y la actina, son la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la TnC y la transmisión de esta señal a la TnI <sup>(36)</sup> . Hay evidencia estructural comparativa que nos da información nueva de características únicas del proceso molecular y atómico por el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la cTnC iniciando una cascada de eventos de señalización. En el caso de la Troponina C de músculo rápido (TnCmr), la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los dos motivos hélice-vuelta-hélice, trae como resultado el movimiento de las hélices de tal manera que queda expuesta una región hidrofóbica extensa de aminoácidos en una configuración "abierta". Por otro lado en la cTnC los eventos parecen ser diferentes e indican que la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  en la Tn cardiaca puede involucrar una dependencia mas fuerte de las interacciones carga-carga que en la Tn de músculo rápido. Con la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a este sitio, la región  $\text{NH}_2$ -terminal permanece substancialmente cerrada y la región hidrofóbica expuesta es mucho más pequeña que en el caso de la TnCmr. Esto puede deberse al número de metales unidos en la región  $\text{NH}_2$ -terminal de la cTnC y la TnCmr.

Existe una extensión en la región NH<sub>2</sub>-terminal (residuos 1 a 32) que consta de un alargamiento único de aminoácidos en la TnI. Los residuos Ser23 y Ser24 son los sitios de fosforilación para la Proteína cinasa A (PKA) <sup>(37)</sup>. Cuando estos sitios están fosforilados, la afinidad de la TnI por la TnC disminuye, así como la afinidad del Ca<sup>2+</sup> por la TnC y la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> del filamento delgado <sup>(38)</sup>. Ambos residuos deben de estar fosforilados para que se exprese la disminución de la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> <sup>(39)</sup>.

Una región NH<sub>2</sub>-terminal cercana de la TnI (residuos 33 a 80) es altamente conservada y se une a la TnC. Como se ha discutido antes, esta región cercana también parece contener sitios de interacción con la cTnT. La unión de la cTnI al extremo COOH-terminal de la cTnC se demostró utilizando un marcaje selectivo con [C<sup>13</sup>]Metionina en combinación con la técnica de espectroscopia de RMN. Se observó que el arreglo molecular de la TnI y de la TnC es antiparalelo (figuras 2.1 y 2.2). La interacción entre la región NH<sub>2</sub>-terminal de la TnI con la TnC se ve muy debilitada si el metal no está unido al extremo COOH-terminal de la TnC. Así, un papel importante de la unión del metal a estos sitios lentamente intercambiados, es anclar la región NH<sub>2</sub>-terminal de la cTnI a la TnC durante la sístole y la diástole. En estudios más recientes se determinó que la cTnI que carece de los primeros 53 aminoácidos es incapaz de unirse a la cTnC y de reestablecer la sensibilidad por el Ca<sup>2+</sup> en preparaciones reconstituidas. Por esto el dominio de unión NH<sub>2</sub>-terminal de la cTnI de unión a TnC parece estar localizado entre los residuos 33 a 53. Las serinas en posición 43 y 45 en esta zona, tienen un significado funcional como sustratos para la Proteína cinasa C (PKC). La fosforilación de estos sitios da como resultado una marcada disminución del nivel máximo de la ATPasa en las preparaciones de miofilamentos delgados reconstituidos con miosina S-1, sin cambios en la sensibilidad por el Ca<sup>2+</sup>. La fosforilación de estos sitios también provoca disminución en la afinidad de la miosina S-1 por el filamento delgado. Un tercer sitio de fosforilación, por la PKC se localiza en el residuo Thr144, un residuo cardio-específico localizado en el péptido inhibidor de la TnI. Este péptido inhibidor va río abajo desde la región de unión cTnC-cTnT en la cTnI y contiene

predominantemente aminoácidos con carga positiva. El péptido retiene mucha de la actividad inhibitoria de la longitud total de la cTnI, y esto sugiere fuertemente que esta región de la cTnI interactúa con la actina en un sitio que ni interfiere con la unión de los puentes cruzados ni inhibe alostéricamente la reacción actina-miosina. Aún no es claro si la fosforilación dependiente de PKC del residuo Thr144 del péptido inhibidor tiene significado funcional.

Aunque el péptido inhibidor tiene una clara importancia en la cascada de señalización, en análisis con mutantes se ha identificado a la región COOH-terminal (TnI<sub>152-199</sub>) esencial para la activación. Un truncamiento progresivo de la cTnI demostró que las regiones cTnI<sub>1-188</sub> y cTnI<sub>1-151</sub> son capaces de inhibir la actividad de la ATPasa de miofibrillas reconstituidas, hasta aproximadamente un pCa del 75% y 50% respectivamente de la actividad de en la forma intacta. Además el complejo cTnI<sub>1-188</sub>-TnC solo restaura parcialmente la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> mientras que el complejo TnI<sub>1-151</sub>-TnC es incapaz de restaurar dicha sensibilidad. Estas mutantes retienen la actividad de unión a la actina y a la TnC.

Algunos análisis estructurales, se han dirigido al entendimiento de los cambios que ocurren cuando la TnC reacciona con la TnI. Otros estudios muestran que la TnC aislada mostró una conformación relativamente compacta mas bien como resultado de la flexibilidad de la hélice central. Aún así, la TnC adopta una conformación extendida cuando se une a la TnI. Más estudios indican que la TnI también se ve más extendida en el complejo TnI-TnC. También se ha concluido que la TnCmr saturada con Ca<sup>2+</sup>, formando un complejo con la TnImr, tiene una conformación extendida <sup>(40)</sup>.

#### **2.2.6.4 Señalización entre TnI-TnC, TnC-TnT y TnT-Tm.**

Aparentemente la TnT, como el componente más grande y fuerte del complejo de la troponina, tiene el potencial para llevar a cabo las interacciones mas extensas y versátiles con proteínas adyacentes en el filamento delgado. Múltiples isoformas de la TnT, las cuales son generadas por un empalme alternativo y contienen regiones NH<sub>2</sub>-terminal variables, también

elevan la versatilidad de sus acciones. Hasta ahora no hay estudios detallados de las interacciones de la TnT con otras proteínas del filamento delgado. Aunque hay extensas regiones de homología entre varias formas de la TnTmr y la TnT cardiaca, hay regiones importantes de diversidad estructural, especialmente en la extensión NH<sub>2</sub>-terminal, la cual está altamente cargada y esencialmente ausente en la TnTmr. Basado en muchos estudios con TnTmr, aparentemente las mitades NH<sub>2</sub>- y COOH-terminal de la TnT, se unen al complejo actina-Tm con alta afinidad. La mitad NH<sub>2</sub>-terminal de la TnT parece anclar al complejo de la Troponina cardiaca a la Tm independientemente de la concertación de Ca<sup>2+</sup> que rodea a los miofilamentos, mientras que la mitad COOH-terminal, forma un complejo con la TnC, la TnI y la Tm. El extremo COOH-terminal de la TnTmr (residuos 159 a 259, TnT2) se une a la región que contiene el residuo Cys190 en la Tm, y esta interacción se debilita cuando el Ca<sup>2+</sup> se une a la TnCmr. Existen estudio sobre el papel de la TnTmr en la regulación de la activación de los miofilamentos y se ha mostrado que la TnT1 (residuos 1 a 159) no afecta la proporción de unión de S-1 a la actina en preparaciones reconstituidas con miosina S-1 y filamentos delgados regulados. Pero aún así, la TnT1 es capaz de influenciar el tamaño de la unidad cooperativa de 6 a 9 actinas hasta 12 actinas. Esto generalmente corresponde a los datos de que la TnT1 se une a la región de superposición entre moléculas contiguas de Tm. Por otro lado, mientras que la TnT2 no tiene efecto en la cooperatividad si tiene impacto en la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> a la proporción de unión con S-1 del complejo actina-Tm<sup>(23 y 30)</sup>. Es interesante que en ausencia del Ca<sup>2+</sup>, tanto la TnT2 como la TnTmr inhiben la unión inicial de S-1 a un área similar. Un retraso en la proporción de unión, proporciona evidencia de un estado de bloqueo de los puentes cruzados.

Los sitios de fosforilación dependientes de PKC en la cTnT también están localizados en la mitad COOH-terminal de la molécula. Los residuos Thr199 y Thr280 (en la secuencia de bovinos) son sitios funcionalmente significativos en la fosforilación dependiente de PKC. Es esta región de la TnT la que interactúa con la TnI y con la TnC y con la Tm, y es crucial en la

transmisión de la señal de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  para activar y posiblemente potenciar al filamento delgado. Cuando estos sitios son fosforilados, hay una disminución en el nivel máximo de ATPasa en las preparaciones de los filamentos delgados reconstituidos que activan a la miosina S-1 sin un cambio significativo en la relación pCa-actividad de la ATPasa. No hay estudios detallados que determinen la significancia relativa de la fosforilación de varios sitios PKC en la TnT en estos efectos inhibidores. Las regiones de interacción entre la TnI y la TnT aún son desconocidas. En el caso de la TnTmr, se ha propuesto que los residuos 57 a 107, los cuales contienen una hepta-repetición, pueden interactuar con un segmento similar en la TnTmr, formando una hélice enrollada. Estudios de reactividad química apoyan esta hipótesis demostrando que los residuos de Cys y Lys en la región TnImr<sub>40-98</sub> se ven afectados por la unión a la TnTmr. Pero en estudios con una mutante truncada de TnImr que perdió sus primeros 57 aminoácidos (TnId57) se han identificado sitios en la región NH<sub>2</sub>-terminal de la TnImr que reaccionan con el extremo COOH-terminal de la TnTmr. La región TnId57 retiene la unión con la TnCmr pero no se une a la TnTmr. Cuando esta mutante se reconstituye en miofilamentos que contienen a todos los componentes de los filamentos delgados excepto a la TnTmr, se conservó la sensibilidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , aparentemente por la interacción TnC-TnI, pero el nivel máximo de ATPasa fue menor a aquel en las miofibrillas intactas. Aún así, cuando los miofilamentos fueron completamente reconstituidos por la adición de TnTmr, el nivel de ATPasa fue restituido a aquel encontrado en las preparaciones con miofibrillas intactas, a pesar de que las interacciones entre TnImr y la TnTmr fueron alteradas. Con base en estas observaciones se propone que la TnCmr tiene un papel dual en la regulación de la actividad de los miofilamentos: 1) liberación de los miofilamentos de la inhibición por la TnI y 2) potenciar la actividad de los miofilamentos mediante la interacción TnC-TnT. Se han usado mutantes truncadas para identificar a las regiones de interacción entre la cTnI y la cTnT. La cTnI carente de los primeros 32 residuos es capaz de reaccionar normalmente con sus moléculas vecinas en el filamento delgado, y puede reestablecer totalmente la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se le agrega cTnC a

una preparación de miofilamentos que carecen del complejo cTnI-cTnC intacto. Así la única extensión NH<sub>2</sub>-terminal de la TnI (por lo menos en su estado no fosforilado) no parece interactuar con la cTnT. También se demuestra que la región cTnI<sub>53-211</sub> es capaz de unirse a cTnT pero no puede restaurar la sensibilidad por el Ca<sup>2+</sup> cuando se reconstituyen los miofilamentos. Sin embargo, la eliminación de un segmento de 26 aminoácidos más, resulta en una forma de cTnI<sub>80-211</sub> que ya no puede unirse a la cTnT pero que puede parcialmente restaurar la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup>. Esto indica que una zona en la región NH<sub>2</sub>-terminal cercana de la cTnI puede repeler su interacción con la cTnT y por lo tanto puede influir en la regulación de los miofilamentos de forma diferente a la interacción TnTmr-TnImr.

#### **2.2.6.5 Resumen de eventos moleculares que disparan la transición Diástole/Sístole.**

Una hipótesis es que durante la diástole hay un bloqueo físico de una cantidad substancial de puentes cruzados para reaccionar con el filamento delgado mientras el resto se encuentran en un estado de unión débil. Las interacciones generadoras de fuerza entre los puentes cruzados y el filamento delgado están inhibidas por la posición de la Tm y posiblemente de la cTnI y de la cTnC y por una disminución de la reactividad de los dominios de la actina y de la Tm inducida por la troponina. En la diástole, la cTnT se une por su extremo COOH-terminal a la región central de la Tm y también lo hace por su extremo NH<sub>2</sub>-terminal, para traslapar moléculas de Tm. La cTnI se une fuertemente por su extremo NH<sub>2</sub>-terminal al extremo COOH-terminal de la cTnT y al extremo COOH-terminal de la cTnC. La TnI también interactúa con las regiones NH<sub>2</sub>-terminal y posiblemente COOH-terminal de la actina para inhibir la interacción actina-miosina a través del péptido inhibidor de la cTnI y los sitios río debajo de cTnI<sub>152-199</sub>. En la sístole, la unión del Ca<sup>2+</sup> al sitio regulador de la cTnC induce un estado de alta afinidad entre los sitios COOH-terminal de la TnI y NH<sub>2</sub>-terminal de la TnC que extiende a ambas proteínas. Asociada a la interacción entre la TnI<sub>152-199</sub> y la cTnC, la cTnI se mueve a una nueva posición en el filamento delgado, y ahí se libera el péptido inhibidor de la cTnI de su interacción con la

actina. La interacción entre la región COOH-terminal de la cTnT y la Tm se debilita, la Tm se mueve en el filamento delgado así como lo hacen los subdominios de la actina. Los movimientos y cambios de estado de las proteínas del filamento delgado liberan del estado de bloqueo y promueven el nivel de transición de los puentes cruzados unidos débilmente hacia un estado generador de fuerza. De esta manera los miofilamentos están activados <sup>(40)</sup>.

### 2.2.7 INTERACCIONES MOLECULARES QUE MANTIENEN Y POTENCIAN LA ACTIVACIÓN DE LOS MIOFILAMENTOS.

Universalmente se está de acuerdo con que el cambio de estado de los puentes cruzados que ocurre con la transición sístole/diástole, es disparado por la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cTnC, aunque lo que pasa después para mantener y modular la activación del miofilamento aún no es claro. Las principales preguntas son las siguientes: ¿es el  $\text{Ca}^{2+}$  solo capaz de activar totalmente a los miofilamentos, o la activación total involucra un estado potencial que requiere de efectos de retroalimentación de los puentes cruzados fuertemente unidos?, ¿Cuáles son los papeles de los efectos cooperativos de largo y corto alcance sobre la activación? y, ¿cuantas actinas hay bajo el control de una troponina?

Algunos modelos predominantes sobre el proceso de la activación incluyen (1) el clásico modelo de 2 estados en el cual la activación del  $\text{Ca}^{2+}$  remueve un bloqueo estérico y en el cual los puentes cruzados reaccionan con la actina de una forma "todo o nada", (2) un modelo alternativo de 2 estados en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  regula un paso cinético en el recambio de los puentes cruzados resultando en un mecanismo de activación gradual y (3) un modelo de 3 estados en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  interactúa, directamente, para determinar cuantos puentes cruzados existen en un grupo de puentes en estado bloqueado (apagado), e indirectamente, como un cofactor para determinar la capacidad de los puentes cruzados débilmente unidos (estado apagado) para inducir un estado encendido del complejo actina-Tm que lleva a formar puentes cruzados fuertes. Estos modelos han contribuido de manera importante para la percepción y

entendimiento del proceso de activación, pero se quedan cortos para considerarlos en observaciones importantes encontradas en la literatura, especialmente las interacciones cooperativas dentro y entre unidades funcionales.

Sin embargo, existen modelos de 3-estados alternativos y modelos multiestado que incorporan las interacciones cooperativas entre los puentes cruzados unidos que se encuentran en forma y la Troponina, e interacciones cooperativas entre los puentes cruzados y el complejo Tn-Tm a lo largo del filamento delgado, y que son capaces de adaptar ambos efectos, el estérico y el cinético de la activación. Estos modelos derivan en parte de un trabajo en el cual se reportó que la rigidez de la unión del puente cruzado al filamento delgado induce un estado potenciado de la actina dependiente de la Tm que se mide por el nivel de ATPasa. Ahora se acepta de manera general que la unión fuerte de los puentes cruzados incrementan la afinidad de la TnC por el  $Ca^{2+}$ , la afinidad del filamento delgado por la miosina, y la cinética de transición de los puentes cruzados débiles al estado en que se genera fuerza. Los puentes cruzados unidos fuertemente, parecen inducir un nuevo estado (potenciado) del complejo actina-Tm por la alteración de la actina, la inducción de movimientos en la Tm que va mas allá de la producida por el  $Ca^{2+}$  solo, y la distorsión de la afinidad de unión de la Tn al filamento delgado. Estas acciones de los puentes cruzados unidos fuertemente propagan la activación en el filamento delgado hacia unidades vecinas cercanas, lo más probable es que ocurra a través de interacciones entre actinas contiguas y Tm a lo largo del filamento delgado. Un modelo reciente también sugirió que la cinética de recambio del puente cruzado, podía ser afectada por variaciones en la solidez de las interacciones por retroalimentación entre los puentes cruzados transportadores de fuerza y la activación. Estos nuevos modelos sugieren que los miofilamentos pueden ser significativamente activados únicamente por el  $Ca^{2+}$ , lo cual concuerda con los grandes cambios estructurales del filamento delgado inducidos por el  $Ca^{2+}$ , pero también indican que la activación completa requiere de la reacción de los puentes cruzados fuertemente unidos. Los miofilamentos en reposo pueden estar compuestos de puentes cruzados

bloqueados (apagados) o débilmente unidos (cerrados). Más aún, estas hipótesis también consideran que la activación de la generación de fuerza puede ser determinada por el nivel de transición de los puentes cruzados desde un estado apagado a un estado bloqueado, hasta un estado abierto, y que estos niveles cambian con la activación. Una cuestión relacionada, es cuantas actinas están bajo el control de una troponina. Por consenso se determinó que pueden ser por lo menos de 12 a 14 actinas, que es por lo menos el doble del número esperado de la relación estequiométrica de 1 Tn a 7 actinas <sup>(40)</sup> .

En resumen se piensa que durante un estado fisiológico basal después de la liberación de  $Ca^{2+}$  hacia el espacio del miofilamento, únicamente una fracción de los sitios para  $Ca^{2+}$  en la Tn, están ocupados. Estos complejos  $Ca^{2+}$ -Tn activan una fracción de unidades funcionales en el filamento delgado. Esta fracción puede ser ligeramente pequeña ya que 1 complejo  $Ca^{2+}$ - Tn puede convertirse hasta en 14 actinas. Es por esto que el complejo libera a los puentes cruzados bloqueados y débilmente unidos de su estado inhibido. En consecuencia, la unión del puente cruzado hace mas potente la activación del filamento delgado, más aún de lo que lo hace el  $Ca^{2+}$  solo. Este mecanismo también tiene una ventaja termodinámica al amplificar la señal de  $Ca^{2+}$  al miofilamento. En comparación con el mecanismo por el cual la activación depende de la unión de  $Ca^{2+}$  al miofilamento de una manera lineal, este mecanismo reduce el costo energético del transporte de  $Ca^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico <sup>(40)</sup> .

#### **2.2.8 EL COMPLEJO Tn-Tm ADAPTA LA ACTIVIDAD DEL MIOFILAMENTO A LAS DEMANDAS HEMODINÁMICAS.**

Una hipótesis es que la activación y potenciación de la actividad de los miofilamentos , están acopladas para satisfacer las demandas hemodinámicas y la frecuencia de latido. Las preguntas centrales para probar esta hipótesis son las siguientes: ¿Es importante modular la activación y la potenciación de la actividad del miofilamento para determinar la dinámica de contracción y relajación del corazón?, si es así, ¿Cuáles son los mecanismos celulares y

moleculares que permiten que los miofilamentos detecten los cambios en el retorno venoso, en la presión arterial y en el ritmo cardíaco?, ¿Cómo afectan esos mecanismos la dinámica de la contracción y relajación del corazón?

Existe evidencia substancial de que las propiedades cinéticas de los miofilamentos afectan la dinámica de la contracción y relajación cardíacas. Podrían estar involucrados 2 pasos principales, 1) la velocidad en que se lleva a cabo el ciclo de los puentes cruzados, y 2) la cinética de activación y potenciación de la actividad del filamento delgado, incluyendo las velocidades de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  y su liberación de la Tn. Los cambios en las poblaciones de las isoformas de la miosina ventricular lenta y rápida son bien conocidos y generalmente se aceptan como elementos determinantes en las velocidades de contracción y relajación del corazón. Aún así, también hay evidencia de que la cinética de los procesos del filamento delgado es capaz de afectar la dinámica de contracción y relajación. Se tienen resultados experimentales que generan evidencia indirecta de que la cinética de contracción y relajación podría estar afectada por cambios en la cinética de activación y desactivación de los miofilamentos, además de los cambios en la cinética de los puentes cruzados. Resulta interesante el hecho de que también existe evidencia de que los cambios en la cinética de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la TnC, puede influir en la velocidad en la que se desarrolla la energía en los puentes cruzados. Se ha reportado que el aumento en la afinidad del  $\text{Ca}^{2+}$  para unirse a la TnC inducida por calmidazolium, el cual actúa específicamente sobre la TnC, también resultó en un aumento en la cinética de unión del puente cruzado. Los mecanismos predominantes por los cuales los pasos en los procesos de activación y potenciación de los miofilamentos cardíacos pudieran estar acoplados para satisfacer un estado hemodinámico y la frecuencia de latido, incluyen: 1) un acoplamiento dado por el estado neurohumoral, como se señala a través de las rutas de la proteína-cinasa/fosfatasa y la fosforilación de las proteínas, y 2) un acoplamiento dado por el esfuerzo mecánico predominante, como se señala por la carga y la longitud <sup>(40)</sup>.

### 2.2.8.1 La fosforilación de las proteínas modula la activación de los miofilamentos.

Un mecanismo por el cual los miofilamentos participan en los procesos de señalización que ocurren con los cambios hemodinámicos, es la fosforilación de las proteínas. Las proteínas de los miofilamentos son sustratos para la PKA, PKC, proteína-cinasa dependiente de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, y cinasas similares a la caseína-cinasa. Con estudios *in vitro*, se han identificado muchos de los cambios funcionales asociados a la fosforilación de estas proteínas del miofilamento <sup>(37)</sup>, aunque el impacto exacto de estas alteraciones funcionales en el estado inotrópico y en la dinámica de contracción y relajación, permanece pobremente entendido. El problema principal al cual va dirigida esta cuestión, es que la manipulación del nivel de fosforilación del miofilamento, involucra cambios en la fosforilación de otras proteínas con funcionalidad significativa. Más aún, la fosforilación en múltiples sitios de una proteína particular también complica los estudios de los mecanismos.

Una de las rutas para señalización potencialmente significativa, es la fosforilación de los miofilamentos por la PKA <sup>(37)</sup>. Esta proteína fosforila a la cTnI y a la cTnC, que son las únicas proteínas del miofilamento que son fosforiladas por la PKA *in vitro* y por un estímulo  $\beta$ -adrenérgico del corazón *in situ*. La propuesta de que las fosforilaciones de la cTnI, se pueden relacionar con el efecto relajante de las catecolaminas, proviene de datos que demuestran que las fosforilaciones de la cTnI dependientes de PKA, reducen la sensibilidad del miofilamento al  $\text{Ca}^{2+}$  y aumentan la velocidad de disociación para el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  con la cTnC. Al intercambiar cTnI intacta por la cTnI mutante que carece del sitio de fosforilación para la PKA, se demostró que la fosforilación de la cTnI por la PKA es necesaria y suficiente para inducir la disminución de la sensibilidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad del miofilamento.

Existe también evidencia controversial sobre si la fosforilación dependiente de PKA en el miofilamento, afecta el ciclo de un puente cruzado. Hay quienes reportan que hay un aumento en el ciclo de los puentes cruzados, y hay quienes no encuentran ningún efecto <sup>(40)</sup>.

### 2.2.8.2 La activación de los miofilamentos depende de la longitud del sarcómero y de la carga sanguínea.

El control por retroalimentación de la activación del miofilamento dada por las conexiones de los puentes cruzados, provee de un mecanismo por el cual la función cardíaca debe de estar adecuada para satisfacer las condiciones hemodinámicas que determinan la precarga y la post-carga. Las variaciones en el número de puentes cruzados que reaccionan con el filamento delgado se dan en función de la longitud del sarcómero (el traslape de los filamentos y el espacio entre los mismos) y como una función de la velocidad de acortamiento. La activación del miofilamento dependiente de la longitud es determinante importante de la relación longitud-tensión y es actualmente la teoría que domina las bases celulares de la ley de Starling. En experimentos con preparaciones intactas y con células cardíacas extraídas con detergentes, se ha demostrado que a longitudes del sarcómero relativamente cortas, la relación pCa-fuerza, se inclina hacia la derecha de la relación obtenida cuando la longitud del sarcómero es más larga. En el caso de la activación dependiente de la longitud esta es una propiedad general del músculo estriado, pero predomina especialmente en las células cardíacas que operan por debajo de su activación máxima. La consecuencia es que la fuerza disminuye más rápidamente de como disminuiría por el cambio en el traslape de los filamentos, como también disminuye la longitud del sarcómero desde un valor óptimo de  $\approx 2.2 \mu\text{m}$ . Aún es controversial el hecho de que la fuerza relativa que desarrollan los miofilamentos se hace menos sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  mientras la longitud del sarcómero disminuye. Una hipótesis es que la cTnC es un "sensor de longitud". Esta teoría se basa en experimentos en los cuales el intercambio de cTnC con TnCmr dotó de células cardíacas que fueron extraídas con un detergente, cuya activación dependía de la disminución de su longitud, característica que presumiblemente pertenece a las fibras de músculo esquelético lento. Estudios complementarios con éstas fibras, en las cuales se intercambió la TnCmr por la cTnC se observó el efecto opuesto, pero las mediciones requeridas se hicieron a una fuerza iónica por debajo de la fisiológica <sup>(40)</sup>.

Otro aspecto (además de si la cTnC funciona como sensor de longitud) es si existe en primer lugar, una diferencia en la activación dependiente de la longitud entre los miofilamentos de músculo rápido y músculo cardíaco. Hay una necesidad de hacer comparaciones bien controladas que tomen en cuenta los niveles de fosforilación de proteínas y los perfiles de sus isoformas. Hasta que se hagan dichas comparaciones con miofilamentos de músculo cardíaco, músculo esquelético rápido y músculo esquelético lento, será difícil llegar a conclusiones definitivas referentes a los mecanismos de la activación dependiente de la longitud.

En cualquier caso, se cree que mientras la cTnC pueda participar de manera especial en la dependencia de la activación, particularmente si algunas de las isoformas de sus proteínas vecinas en el filamento delgado cambia, será menos probable que la cTnC sea el sensor de longitud en el músculo estriado. Existen mecanismos más complicados que parecen estar involucrados, como se revela en estudios en los que se compara una activación dependiente de la longitud entre miofilamentos cardíacos y de músculo lento, los cuales contienen las mismas isoformas de TnC, de cadena pesada y cadena ligera de miosina. Ambos tipos musculares muestran una activación dependiente de la longitud, pero solo las preparaciones de músculo cardíaco muestran un cambio en la afinidad de la TnC por el  $\text{Ca}^{2+}$  relacionado con la longitud.

Una hipótesis unificada acerca de la activación dependiente de la longitud, es que un cambio en la longitud del sarcómero a un volumen constante, involucra un cambio en el espacio entre filamentos, el cual modula la capacidad de los puentes cruzados para reaccionar con los filamentos delgados a la misma concentración iónica de  $\text{Ca}^{2+}$ . El mecanismo para diferenciar los efectos de la longitud sobre la activación entre las fibras de músculo rápido y músculo lento parece que se debe más bien a las diferencias en la habilidad de los puentes cruzados fuertes para producir efectos de retroalimentación y cooperativamente afectar la activación de los miofilamentos. Las diferencias estructurales y funcionales entre las proteínas del filamento delgado, especialmente TnI, TnT y/o Tm, pueden determinar la habilidad de los puentes cruzados unidos fuertemente para influenciar la unión TnC- $\text{Ca}^{2+}$  o para potenciar a los

miofilamentos y, por lo tanto, influenciar la probabilidad de que los puentes cruzados cambiarán de un estado de unión bloqueada o débil a uno de unión fuerte mientras el espacio entre filamentos cambia <sup>(40)</sup>.

Se han presentado datos que sugieren que la fosforilación de la TnI juega un papel en el caso de la activación dependiente de la longitud. Esto ocurre cuando se provoca el efecto de eliminar la sensibilidad a los miofilamentos con un tratamiento más prolongado con isoproterenol, conforme más corto es el miofilamento, en ciertas preparaciones en las cuales se midió el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular <sup>(41)</sup>. Después de dar dio el tratamiento con isoproterenol, el cambio dependiente de la longitud en la relación  $\text{Ca}^{2+}$ -tensión se vio amplificado. Aunque no está claramente definido, parece probable que el estado de fosforilación de la cTnI, más que la TnC, fue el responsable del efecto <sup>(40)</sup>.

### 3. TROPONINA I CARDIACA E ISQUEMIA DE MIOCARDIO

#### 3.1 CINÉTICA DE LA TROPONINA I

La palabra isquemia la introdujo Rudolf Virchow para indicar la dificultad en el aporte de sangre con aumento de resistencia el influjo a los tejidos. Isquemia es una palabra latina derivada del griego  $\iota\sigma\chi\epsilon\iota\nu$  que significa detener, mas  $\alpha\iota\mu\alpha$ , que significa sangre. La isquemia hay que entenderla en términos relativos, por lo que Braunwald la define como un desequilibrio entre oferta y demanda de oxígeno <sup>(42)</sup> (Figura 3.1).

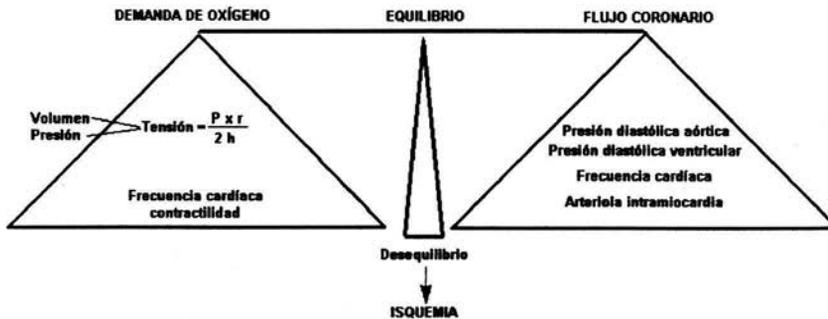


Figura 3.1 Isquemia concebida como desequilibrio entre oferta y demanda de Oxígeno<sup>(42)</sup>

Desde el punto de vista metabólico una definición más estricta es la de Robert Ferrari, que la considera como una condición en la que el flujo coronario es incapaz de proporcionar oxígeno en cantidad suficiente para sostener la oxigenación mitocondrial. Hearse define la isquemia bioquímica como la condición en que el flujo coronario es inadecuado para mantener un estado estacionario del metabolismo, lo cual quiere decir que cuando el estado estacionario se deteriora aumenta la entropía y disminuye la energía (Segunda ley de la termodinámica), entrando en un ciclo progresivo de la organización que termina en la muerte celular <sup>(42)</sup>.

El efecto de la isquemia se manifiesta sobre el órgano diana que es el músculo cardiaco, responsable absoluto y protagonista de todas y cada una de las manifestaciones de la isquemia: efectos metabólicos, efectos mecánicos sobre la función ventricular (primero la función diastólica y luego la sistólica) , fenómenos eléctricos (isquemia, lesión, necrosis, arritmias) y por fin, consecuencias clínicas, la angina como manifestación visible de un gran iceberg <sup>(42)</sup> (Figura 3.2).

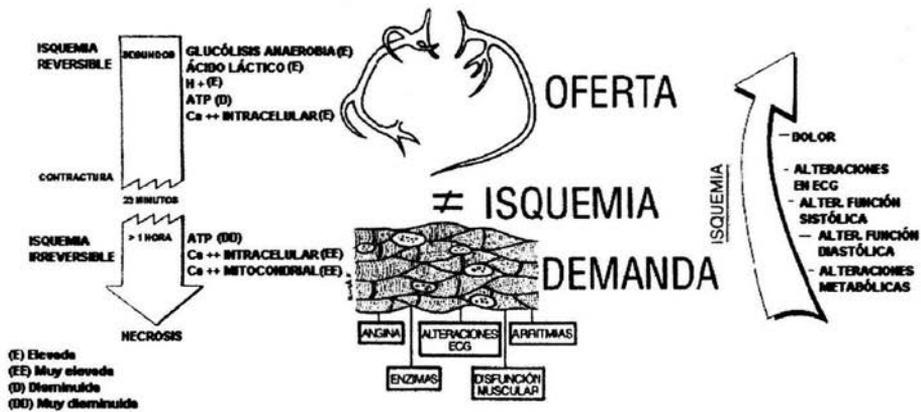


Figura 3.2. Diversas manifestaciones de la isquemia cardíaca siendo el músculo la diana de la circulación coronaria<sup>(42)</sup>.

Los efectos metabólicos son los primeros en aparecer, inhibiéndose la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, la formación de ATP, sustituyéndose la glucólisis aerobia a través del ciclo de Krebs, por la anaerobia. Como resultado, disminuye el ATP y el ácido pirúvico, al suprimirse el ciclo de Krebs se reduce a ácido láctico como único aceptor de  $H^+$  y fuente de ATP. La producción de ácido láctico por el músculo cardiaco isquémico se puede detectar clínicamente por medio del cateterismo del seno coronario y es el primer signo de isquemia antes o simultáneo con las alteraciones mecánicas, eléctricas y mucho antes que el dolor. Muchas definiciones de la isquemia están basadas en este hecho. Por ejemplo, Kloner define la

isquemia como una reducción del flujo coronario hasta alcanzar el punto en que el metabolismo miocárdico cambia de aerobio a anaerobio o Jennings y Reimer que definen la isquemia como un estado en que el flujo arterial al miocardio es insuficiente para proporcionar suficiente oxígeno para evitar que el metabolismo energético celular varíe de la respiración aeróbica a la glucólisis anaerobia <sup>(42)</sup>.

Sin embargo, el aumento del ácido láctico local y del número de protones ( $H^+$ ), disminuye el pH y se detiene la glucólisis a nivel de la fructosa-6-fosfato, con lo que se interrumpe también la glucólisis anaerobia (Figura 3.3). También aumentan el fósforo inorgánico y otros productos de la hidrólisis de los nucleótidos de adenina del ATP. Como consecuencia de todo ello se altera la permeabilidad del sarcolema, seguramente con la colaboración de radicales libres de oxígeno como el superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Al desnaturalizarse el sarcolema se pierde  $K^+$  y aumenta la entrada de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  a favor del gradiente de concentración y se crea una "carga osmolar" que produce edema celular con ruptura del sarcolema. Precisamente esta carga osmolar es la característica que diferencia la isquemia miocárdica de la hipoxia experimental o clínica en que la perfusión normal permite el lavado de electrolitos y productos de desecho. La disrupción del sarcolema puede señalar en el miocito el paso al punto de no retorno. Este punto de no retorno marca el límite entre la fase reversible e irreversible de la isquemia. La fase irreversible es la muerte celular del infarto de miocardio. Por otra parte, el aumento del calcio intracelular conduce a la calcinosis mitocondrial. La entrada masiva del calcio en las mitocondrias, utilizando la fuerza protomotriz suprime la producción de ATP y conduce a necrosis tisular <sup>(42)</sup>.

El término Síndrome Coronario Agudo (SCA) comprende un espectro de pacientes que se presentan con dolor torácico y otros síntomas, causados por la isquemia miocárdica. Es de gran importancia la identificación y estratificación del riesgo del paciente que amerita hospitalización con éste síndrome, con el fin de iniciar la terapéutica médica e identificar los pacientes susceptibles de revascularización inmediata o selectiva (angioplastia con balón,

colocación de anillos o stent o revascularización quirúrgica: cirugía de bypass o puentes aortocoronarios <sup>(2)</sup>.

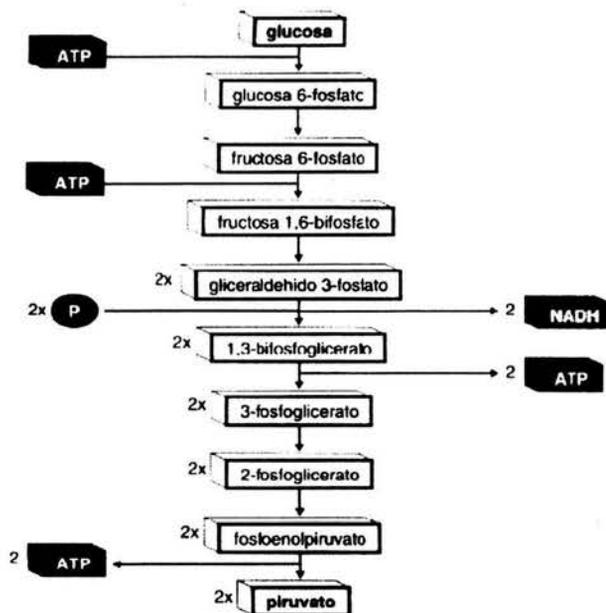


Figura 3.3. Glucólisis

La unificación de las manifestaciones clínicas de la enfermedad coronaria bajo el término de Síndromes coronarios agudos refleja el mecanismo fisiopatológico de su producción caracterizada por la erosión, fisura o ruptura de la placa aterosclerótica, con la exposición de su contenido al torrente sanguíneo y la subsiguiente trombosis intravascular, con el resultado final del compromiso del flujo coronario. Dependiendo de la evolución del paciente, de la presencia o ausencia de obstrucción mecánica por la placa y su contenido, así como la extensión y tamaño del trombo y la presencia o no de circulación colateral, se producirán diferentes manifestaciones de la enfermedad isquémica aguda del corazón que van desde la angina inestable <sup>(2)</sup> hasta el infarto agudo del miocardio con o sin elevación del segmento ST.

Sabemos que la génesis de la aterosclerosis, está relacionada con la inflamación: la presencia de células inflamatorias es fundamental para transformar una placa estable en inestable (Figura 3.4). Se ha demostrado que, desde el desarrollo de la estría grasa (en la pared vascular de niños) existe una reacción inflamatoria en la que intervienen macrófagos y linfocitos T; estas células de la placa aterosclerótica van a desplazar a las células musculares lisas. La inflamación recurrente, la disfunción endotelial, la modificación de las lipoproteínas de baja densidad y la formación de radicales libres van a participar en la formación de la placa aterosclerótica. Los factores de riesgo que van a intervenir en la disfunción del endotelio: diabetes, hipertensión, tabaquismo, homocisteína e infecciones por microorganismos contribuyen a la formación de la placa. Otros factores como son el flujo turbulento, estrés de la pared (factores reológicos) dan lugar a la disposición más frecuente de las placas ateroscleróticas en ramas y bifurcaciones dentro del árbol vascular, donde se produce el acúmulo de células inflamatorias y linfocitos T <sup>(49)</sup>. Existen datos relevantes que confirman el papel de la inflamación en el desarrollo del SCA. La inflamación de la placa cause la secreción de citosinas, como la IL-1, IL-6, el interferón, el FNT- $\alpha$  que aumenta la secreción del factor tisular que va a provocar el comienzo de la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. El factor tisular se sintetiza tanto localmente en las células apoptóticas de la placa aterosclerótica como en los monocitos circulantes, dando lugar a una situación general de potencial trombogenicidad. Por lo tanto, la determinación de marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva (PCR), la cual es bien conocida como proteína de fase aguda ha sido objeto de múltiples análisis en relación con su papel en la enfermedad coronaria (Figura 3.5).

El cuadro clínico puede clasificarse en IAM o AI. Basados en el ECG inicial, se puede subclasificar al paciente como : aquellos con elevación del segmento ST corresponden a IAM, los cuales serán candidatos a la terapia de reperfusión y los pacientes con depresión del segmento ST o sin cambios en el ECG, los cuales deberán ser sujetos a la evaluación de

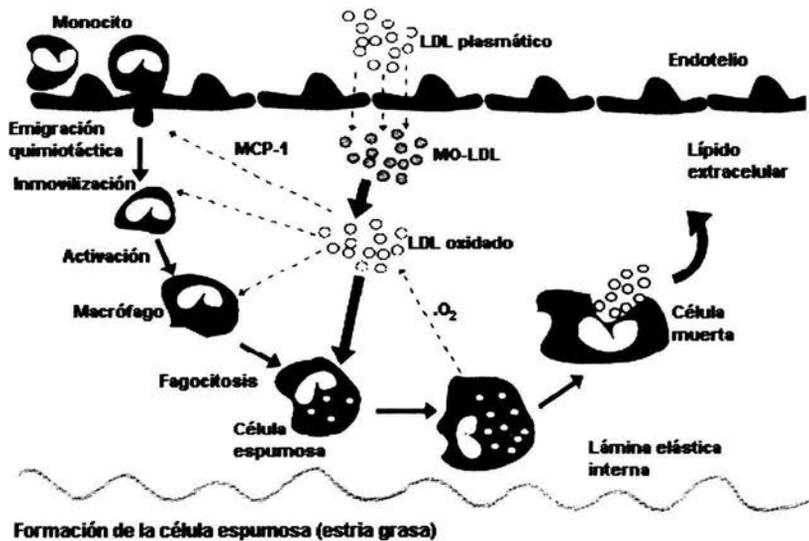


Figura 3.4. Formación de la célula espumosa, sustrato de la estria grasa. Oxidación parcial y total de la lipoproteína LDL y su endocitosis por el macrófago, que es un monocito transformado <sup>(42)</sup>.

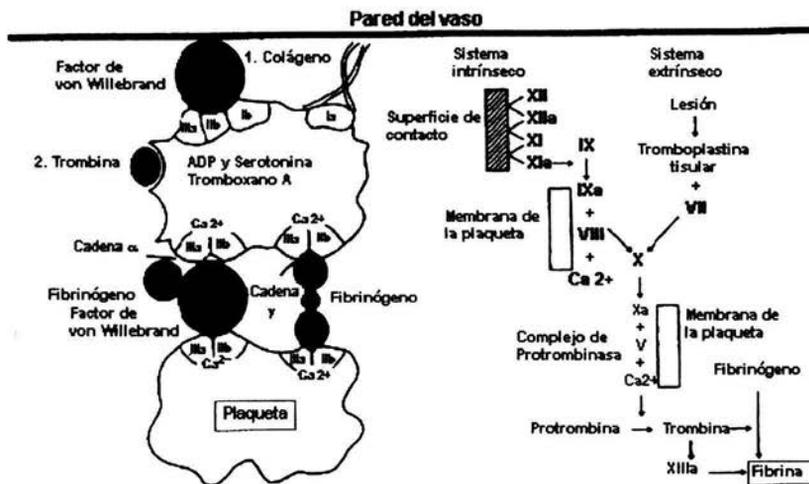


Figura 3.5. Cascada de la coagulación <sup>(42)</sup>.

marcadores séricos de necrosis miocárdica (enzimas cardíacas). Aquellos que tengan valores séricos elevados de enzimas cardíacas se clasifican como portadores de IAM no Q, mientras que los que tengan valores enzimáticos normales, se clasifican como portadores de AI o portadores de dolor torácico de causas no cardíacas. Estos últimos deben seguir otro tipo de evaluación de acuerdo a su cuadro clínico. A la vez la AI puede subclasificarse con objetivos pronósticos, de acuerdo a la clasificación propuesta por Braunwald en 1989 <sup>(44 y 45)</sup> .

En el SCA se van a producir diferentes grados de daño miocárdico con la consiguiente repercusión en el pronóstico. Los datos clínicos y electrocardiográficos lamentablemente tienen limitaciones siendo en ocasiones equívocos por lo que el complemento diagnóstico de los marcadores séricos será determinante <sup>(43)</sup> .

Hace 13 años la cTnI se introdujo como un marcador de IAM. Se ha probado que es uno de los marcadores más específicos y sensibles de IAM, de infarto al miocardio posterior a una cirugía, contusión cardíaca y otros tipos de daño al tejido miocárdico. Aunque la cTnI ha sido utilizada como un marcador de IAM por más de una década y varios ensayos comerciales están disponibles, aún quedan muchas preguntas importantes sin contestar. La pregunta más importante que es de gran relevancia para el desarrollo y calibración de los ensayos es: ¿Cómo es liberada la cTnI a la circulación sanguínea?. Por ejemplo, se sabe que la cTnI es altamente susceptible a la proteólisis, entonces: a) ¿qué es lo que mide el inmunoensayo, la molécula completa o los productos de degradación proteolítica?, b) ¿cuál es el tiempo de vida medio de la cTnI en la circulación sanguínea?, c) se ha demostrado que la cTnI se fosforila por proteincinasas dependientes de fosfolípidos-calcio. La fosforilación de Ser-23 y Ser-24 cambia la conformación de la molécula de TnI y esto afecta su interacción con ciertos anticuerpos monoclonales. Pero aún se desconoce si la cTnI se libera en forma fosforilada o desfosforilada, d) La cTnI humana contiene 2 residuos Cys (Cys-80 y Cys 97) y la oxidación de los grupos SH de TnI afecta su interacción con otros componentes de la troponina y también puede interferir con su unión a los anticuerpos monoclonales.

Aleksei G. Katrukha y colaboradores analizaron la cTnI en el suero de pacientes con IAM contra un panel muy grande de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cTnI purificada y encontraron que la forma predominante de cTnI circula en forma no libre, pero si en forma de complejos <sup>(46)</sup> .

Posteriormente estos autores demuestran que durante la incubación tanto en tejido cardiaco con necrosis como en suero, la cTnI sufre rápida proteólisis y que los diferentes fragmentos tienen diferentes estabildades. La región más resistente a la proteólisis es la localizada entre los aminoácidos 30 y 110 <sup>(47)</sup> .

Alan H. Wu y colaboradores examinaron la liberación de cTnT y cTnI en la sangre de pacientes con IAM. Utilizando ensayos comerciales para cTnT y cTnI encontraron que la troponina se libera en la sangre como un complejo ternario de cTnT-I-C, un complejo binario de cTnI-C y cTnT libre. Las muestras de suero se analizaron después de incubación con EDTA y heparina. El EDTA rompe los complejos de troponina en subunidades individuales, mientras que la heparina no tiene este efecto. Demostraron que hay diferencias en los resultados absolutos de cTnI debida a la falta de estandarización y a la heterogeneidad de la reactividad cruzada de los anticuerpos a varias formas de troponina I <sup>(48)</sup> .

Katrukha y colaboradores evaluaron 6 diferentes formas de cTnI <sup>(49)</sup> :

1. Troponina I, purificada de tejido cardiaco humano.
2. Troponina I cardiaca humana (recombinante).
3. Complejo humano cTnI-TnC (recombinante).
4. Complejo ternario cTnI-cTnT-TnC (recombinante).
5. Complejo ternario humano cTnI-cTnT-TnC.
6. Complejo de troponina nativa.

Estos antígenos se utilizaron para calibrar los ensayos disponibles en el mercado: AxSYM®, IMMUNO 1, OPUS™ MÁGNUM, DIMENSION®, ACCESS® y InnoTrac OY y obtuvieron los siguientes resultados: (Tabla 3.1)

Tabla 3.1. Medición de las diferentes formas de cTnI (32 µg/L) con diferentes ensayos para cTnI (Con calibradores de los fabricantes)						
Antígeno/Ensayo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6
cTnI	67.2	30.3	38.2	30.8	39.2	112.5
cTnI rec	40.4	19.6	34.9	13.9	45.5	41.0
I-C rec	28.8	34.1	27.0	13.7	14.5	162.2
I-T-C rec	44.0	60.3	50.1	21.5	28.6	256
I-T-C in vitro	75.6	70.0	57.9	43.4	36.3	245
I-T-C nativa	70.4	161.2	55.9	40.3	17.3	436

La troponina I y T cardiacas se encuentran elevadas por muchos días después del IAM, como resultado de una degradación lenta y gradual de las miofibrillas. La cinética de liberación de cTnT y de cTnI difiere ligeramente. Como se muestra en la Figura 6, la liberación de cTnT es bifásica, mientras que la liberación de cTnI es monofásica <sup>(50)</sup>.

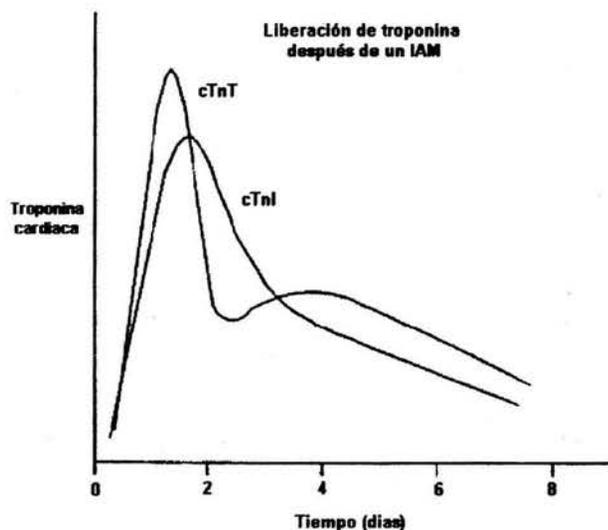


Figura 3.6. Liberación de la troponina T cardiaca y de la troponina I cardiaca después de un IAM. <sup>(50)</sup>

Bertinchant y colaboradores estudiaron la cinética de liberación de la cTnI en daño miocárdico isquémico y sus resultados se muestran en la tabla 3.2 <sup>(51)</sup>.

Tabla 3.2. Cinética de liberación de la cTnI en 48 pacientes con Infarto Agudo de Miocardio	
Valor de corte	cTnI (0.1 µg/L)
Tiempo hasta el primer incremento en plasma (h)	4 (2-7.5)
Tiempo para el valor pico(h)	12.75 (8.15-28)
Tiempo transcurrido hasta regresar al valor normal (h)	170 (99.5-242.2)
Magnitud del incremento	119 (22-1333)
Taza de incremento	1.23 (0.2-19.8)
Porcentaje (pico)	26.7 (1.2-381)

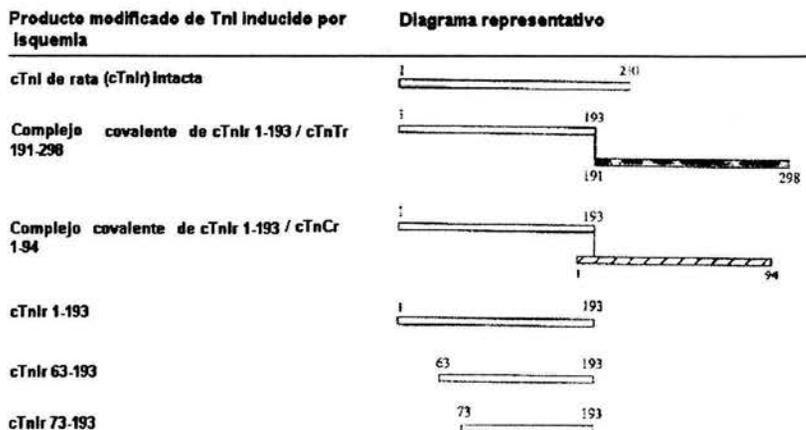
La primera aparición en sangre, el tiempo de los valores pico y el tiempo para regresar a valores normales fueron calculados a partir de la aparición de los síntomas. Los datos dados son las medianas y el Intervalo de confianza de 95% de las medianas (en paréntesis). La magnitud del incremento se calculó dividiendo los valores pico entre los valores de corte. Taza de incremento = (valor pico - valor basal)/(tiempo al valor pico - tiempo al valor basal). Porcentaje de incremento = (valor pico - valor basal)/ valor basal.

La isquemia/reperfusión presenta un espectro de daño desde daño reversible con isquemia media hasta necrosis celular irreversible con isquemia severa. La identificación de proteínas modificadas durante la isquemia/reperfusión es fundamental para entender los procesos patológicos involucrados. Varios estudios han demostrado que las proteínas de los miofilamentos, incluyendo el complejo de troponina, son degradadas o modificadas bajo la isquemia/reperfusión y diferentes modelos de daño isquémico (por ejemplo oclusión de la arteria coronaria, isquemia global, perfusión de Langerdorff y otras combinaciones). Las proteínas reguladoras de los miofilamentos y las proteínas estructurales del citoesqueleto son susceptibles de ruptura o pérdida bajo isquemia/reperfusión. La isquemia/reperfusión media provoca la ruptura de los microtúbulos, dando lugar a lesiones con pérdida de desmina,  $\alpha$ -actina y espectrina. Las proteínas contráctiles actina, miosina, tropomiosina y TnT se liberan totalmente del tejido del ventrículo izquierdo durante la isquemia (tabla 3.3). En especial la TnI

se ha demostrado que se sujeta a proteólisis durante la isquemia y la isquemia/reperfusión <sup>(52 y 53)</sup>.

Jasón y colaboradores encontraron que la modificación selectiva de la TnI es en parte responsable de la disfunción contráctil observada en daño miocárdico por isquemia/reperfusión. Aislaron y caracterizaron productos modificados de TnI de corazón de rata después de 0, 15 o 60 minutos de isquemia seguido de 45 minutos de reperfusión. La TnI cardíaca de rata progresivamente se degradó desde residuos de 210 aminoácidos a residuos de 1-193, 63-193 y 73-193 al incrementar la severidad del daño. La degradación es acompañada por la formación de complejos covalentes entre TnI (1-193) y respectivamente, TnC (1-94) y TnT (191-298). Los complejos covalentes son probablemente el resultado de la formación de un puente isopéptido entre la lisina 193 de TnI y la glutamina 191 de TnT por la enzima transglutaminasa. (Figura 3.7). Durante a isquemia severa, la necrosis celular libera TnI (1-193) en el efluente de la reperfusión y degradación de TnT en el miocardio (productos de 25, 27 y 33 KDa). Demostraron además que la fosforilación de TnI previene la degradación inducida por la isquemia. Finalmente proponen un modelo de daño isquemia/reperfusión en el cual la magnitud de la actividad proteolítica y de la transglutaminasa determina si se lleva a cabo necrosis celular o apoptosis <sup>(52)</sup>.

Producto de TnI por la isquemia/reperfusión inducida	Porcentaje de TnI total de tejido de ventrículo izquierdo		
	0/45	15/45	60/45
Complejos covalentes	0	16.9%	3.1 %
TnI rc	94.4%	52.2%	35.3%
Productos de degradación de TnIrc			
≈ 22kDa	5.6%	24.1%	21.3%
≈ 16 kDa	0	0	15.1%
≈ 15 kDa	0	0	17.2%



**Figura 3.7.** Productos modificados de la cTnI inducidos por la isquemia. Los productos inducidos por la isquemia están descritos por barras, en donde la longitud de la barra indica el número de residuos aminoácidos. La TnI esta representada por barras blancas, la TnC esta representada por una barra sombreada y la TnT esta representada por la barra con rayas diagonales. Las líneas verticales indican el lugar donde se une el isopéptido putativo formando los complejos covalentes. La TnI inicialmente sufre proteólisis en el extremo C-terminal bajo la isquemia media en los aminoácidos 1-193, fragmento que se compleja covalentemente con los residuos 1-94 de cTnC y 191-298 de cTnT. La isquemia mas severa resulta en la pérdida de los complejos covalentes y en la proteólisis N-terminal del fragmento 1-193 de la cTnI. La fosforilación de la TnI protege a los extremos N- y C-terminales en contra de la degradación.<sup>(52)</sup>

### 3.2 COMPORTAMIENTO DE LA cTnI EN ISQUEMIA CARDIACA

Se dice que hay necrosis miocárdica cuando la concentración máxima de cTnT o de cTnI excede el límite de decisión (99% de los valores de un grupo control de referencia) en por lo menos una ocasión durante las primeras 24 horas después de un evento clínico indicado <sup>(54 y 55)</sup>. Es importante notar que los pacientes pueden tener un episodio de microinfarto donde la medición de cTnT o cTnI exceda el límite de decisión y aún el ensayo de masa de CKMB permanezca en el rango normal. Se estima que cerca de una tercera parte de los pacientes que se presentan sin elevación del segmento ST quienes previamente habrían sido diagnosticados con AI basándose en el valor normal de CKMB, ahora son diagnosticados como pacientes con IM sin elevación del segmento ST gracias a los niveles detectables de troponina <sup>(56)</sup>.

Recientemente se ha sugerido que la especificidad de la cTnI es mayor que la de la cTnT. No hay un incremento de resultados falsos-positivos en pacientes con daño en músculo esquelético o después de un esfuerzo grande. En realidad, la sensibilidad es comparable pero su especificidad es mayor que la de la CKMB para necrosis miocárdica. Más aún, la cTnI provee de información pronóstica para la identificación temprana de pacientes con alto riesgo de muerte posterior a IAM <sup>(57)</sup>.

En un estudio <sup>(57)</sup> se encontró que la cTnI sérica es más alta en pacientes con AI que en pacientes con AE y pacientes normales pero la misma proteína no se incrementa en los casos de AE con respecto a los controles sanos. El incremento de los valores de cTnI en casos de pacientes con AI se asocia con una mayor duración de los síntomas antes de la admisión en el hospital y con complicaciones más frecuentes a lo largo de la enfermedad aguda. Se ha reportado que en pacientes con AI están presentes unas oclusiones de arterias intramiocárdicas pequeñas y áreas focales de necrosis miocárdica las cuales no fueron detectadas con los marcadores séricos convencionales. En estos pacientes es posible que se haya dado un IAM no detectado en la misma semana del evento o antes de la admisión a la unidad de cuidados

coronarios. Por tanto, el incremento de cTnI en sangre refleja una detección muy sensible de menores cantidades de necrosis miocárdica. Por otro lado la concentración de cTnI en el miocardio es 13 veces más alta que la concentración de CKMB: por esto, el incremento absoluto en la concentración sanguínea por unidad de tejido dañado es más pronunciada. Además, el rango normal de referencia es, por mucho, más estrecho para la cTnI que para la CKMB, aún un pequeño incremento en los niveles circulantes de la proteína pueden inducir la elevación por encima de los límites de referencia convencionales. Al contrario del IAM, en los pacientes con Angina no se encontraron similitudes en los niveles circulantes de cTnI con respecto a las diferentes características epidemiológicas y parámetros clínicos de los sujetos investigados.

En este estudio se concluyó que el hallazgo de que la concentración de cTnI es más alta en casos de AI que en casos de AE sugiere que en el primer grupo pueden haber áreas focales de necrosis miocárdica que no son detectables usando marcadores bioquímicos convencionales. Estos datos demuestran la utilidad de realizar ensayos para cTnI circulante en pacientes afectados con síndrome isquémico coronario agudo.

En otro estudio sobre el efecto que la isquemia tiene sobre la concentración de cTnI <sup>(58)</sup> se indica que un alto porcentaje de pacientes que presentan AI también muestran evidencia de daño miocárdico. Muchos apoyan que estos pacientes deben de ser diagnosticados con IAM. Los médicos que se enfrentan a estos casos no están seguros de si la liberación de troponina indica daño miocárdico o si esta se da solo cuando se presenta la isquemia miocárdica sola. El estudio indica que la manera actual de categorizar a los pacientes dentro del grupo de pacientes con isquemia y el grupo de pacientes con infarto es la apropiada cuando se utiliza la troponina cardiaca (no se diferencia entre troponina I o T). Según este estudio los pacientes que solo presentan isquemia no deben de tener ni incrementos sutiles. El incremento sutil de las troponinas cardiacas como marcadores no se debe de esperar como respuesta a una isquemia. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la evocación de una isquemia regional no

genera la liberación o proteólisis de la troponina. En conjunto con los datos de la Sociedad Europea de cardiología y el Colegio Americano de Cardiología los datos de este estudio sugieren que los pacientes con elevación en la concentración de troponina deben de ser diagnosticados como pacientes que presentan daño miocárdico, también sugieren que un incremento menor por debajo del nivel usado para diagnosticar daño miocárdico debe de ser significativo, ya que los pacientes que solo presentan isquemia no deben de presentar elevaciones mínimas. Los resultados sacados de este estudio indican que para propósitos clínicos el aumento detectable de troponina no se da cuando solo hay isquemia a menos que exista un componente de daño cardiaco.

#### 4. OTRAS CONDICIONES CLÍNICAS QUE AFECTAN LA CONCENTRACIÓN DE cTnI

Las elevaciones sin explicación de las troponinas son extremadamente raras pero pueden causar confusión algunas veces. Una elevación de la troponina refleja necrosis celular del miocardio en forma irreversible. Se han descrito valores anormales de las troponinas en condiciones tales como la miocarditis, embolia pulmonar, fracaso cardiaco agudo, shock séptico y como resultado de la administración de fármacos cardiotóxicos, así como después de procesos terapéuticos como la angioplastia coronaria, ablación electrofisiológica o cardioconversión eléctrica.

En el escenario de la sala de urgencias, la embolia pulmonar y la perimiocarditis representan el diagnóstico diferencial mas importante asociado a troponinas elevadas <sup>(59)</sup>.

En la embolia aguda, las troponinas se elevan probablemente debido a la sobrecarga aguda del corazón derecho. El mecanismo propuesto es que el daño del miocardio y la liberación de cTnT en pacientes con embolia pulmonar es diferente al de los pacientes con síndrome coronario agudo pero sin embolia pulmonar, ya que la cTnT en los pacientes con embolia pulmonar se origina del pool citoplasmático o que la troponina se libere por isquemia del miocardio reversible o irreversible <sup>(60)</sup>.

En miocarditis confirmada por histología, las troponinas regularmente se elevan, pero también se elevan en la mitad de los pacientes con sospecha clínica de miocarditis. Es interesante subrayar que las elevaciones de cTnI no correlacionan con la severidad histológica de miocarditis. Hay varias explicaciones posibles para estos hallazgos. La cinética del daño de los miocitos es prolongada, haciendo difícil la selección ideal del intervalo de muestreo tanto para la biopsia endomiocárdica como para la medición de cTnI. En la actualidad, la biopsia endomiocárdica es la prueba estándar para el diagnóstico de miocarditis. Su limitante es la pequeña cantidad de tejido que puede ser obtenida, la cual es particularmente importante para

detectar necrosis del miocito cardíaco. Es probable que pruebas sensibles específicas para detectar daño de los miocitos, tales como la cTnT, podría ayudar al diagnóstico de la miocarditis <sup>(61)</sup>.

En aquellos pacientes con severa disfunción renal, se ha encontrado que tanto la troponina T como la troponina I, se encuentran elevadas sin que se presente daño miocárdico. La razón de estas elevaciones no ha sido explicada convenientemente, la reexpresión de las isoformas cardíacas en el músculo esquelético se ha excluido por diferentes análisis e investigadores. La explicación más convincente es la pérdida de la integridad de la membrana y constante flujo desde el pool de troponina del citoplasma, así como el daño en la excreción renal, lo que sinérgicamente contribuye a la elevación de la cTnI. el pool de troponina en el citoplasma en forma libre y el alto peso molecular puede explicar porque la troponina T se encuentra elevada más frecuentemente que la troponina I. <sup>(59, 62, 63 y 64)</sup>

En pacientes con cirrosis hepática se han encontrado niveles elevados de cTnI, con valores anormales de CK-MB. Los niveles de cTnI elevados se relacionaron con la disfunción del índice volumen-latido y disminución de la masa ventricular izquierda, pero no con la severidad de la cirrosis <sup>(61)</sup>.

La ablación con radiofrecuencia ha demostrado ser una opción curativa altamente efectiva en el tratamiento de múltiples arritmias. Se sabe que tras la ablación con radiofrecuencia es posible detectar en algunos pacientes elevaciones de la actividad de la creatin cinasa, en general leves, y que dependen del tipo de ablación efectuada, así como del número de aplicaciones efectuadas. El mecanismo primario de la lesión miocárdica producida durante la ablación con radiofrecuencia es térmico. Tras la ablación endocárdica por radiofrecuencia se produce una lesión tisular que da lugar a la liberación de marcadores de lesión miocárdico. De estos marcadores el más sensible es la cTnI, que incluso es capaz de detectar lesiones más pequeñas, lo que no sucede con el resto de los marcadores. El hecho de que la cTnI alcance un pico de liberación a las 8 horas post-ablación, nos lleva a sugerir que la

determinación de cTnI durante el pico debería de ser una práctica clínica rutinaria tras cada procedimiento de ablación, como medida preventiva precoz de la aparición de episodios isquémicos peri o post-ablación, así como para evaluar la cuantía de la lesión miocárdica producida mediante esta técnica <sup>(65)</sup>.

Shmuel y colaboradores <sup>(66)</sup> examinaron el significado pronóstico de los niveles de troponina después de intervenciones coronarias basadas en cateterismo en arterias coronarias y lesiones de injerto de la vena safena. Los niveles de CK-MB y cTnI se midieron a las 6, 18 y 24 horas después de la intervención coronaria basada en cateterismo en 1129 pacientes. Los pacientes fueron estratificados de acuerdo a los niveles máximos de cTnI post-angioplastia en:

Grupo 1 (n= 784) cTnI no elevada (< 0.15 ng/mL)

Grupo 2 (n=170) cTnI entre 0.15 y 0.45 ng/mL

Grupo 3 (n=175) cTnI mayor a 0.45 ng/mL

Las mayores complicaciones en el hospital (muerte, infarto onda Q e injerto "bypass" coronario de emergencia) se compararon en los tres grupos, encontrando que la elevación de cTnI mayor a 0.45 ng/mL se asocia con un incremento del riesgo de mortalidad (grupo 3 = 1.6 %, grupo 2 = 0.6 % y grupo 1 = 0.1%) y también con complicaciones mayores en el hospital (3.2 %, 1.7 % y 0.5 %). No hubo diferencia en muerte (1.8%, 3.2% y 2.4%).

## 5. PRUEBAS PARA LA DETERMINACIÓN DE TROPONINA I

### 5.1 ANTECEDENTES

El campo de los marcadores bioquímicos de daño cardíaco se encuentra en un estado dinámico, con la continua aparición de nuevas aplicaciones y el desarrollo de nuevos marcadores y ensayos. La disponibilidad de procedimientos innovadores para detectar mioglobina, troponina I cardíaca (cTnI) y troponina T cardíaca (cTnT), y masa de creatin cinasa (CK)-MB en lugar de actividad de la isoenzima, representa una mayor oportunidad para mejorar significativamente la evaluación clínica del síndrome coronario agudo <sup>(68)</sup>.

La cTnI y la cTnT son consideradas como los marcadores bioquímicos disponibles más específicos para la determinación de daño cardíaco. Las mediciones cuantitativas de las troponinas pueden llevarse a cabo con diversos inmunoensayos comercialmente disponibles. Utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epítopes que son únicos para la isoforma cardíaca, estas técnicas demuestran una especificidad satisfactoria: no se ha reportado reactividad cruzada con las isoformas de las troponinas músculo-esqueléticas<sup>(64)</sup>. De los nuevos marcadores de necrosis miocárdica, las troponinas tienen la ventana de diagnóstico temporal más amplia: permanecen anormales por 4 a 10 días después de la aparición del IAM. Esta característica hace a la troponina particularmente útil para diagnosticar infartos con aparición retardada. Posiblemente la única desventaja significativa de las troponinas es la insuficiente sensibilidad clínica en las fases tempranas del IAM. Debido a su cardioespecificidad y a sus muy bajas concentraciones séricas en los individuos normales, las troponinas también tienen una mayor sensibilidad a niveles bajos de daño al miocardio. Su elevación ha sido bien documentada en el síndrome coronario agudo en el marco de la actividad de isoenzimas y enzimas tradicionales normales, y se ha creado una nueva categoría de diagnóstico, la de

"daño miocárdico menor", para describir esta condición. Estas elevaciones están claramente asociadas con un aumento de eventos cardiacos adversos a corto plazo <sup>(67 y 55)</sup>.

La metodología de los ensayos de primera generación para cTnT se basaba en la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) con dos anticuerpos monoclonales: el anticuerpo conjugado con biotina (M7) y el anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa (1B10). Inicialmente el ensayo se evaluaba en el sistema ES22, después fue automatizado y evaluado en el sistema ES300 con el método ELISA para TnT. Esto representó el primera ensayo totalmente automatizado para cTn (ensayo de primera generación). La introducción de los ensayos de segunda generación sobrepasaron los problemas que se empezaron a presentar en los de primera generación con respecto a la formulación al utilizar anticuerpos de especificidad completamente cardiaca <sup>(83)</sup>.

## 5.2 PRINCIPIOS PARA LA SELECCIÓN DE PRUEBAS

Como con todas las pruebas de laboratorio, la selección adecuada depende de una historia previa y de un examen médico cuidadosos. Esto permite al médico seleccionar las pruebas mas indicadas para confirmar o descartar la enfermedad sospechada o para clasificar su severidad. La mejor conducta es minimizar el número de pruebas, primero, seleccionando solo aquellas que son menos caras y que permitirán tomar decisiones médicas sobre el manejo del paciente. Con frecuencia la necesidad de pruebas adicionales se puede basar en tales resultados. Por ejemplo, en la evaluación de dolor de pecho por causa incierta, la prueba de tensión electrocardiográfica, que es relativamente barata, puede proveer de suficiente información para eliminar la consideración de enfermedad coronaria y para eliminar la necesidad de pruebas adicionales. Por otro lado, si esta prueba fuera positiva o no concluyente, uno puede entonces necesitar una prueba más cara de tensión nuclear con el fin de obtener un diagnóstico firme y un plan definitivo de manejo del paciente. Se debe enfatizar en que se

ordenan solo las pruebas que rindan resultados que se esperaría que influenciaran razonablemente el manejo del paciente. Si el manejo subsecuente no fuera afectado a pesar del resultado de una prueba dada, entonces esta prueba debe evitarse.

Después de la historia y examen médicos iniciales, si el médico no está seguro de la elección adecuada de pruebas, el o ella debe de considerar primero, la consulta solicitada de un especialista en enfermedades cardiovasculares. Los especialistas son generalmente capaces de seleccionar críticamente un número mínimo de pruebas que no solo resultarán en un diagnóstico y manejo adecuado del paciente, sino que también con frecuencia van a reducir costos de cuidado de ese paciente en particular <sup>(56)</sup>.

### 5.3 ESTANDARIZACIÓN DE ENSAYOS

De acuerdo con ciertos autores podemos decir que hay varios ensayos para proteínas marcadoras disponibles, y la diversidad de tales ensayos ha llevado a una confusión substancial. Mucha, pero no toda la confusión debe de ser resuelta con la estandarización (por ejemplo la estandarización de anticuerpos).

Este aspecto, se ha vuelto importante con respecto a la medición de la troponina. Existe la multiplicidad de ensayos. Éstos están compuestos de diferentes configuraciones de anticuerpos que reconocen diferentes epítopes, algunos de los cuales son más y otros menos estables; tienen diferentes coeficientes de variabilidad y muestran diferencias con los materiales de calibración. La Asociación Americana de Química Clínica ha intentado estandarizar los ensayos por muchos años y han encontrado mucho apoyo en este esfuerzo por parte de varios grupos<sup>(55)</sup>. Considerando el estudio de Christenson y Colaboradores <sup>(69)</sup> el hecho de que existan numerosos ensayos para determinar cTnI ha generado una situación en donde las mediciones de la proteína utilizando métodos diferentes en los mismos especímenes pueden diferir hasta 100 veces, creándose un problema substancial para los laboratorios, particularmente conforme

aumente el uso de la prueba de la cTnI. Para esto se ha creado un comité de estandarización cuyo principal objetivo es designar materiales de referencia internacionales para la cTnI y con esto disminuir substancialmente la variación entre métodos. Recientemente se ha inducido un pequeño grado de estandarización para la CK-MB pero se están realizando esfuerzos similares para la cTnI. La Academia Nacional de Bioquímica Clínica generó un grupo de recomendaciones para el uso de marcadores cardiacos en enfermedades coronarias <sup>(70)</sup>. A continuación se mencionan algunas:

➤ Recomendaciones para marcadores en el trato de pacientes con dolor de pecho:

*Recomendación 1.* Los miembros del departamento de emergencia, de la división de cardiología, administración del hospital y laboratorio clínico deben de trabajar de manera colectiva para desarrollar un protocolo acelerado para el uso de los marcadores bioquímicos en la evaluación de pacientes con posible SCA.

*Recomendación 2.* En la práctica clínica de rutina, la recolección de muestras sanguíneas debe hacerse con referencia al tiempo de la presentación del paciente en la sala de emergencias (cuando sea disponible) y con el tiempo reportado de la aparición del dolor de pecho.

*Recomendación 3.* Se deben de usar dos marcadores bioquímicos para el diagnóstico de rutina de IAM: un marcador temprano (que se incrementa fácilmente en sangre dentro de las 6 horas posteriores a la aparición de los síntomas) y un marcador definitivo (que se incrementa en sangre después de 6 a 9 horas, pero con mayor sensibilidad y especificidad de daño miocárdico, permaneciendo anormal por varios días después de la aparición de síntomas).

*Recomendación 4.* En las salas de emergencia en las cuales no se toma una decisión del trato que se dará a los pacientes durante las primeras 2 horas posteriores a que el paciente

se presentó, el uso de un marcador temprano como la Mioglobina puede ser innecesario. En este caso, solo es necesario un marcador definitivo como la cTnl. La frecuencia de colección de muestras sanguíneas también deberá reducirse.

➤ **Recomendaciones para uso de marcadores en pacientes con SCA:**

*Recomendación 1.* Se necesitan dos límites de decisión para el uso óptimo de marcadores cardiacos sensibles y específicos tales como la cTnl o cTnT. Un valor anormal bajo establece la presencia inicial de un daño miocárdico verdadero, y un valor anormal alto sugiere un daño que se ha extendido y se puede calificar como IAM, como se define previamente por la OMS.

*Recomendación 2.* Los pacientes con dolor de pecho con resultados de laboratorio para la cTnT o cTnl entre el límite superior del intervalo de referencia y el límite de decisión de IAM se deben de calificar como pacientes que presentan daño cardiaco. Esto pacientes deben de admitidos y tratados agudamente para reducir el riesgo asociado con este daño.

*Recomendación 3.* La definición de la OMS de IAM se debe de expandir para incluir el uso de marcadores bioquímicos en serie y no limitarse solo a cambios en las enzimas. Se debe de enfatizar que para descartar un IAM no se pueden considerar solo los datos de una muestra sanguínea única. Sin embargo, cuando se usan marcadores muy específicos la presencia de una concentración anormal de un espécimen único puede tener un valor diagnóstico alto en daño miocárdico.

## 5.4 TOMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

### 5.4.1 FRECUENCIA DE MUESTREO

Es crítico asegurarse que las muestras de sangre sean obtenidas por lo menos 6 a 9 horas después de la aparición de los síntomas. Cuando la hora de la aparición de los síntomas se conoce con claridad, se recomienda una muestra al momento de la admisión y 6 a 9 horas después de la aparición de los mismos. Sin embargo, si la hora de la aparición de los síntomas no se conoce con claridad, se sugiere muestrear una vez al momento de la admisión y otra vez 6 a 9 horas después, con una medición opcional a las 12 a 24 horas. Frecuentemente es bueno insistir en tomar más de una muestra para hacer el diagnóstico.

Para pacientes que necesitan un diagnóstico rápido, se puede recurrir al uso de un marcador de aparición rápida (como isoformas de la CK-MB o mioglobina). Esta aproximación debería ser usado cuando los resultados llevarán a hacer cambios en la terapia. La frecuencia de muestreo debe de ser al momento de la admisión, a las 2 a 4 horas, a las 6 a 9 horas, con un muestreo opcional de 12 a 24 horas. Se puede recurrir a un protocolo similar para los pacientes que pasarán por procedimiento intervencionista. Sin embargo, en esta situación, la muestra inicial debe de ser tomada antes del procedimiento <sup>(55)</sup>.

#### 5.4.1.1 Circunstancias especiales

Ya que los incrementos de la troponina pueden persistir, el tiempo que pasa entre un evento cardiaco y otro puede ser confuso (por ejemplo si los valores de troponina están elevados en la primera muestra al momento de la presentación o en situaciones donde se sospecha de re-infarto). En estas situaciones, los valores de CK-MB pueden ser útiles para ayudar a clarificar si un evento es reciente (dentro de las 48 horas previas).

Para los pacientes que pasan por procedimientos intervencionistas, el incremento de los biomarcadores se dará mas frecuentemente que los incrementos correspondientes con la CK-

MB y estos incrementos serán de mayor magnitud debido a una mayor velocidad de liberación y a la elevada eliminación asociada con la oclusión y reperfusión. Así, estos eventos frecuentemente son indicativos de cantidades muy pequeñas de daño de miocardio en comparación con otras situaciones clínicas <sup>(55)</sup> .

#### **5.4.2 CONDICIONES DE MUESTREO**

Se pueden utilizar muestras de suero (incluyendo suero recogido en tubos con separador TSS) o plasma (recogidas en tubo con heparina de litio y heparina sódica) humanos <sup>(71)</sup>. Existe evidencia de que al comparar los resultados de una muestra de suero con los de una muestra de plasma heparinizado existe una alta correlación <sup>(71)</sup> , demostrándose que la cTnI puede ser medida cuantitativamente utilizando cualquier muestra. Esto se confirma en las recomendaciones de la NACB para la medición de masa de troponina I o T, quienes recomiendan el uso el plasma obtenido con heparina, aunque también puede emplearse el plasma obtenido con otros anticoagulantes, considerando que los resultados pueden ser distintos según el tipo de anticoagulante empleado. La sangre no es un espécimen adecuado para la mayoría de los analizadores automáticos, pero es útil en los sistemas empleados para los análisis junto al paciente <sup>(72)</sup> .

#### **5.4.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Independientemente del ensayo que se utilice para la determinación de troponina I, las condiciones y la preparación de la muestra no varían y es por eso que el siguiente listado de recomendaciones se han tomado del folleto que proporciona una de las empresas que ha desarrollado el inmunoensayo enzimático con micropartículas (MEIA)<sup>(71)</sup> . Las recomendaciones son las siguientes:

1. Antes de centrifugar la muestra, compruebe que la formación del coágulo se haya completado, ya que algunas muestras, especialmente las de pacientes bajo terapia con

anticoagulantes o terapia trombolítica, pueden presentar tiempos de coagulación prolongados. Si la muestra se centrifuga antes de que se complete la formación del coágulo, la presencia de fibrina puede causar resultados erróneos.

2. Para obtener óptimos resultados, las muestras no deben de presentar fibrina, eritrocitos ni partículas en suspensión.
3. Se deben evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación. Mezclar bien las muestras después de una descongelación en un agitador para tubos a baja velocidad o invirtiéndolas suavemente y centrifugarlas antes del uso para eliminar partículas en suspensión y asegurar la reproducibilidad de los resultados.
4. Si el análisis se retrasa mas de 8 horas es necesario retirar el coágulo o los eritrocitos del suero o plasma. Antes del análisis las muestras se pueden almacenar hasta 72 horas a una temperatura entre 2 y 8 °C o congeladas a una temperatura de -10°C (o inferior). Es necesario mezclar y centrifugar las muestras de pacientes después de cualquier ciclo de congelación-descongelación o eliminar los eritrocitos o cualquier partícula en suspensión.
5. No utilizar muestras inactivadas con calor.
6. No se deben utilizar muestras que presenten contaminación microbiana evidente.
7. No deben de haber burbujas en las muestras, si las hubiera, se deberán de eliminar antes del análisis.
8. En caso de transporte de las muestras, se deben de preparar y etiquetar de acuerdo con las normas que rigen el transporte de muestras clínicas y sustancias infecciosas. Las muestras se deben enviar congeladas con nieve carbónica. Antes de descongelarlas, se debe retirar el coágulo o los eritrocitos del suero o plasma.
9. El volumen de muestra varía dependiendo el ensayo que se utilice.
10. Se debe evitar el uso de muestras hemolizadas, ya que la hemólisis causa interferencia en los inmunoensayos para cTnl y se ha demostrado que cuando se añade una

sustancia hemolizante (no necesariamente exceso de Hemoglobina) a una muestra de plasmática la concentración de cTnI se ve incrementada <sup>(73)</sup>.

## 5.5 CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS ACTUALES

En esta sección vamos a describir específicamente a los llamados inmunoensayos los cuales se basan en la secuencia de aminoácidos de la cTnI y utilizan anticuerpos cardíaco-específicos dirigidos a estas diferentes secuencias, lo cual, como se mencionó anteriormente, otorga una especificidad característica a la prueba. Los diferentes inmunoensayos conocidos han demostrado un excelente potencial para uso clínico en el diagnóstico de IAM <sup>(74)</sup>. Estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales contra la cTnI y de acuerdo con los estudios de Bodor y colaboradores <sup>(75)</sup> se ha demostrado que no existe reactividad cruzada con otras proteínas musculares. La especificidad de los inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales puede eliminar la confusión que se genera cuando se mide CK-MB o LDH con respecto al tejido que está involucrado en el daño.

### 5.5.1 SISTEMA DE INMUNOENSAYO ACCESS®

El sistema de Inmunoensayo ACCESS para cTnI (Beckman Instruments) es un inmunoensayo de dos sitios (sandwich) que utiliza anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Este sistema es una plataforma de acceso aleatorio y un analizador de inmunoensayo continuo para la generación rápida de los resultados que utiliza la detección por quimioluminiscencia. Es un sistema automatizado que emplea como fase sólida partículas paramagnéticas y la quimioluminiscencia como método de detección de la reacción Ag-Ac la cual, se basa en la obtención de energía luminosa a partir de una reacción química. En este caso la reacción se lleva a cabo entre la fosfatasa alcalina (enzima) y el Dioxietano (substrato), sustancia orgánica con características luminiscentes cuando se encuentra en un estado

electrónicamente excitado <sup>(76)</sup> . El empleo de las partículas paramagnéticas ofrece durante las incubaciones una gran superficie de reacción favoreciendo la detección de bajas concentraciones de analito. Además, por su fácil separación, ayuda a realizar lavados rápidos y eficientes entre lo que no reaccionó y los complejos Ag-Ac ya formados. Por lo tanto, disminuyen considerablemente los tiempos de incubación y a la vez, se elevan la sensibilidad y confiabilidad de los resultados.

Dichas partículas paramagnéticas están compuestas por Oxido de hierro las cuales, llevan una cubierta de celulosa que permite la adsorción de antígenos o anticuerpos específicos para el analito de acuerdo al tipo de inmunoensayo empleado.

La aplicación de quimioluminiscencia en este sistema tiene la ventaja de ser extremadamente sensible para detectar niveles de concentración pequeños de los analitos en muestras problema así como poder emplearla en un amplio rango de ensayos.

Los ensayos pueden ser de dos tipos, ensayos de tipo competitiva o de tipo sandwich de 2 pasos. El primero se llama de tipo competitivo debido a que el analito proveniente de la muestra y el analito conjugado con la enzima proveniente del reactivo compiten por los sitios de unión de dos anticuerpos específicos adsorbidos a la fase sólida para formar un complejo Ag-Ac. En este inmunoensayo la luz obtenida es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra. En la figura 5.1 se muestra un esquema de la reacción. El otro ensayo se llama de tipo sandwich debido a que el analito proveniente de la muestra es capturado entre el anticuerpo específico unido a la fase sólida y el anticuerpo conjugado con la enzima proveniente del reactivo para formar un complejo de Sandwich (1 paso). También el analito puede quedar entre la fase sólida a la que viene adsorbido y el anticuerpo específico proveniente de la muestra problema (2 pasos). En la figura 5.2 se esquematiza la reacción del ensayo tipo sandwich.

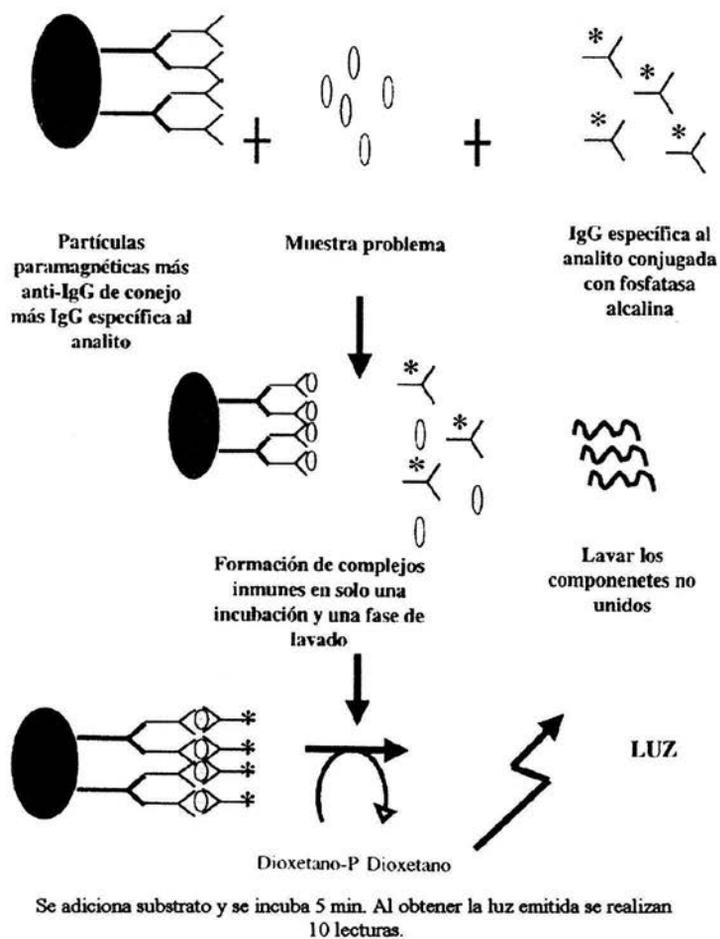
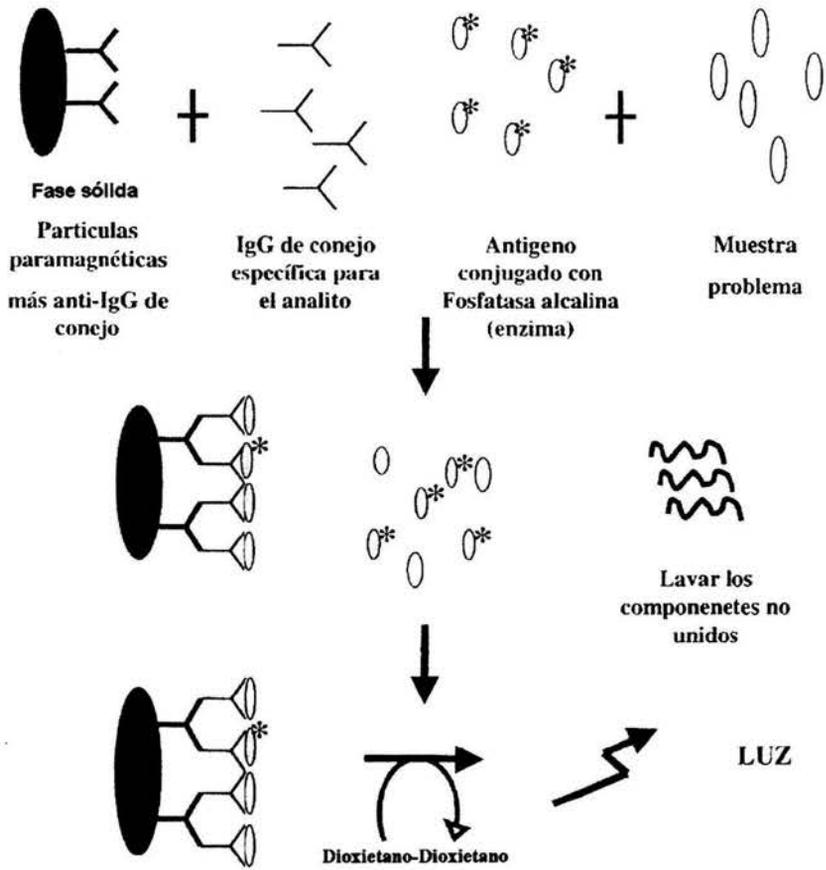


Figura 5.1 Esquema que representa la reacción en el ensayo de tipo competitivo. (78)



Se adiciona sustrato y se incuba 5 min. De la luz emitida se realizan 10 lecturas

Figura 5.2 Ensayo tipo Sandwich (1 paso) <sup>(76)</sup>

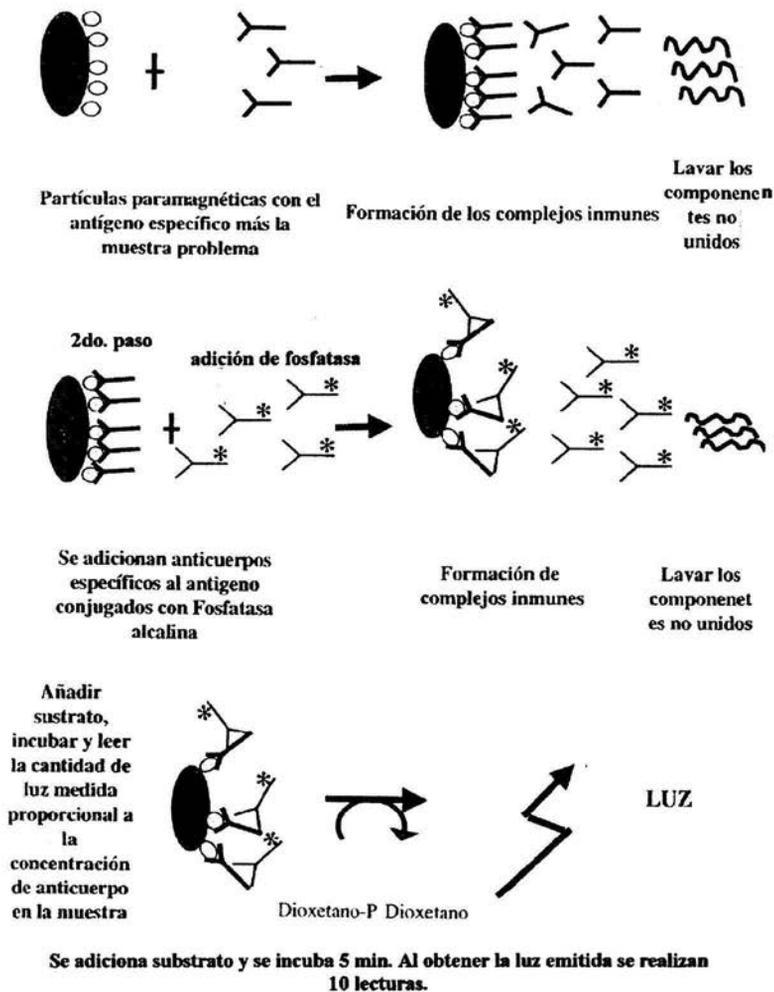


Figura 5.3 Ensayo tipo sandwich (2 pasos) <sup>(76)</sup>

La cTnI puede ser medida y el resultado emitido en un tiempo de 15 minutos. Este ensayo demuestra un desarrollo analítico aceptable con base en los datos de límite de

detección y límite de cuantificación, imprecisión, y recuperación de cTnI además de que es un ensayo que se puede comparar para el diagnóstico con otras pruebas como la masa de CK-MB. Este ensayo utiliza un valor de corte de 0.15  $\mu\text{g/L}$  para diagnosticar IAM<sup>(74)</sup>. (Figura 5.4)

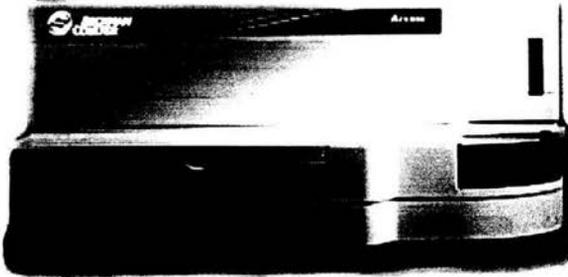


Figura 5.4 Equipo de Inmunoensayo ACCESS® de Beckman Coulter. <sup>(77)</sup>

### 5.5.2 SISTEMA STRATUS II®

Este sistema es un inmunoensayo de dos sitios (sandwich) que también utiliza anticuerpos monoclonales. El resultado es emitido en un tiempo de 10 minutos a diferencia del sistema ACCESS. El límite mínimo de detección es de 0.35  $\mu\text{g/L}$ , y el valor de corte para diagnosticar IAM es de 1.5  $\mu\text{g/L}$ . <sup>(74)</sup> (Figura 5.5)

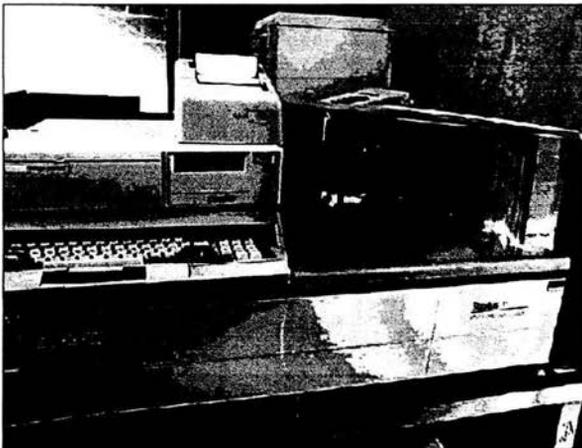
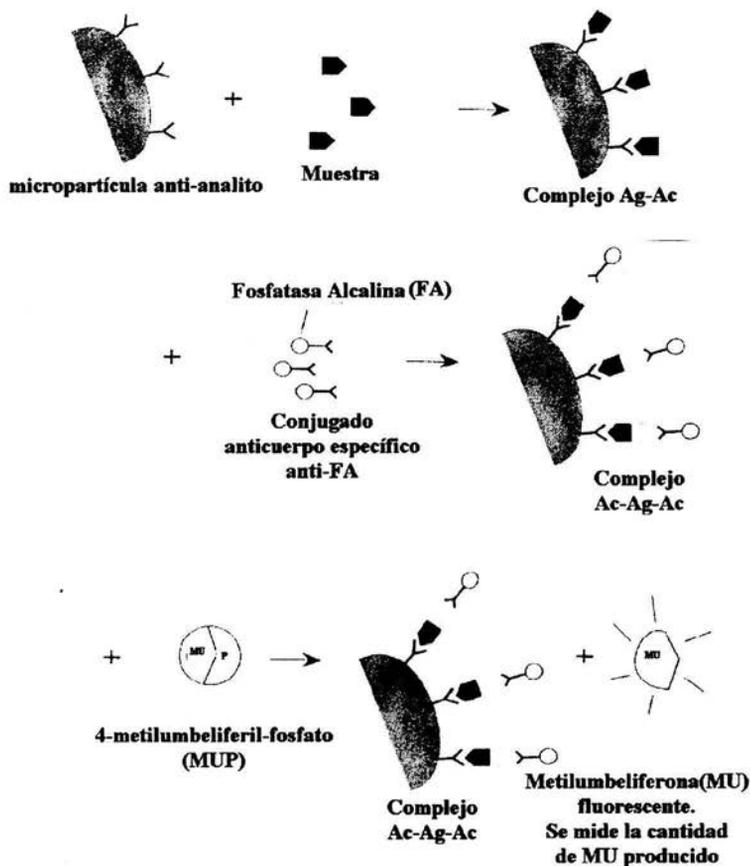


Figura 5.5 Sistema de Inmunoensayo Stratus II ® de Dade Behring <sup>(78)</sup>

### 5.5.3 SISTEMA AxSYM™

Este ensayo se basa en 3 diferentes tecnologías, la tecnología de inmunoensayo enzimático con micropartículas (MEIA), inmunoensayo de polarización y fluorescencia (FPIA) y la tecnología de atenuación de energía radiante (REA) <sup>(79)</sup> y hace la determinación cuantitativa de cTnI tanto en suero como en plasma humanos. La tecnología MEIA utiliza una solución de partículas de látex suspendidas de tamaños menores a una micra. Estas partículas están recubiertas con una molécula de captura específica para el analito (cTnI). El área de superficie efectiva de las micropartículas incrementa la cinética del ensayo y disminuye el tiempo de incubación para el ensayo. Esto permite que los ensayos MEIA se completen en menos tiempo que otros inmunoensayos. Existen dos tipos de secuencias de reacciones para los ensayos tipo MEIA: de un paso, en donde la muestra, las micropartículas y el conjugado se combinan durante la incubación de la cubeta de la reacción; y de dos pasos, en donde la muestra y las micropartículas se combinan durante la incubación de la cubeta de reacción y la reacción de conjugación se lleva a cabo en la celda matriz. En la figura 5.6 se esquematiza la secuencia típica de reacciones en el ensayo MEIA. La tasa de formación de producto fluorescente es directamente proporcional a la cantidad de cTnI presente <sup>(71)</sup>.



**Figura 5.6** Secuencia de reacciones del ensayo MEIA. 1) La muestra y las micropartículas se combinan e incuban a temperatura de reacción. Durante la incubación los analitos se unen a las micropartículas creándose un complejo Inmune. 2) La sonda de procesamiento del equipo aspira la mezcla de reacción del pozo de incubación y lo sirve en la celda matriz. El complejo inmune se une irreversiblemente a la fibra de vidrio de la matriz. El lavado de la celda matriz remueve los materiales que no se unieron. El complejo inmune es retenido por la fibra de vidrio mientras el exceso de la mezcla de reacción fluye rápidamente a través de los grandes poros de la matriz. 3) La sonda de procesamiento transfiere un conjugado de fosfatasa alcalina (FA) marcada desde un pozo de reacción en la cubeta de reacción hacia la celda matriz. El conjugado se une al complejo inmune para completar el "sandwich" Ac-Analito-conjugado. La matriz es lavada nuevamente. 4) El dispensador de solución MUP agrega el sustrato MUP a la celda matriz. El conjugado FA cataliza la hidrólisis del MUP a MU. 5) El sistema óptico de MEIA mide la velocidad a la cual el MU, un producto fluorescente, es generado en la fibra de vidrio de la matriz. La velocidad a la cual se genera el MU en la matriz es proporcional a la concentración de analito en la muestra evaluada.

La tecnología FPIA combina dos tecnologías para determinar la concentración del analito. La unión competitiva de la proteína y la polarización fluorescente. La unión competitiva requiere de dos sistemas de antígenos (analitos): analito de la muestra y analito marcado que proveen los reactivos del ensayo. El analito de la muestra compite con el analito del reactivo por los sitios de unión en el anticuerpo. Cada sistema de analitos se une a los sitios de unión basándose en su concentración relativa. Si hay altas concentraciones de analito presente en la muestra, entonces más analito se une al anticuerpo, impidiendo que el analito marcado se una. Si hay bajas concentraciones de analito en la muestra entonces menos de este analito se une al anticuerpo dejando que el analito marcado se una al anticuerpo. La tecnología FPIA se basa en los siguientes principios: la luz polarizada se puede usar para producir una emisión fluorescente de las trazas de analito. El promedio de polarización de la fluorescencia emitida esta relacionada con la velocidad de rotación de la molécula. La velocidad de la rotación molecular en el líquido esta relacionada con el tamaño de la molécula. Los analitos pequeños que no están unidos rotan más rápidamente que el complejo analito-Ac mas grande. Este sistema AxSYM mide los cambios en la polarización de la fluorescencia emitida mientras se forma el complejo analito-Ac <sup>(79)</sup>

El tercer sistema REA involucra reacciones que desarrollan color. La presencia del analito que se mide convierte al cromógeno (tinte sin reaccionar) en un cromóforo ( tinte coloreado). Una sustancia estable fluorescente (fluoróforo) también es incluida en la mezcla de reacción. Las propiedades de absorción de luz del cromóforo producido, genera una disminución de la intensidad de la luz fluorescente medida (atenúa la energía radiante) del fluoróforo. El montaje del sistema óptico FPIA se usa para medir los cambios en la intensidad de la fluorescencia. Los cambios en la intensidad de energía radiante siguen los principios de la ley de Lambert y Beer <sup>(79)</sup>.

Este ensayo tiene una sensibilidad analítica de 0.3 ng/mL y presenta interferencias con sustancias como bilirubina (20 mg/dL), hemoglobina (1000 mg/dL), eritrocitos (0.4% v/v),

colesterol (500 mg/dL), triglicéridos (1000 mg/dL) y proteína total (10 g/dL). El equipo se muestra en la figura 5.7

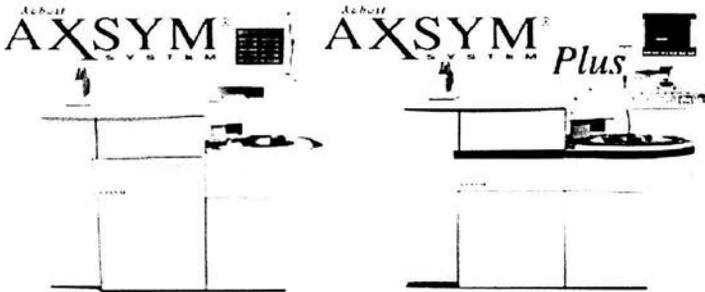


Figura 5.7 Equipo de inmunoensayo AxSym y AxSym Plus de Laboratorios Abbott <sup>(60)</sup>.

#### 5.5.4 SISTEMA OPUS™ PLUS

Este sistema también es un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales que detecta la cTnI y sus isoformas por medio de inmunoensayos heterogéneos de sándwich, es decir de dos sitios. Este sistema tiene un valor mínimo de detección de 0.1 ng/mL, además muestra una precisión aceptable en relación con el Stratus II® y otro método comercialmente disponible que es el Dimension® RxL. La sensibilidad analítica de 0.1 ng/mL y el rango de medición del ensayo de 0.1 a 50 ng/mL permite el análisis directo de la mayoría de los especímenes que se encuentran en el laboratorio clínico. El fabricante recomienda un valor de corte para diagnóstico de IAM de 0.6 a 1.5 ng/mL. En este ensayo los valores que genera una muestra de plasma heparinizado y suero están altamente correlacionados <sup>(61)</sup>. (Figura 5.8)

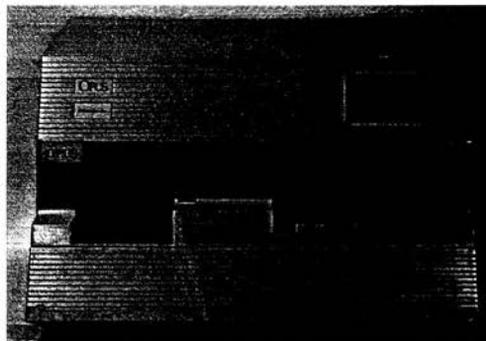


Figura 5.8. Sistema de Inmunoensayo Opus® de Dade Behring <sup>(62)</sup>

Existen muchos mas equipos automatizados con los cuales se pueden realizar pruebas para detección de cTnI en fluidos corporales. En la tabla 5.1 se resumen los métodos que hasta ahora se conocen. <sup>(83)</sup>

Tabla 5.1. Detalles de los ensayos comerciales para troponina cardiaca.

Instrumento (Proveedor)	Tipo de ensayo	Tipo de muestra	Volumen de muestra (µL)	Diferencias Suero/plasma	Conservación de la muestra	Imprecisión %CV (Material de Control)	Sensibilidad (µg/L)	Rango lineal (µg/L)	Calibración	Valores de ref. (µg/L) Percentil 95%	Valor de corte para IAMI	Tiempo del ensayo (min)	Correlación con otros Métodos
AxSYM (Abbott)	MEIA	S, P hep, (heparina de Li o Na); muestra igual si son en serie.	220	No citados	Por 72 h a 2-8°C; 14 días a -10°C.	Intraensayo 3.2 - 6.4; Interensayo 3.9 - 5.2	0.3	50	6 niveles	<0.4	2.0	13	AxSYM = 3.42Stratus -1.09
ACS:180 (Bayer Chiron)	CLIA de 2 sitios	S, P hep.	100	El P hep. da resultados 16% más bajos que los ensayos séricos	Por 4 h a Temp. amb.; 14 h a 2-8°C; congelar si no se va a usar dentro de las prox. 24 h.	Intraensayo 2.8 - 3.9; Interensayo 3.1 - 4.1	0.15	50	Curva patrón	0 - 0.15	1.5	20	No citado
Centaur (Bayer Chiron)	CLIA de 2 sitios	S, P hep.	100	El P hep. da resultados 19% más bajos que los ensayos séricos.	Por 4 h a Temp. amb.; 4 h a 2-8°C; congelar si no se va a usar dentro de las prox. 24 h.	Intraensayo 1.4 - 3.9; Interensayo 1.4 - 4.5	0.03	50	Curva patrón	<0.15	1.5	15	No citado
Access (Beckman Coulter)	EIA (sándwich)	S, P (EDTA)	50	P con EDTA da resultados 12% más bajos que los sueros.	Por 3 h a 2-10°C; 8 meses a -20°C.	Intraensayo 3.0 - 5.8; Interensayos 4.7-6.7	0.03	50	6 niveles	0.06 suero; <0.03 plasma EDTA	0.1	15	No citado
Stratus II (Dade Behring)	IFIA de dos sitios	S, P hep. (heparina de Li o Na)			Por 14 días a 2-8°C; por 8 semanas a -20°C.	Intraensayos 4.7 - 10.1; Interensayos 5.8 - 11.1	0.35	50	6 niveles	0 - 0.60	1.5	10	No citado
Stratus CS (Dade Behring)	SRPIA	ST o P con heparina de Na	2 mL (ST) 90 µL (P)	Plasma hep. da resultados 30% más bajos que en ensayo con Suero	Conservar solo por 2 h	Intraensayos: 4.3 - 2.7; Interensayos: 5.1 - 3.4	0.03	50	Curva patrón	0.00 - 0.06	0.6 - 1.5	13	CS = 0.90 Stratus II + 0.12
Opus Plus (Dade Behring)	Inmuno-ensayo de 2 sitios	S (de preferencia)	40 pero se requiere en mínimo 130 en la copa		Por 24 h a 2-8°C; en otros casos congelar	Intraensayos: 4.6 - 12.0; Interensayos: 5.3 - 13.6	0.5	150	8 puntos	(percentil 97.5%)	1.0	20	No citado
DIMENSION RbL (Dade Behring)	EIA de un paso	S, P	60		Por 14 días a 2-8°C; por 8 semanas a -20°C	Intraensayos: 2.2 - 4.3; Interensayos: 3.6 - 9.4	<0.04	50	5 puntos	0 - 0.05	1.5	10	RbL = 1.10 Stratus II - 0.075
Immolute (Euro-DPC)	CLIA de dos sitios en fase sólida	S, P (Heparina, EDTA)	50	P (con heparina o EDTA) da resultados más bajos que con S.	Por 5 días a 2-8°C; 1 mes a -20°C	Intraensayos: 2.7 - 5.8; Interensayos: 6.1 - 8.4	0.1	180	Curva patrón	< 1.0 (Percentil 98)	No citado	40	No citado
Roche	ECLIA	S o P con EDTA, no se recomiendan muestras heparinizadas	15		Por 24 h a 2-8°C; por 12 meses a -20°C	intraensayos: 3.0 - 4.2; Interensayos: 6.0 - 9.3	0.01	25	Curva patrón	0.0 - 0.037 (percentil 99)	0.1	9 o 18	No citado

Instrumento (Proveed or)	Tipo de ensayo	Tipo de Muestra	Volumen de0 Muestra (µL)	Diferencias Suero/plasma	Conservación de la muestra	Impresión %C.V (Material de Control)	Sensibilidad (µg/L)	Rango lineal (µg/L)	Calibración	Valores de ref. (µg/L) Percentil 95%	Valor de corte para IAM	Tiempo del ensayo (min)	Correlación con otros Métodos
Roche	GLORIA de tercera generación	ST c/hep.	150	No citado	8 h a Temp. Amb; no refrigerar o congelar	Dato no conocido	0.1	20	Curva patrón específica para cada lote	No citado	0.1	14	No citado
Biosite	FIA	ST o P (Heparina de Na o Li)	Transferir el volumen de la pipeta; no hay un volumen establecido	No citado	ST durante 24 h y el P a -20°C hasta ser utilizados	Interensayos: 9.13 - 19.38	0.19	50	Curva patrón específica para cada lote	0 - 0.19	0.4	No citado	No citado
Spectral Diagnostics Inc.	SPCIA	ST o P con heparina de Li; S	200		ST por 4 h; Plasma por 24 horas a 2-8°C; por mas de 24 horas a -20°C.	Resultados cualitativos	1.5	No citado	No establecida	< 1.5	> 1.5	15	No citado

MEIA = Inmunoensayo enzimático con micropartículas

CLIA = Inmunoensayo con quimioluminiscencia

ECLIA = Inmunoensayo con electroquimioluminiscencia

EIA = Inmunoensayo enzimático

FIA = Inmunoensayo con fluorescencia

SRPIA = Inmunoensayo de partición radial sólida

SPCIA = Inmunoensayo cromatográfico en fase sólida

GLORIA = Inmunoensayo de lectura óptica de marcación con oro

S = Suero

ST = Sangre total

P = Plasma

## 6. DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo hemos encontrado información muy valiosa respecto a la estructura de las troponinas, su papel en la contracción de músculo esquelético y cardíaco, su degradación posterior a la necrosis celular del miocardio y como pueden ser utilizadas como marcadores de daño cardíaco, así como de los métodos que pueden ser utilizados para su cuantificación. En esta última sección vamos a recapitular los puntos más importantes para poder concluir si se cumplieron los objetivos de este trabajo.

Sabemos que en el campo de los marcadores bioquímicos de daño miocárdico encontramos una gran cantidad de enzimas y otras proteínas, pero también sabemos que cada una posee diferentes características con respecto a la velocidad de aparición en sangre, la facilidad para detectar concentraciones bajas que indiquen un daño, y simplemente, el hecho de encontrarlas en los fluidos corporales como suero y plasma ya nos indica de primera instancia que existe algún tipo de daño cardíaco. Para los pacientes con un mecanismo de daño isquémico con incrementos en las concentraciones de troponinas I y T, el pronóstico del daño está relacionado, en parte, con la extensión de los incrementos. Las troponinas I y T son los marcadores preferidos para el diagnóstico de daño miocárdico debido a la hasta ahora lograda especificidad de tejido en comparación con CK-MB y otros marcadores convencionales.

La mayor parte de la cTnT y de la cTnI se encuentra en el aparato contráctil y ambas son liberadas como resultado de una degradación proteolítica. Entre el 6 y 8 % de cTnT y entre 2.8 y 8.3 % de cTnI se encuentran en forma libre en el citoplasma. Ya que los estudios de estas proteínas se han realizado en órganos de donadores, en tejidos post-mortem y en tejido atrial, no se conoce la cantidad exacta de cTnT y cTnI. Al ocurrir la isquemia, se produce rompimiento de las proteínas contráctiles intracelulares y estas pueden contribuir con el incremento de la concentración en el pool citoplasmático. No se ha establecido si este

componente del citoplasma es liberado en el compartimiento extracelular, durante la isquemia o bien posterior a la necrosis celular.

La cinética de liberación de la cTnT es bifásica, con un pico inicial a las 12 horas posterior al daño, seguida de una fase de meseta de aproximadamente 48 horas y por último cae hasta niveles no detectables a los 10 días de ocurrido el evento. La duración de la elevación está determinada por el tamaño del infarto: en casos de IAM pequeños, la elevación ocurre por 7 días y en IAM total la cTnT puede ser detectada hasta por 21 días. El tiempo en el que aparece el primer pico, así como su magnitud depende de si la causa es una reperfusión exitosa espontánea o es producto de una terapia trombolítica. En la reperfusión exitosa se produce un pico más grande, el cual aparece en forma más temprana.

La liberación de troponina I es monofásica, hay pérdida del pico temprano y el pool del citoplasma es pequeño. Sin embargo se ha encontrado en la práctica que hay una elevación temprana de cTnI con cTnT, aunque no de la misma magnitud. La duración de la elevación de cTnI típicamente es de 5 días, pero de nuevo hay variación dependiendo del tamaño del infarto.

La depuración de cTnT y cTnI no se encuentra bien documentada. El  $t_{1/2}$  para cTnT en circulación es de 120 minutos y la ventana prolongada para la detección es debida a la continua liberación de cTnT desde el pool de las miofibrillas hasta el aparato contráctil que dentro de las células sufre degradación. No existen datos sobre la depuración de cTnI.

Quizá hace falta hacer una reflexión a cerca de porque elegir la troponina I y no la troponina T: desde un punto de vista molecular se sabe que la TnI ocupa una posición central en el mecanismo molecular involucrado en el control de la contracción muscular. Tiene el papel principal en la unión entre el complejo de la troponina y las proteínas contráctiles y como tal en ella convergen los cambios conformacionales que resultan de la unión del calcio a la cTnC en el sitio enzimático en la cabeza de miosina donde se hidroliza la unión de Mg-ATP. Este papel único requiere que la troponina I interactúe directamente con cada una de las proteínas que participan en este proceso, directamente con la actina, TnT e indirectamente con la

tropomiosina y miosina y su estructura aparentemente flexible y extendida es importante en su papel, y por todo esto cuando se encuentran concentraciones de troponina I en plasma o suero podemos hablar de un daño presente de gran importancia. Recientemente se ha sugerido que la especificidad de la cTnI para detectar un daño miocárdico es mayor que la especificidad de la cTnT y es difícil encontrar incrementos falsos positivos de cTnI en pacientes con daño de músculo esquelético o en pacientes que realizaron ejercicio excesivo. Además la cTnI provee de información que sirve para hacer un pronóstico temprano para la identificación de pacientes con un riesgo incrementado de muerte posterior a IAM.

En un estudio en serie que utilizó 196 combinaciones pareada de 15 anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes regiones de la molécula de cTnI, Katrukha estudio la liberación y degradación de cTnI. Se demostró en este estudio que la forma dominante de cTnI liberada después del IAM es el complejo cTnI-TnC. La cantidad máxima de cTnI total es de 5 a 12 veces la cantidad de cTnI libre. También se encontró que las regiones N y C terminal son vulnerables a la degradación proteolítica. La región más estable es la parte central de la molécula y comprende de los residuos 30 a 110. Esta región tiene un dominio que une TnC dependiente de calcio.

Por estudios comparativos se ha demostrado marcada diferencia en los ensayos de cTnI. Los factores que afectan en forma rutinaria son:

- 1.- Desarrollo de la expresión de epítopes y reexpresión.
- 2.- Calibración del ensayo.
- 3.- Requerimientos de la muestra.
- 4.- Efectos de la matriz.
- 5.- Estabilidad del epítope.
- 6.- Reconocimiento diferencial de epítopes e impedimento estérico.
- 7.- Especificidad del ensayo: falso positivo y falso negativo.

Como cTnI es expresada únicamente en el miocardio, este marcador teóricamente ofrece menos problemas. La expresión temprana de sTnI en lugar de cTnI en el miocardio hace que la medición de cTnI no sea útil para la evaluación de daño cardíaco neonatal y perinatal. Respecto a cTnT, hay una secuencia única en el adulto. Los anticuerpos M7 reconocen los residuos 125-131 de cTnT y el anticuerpo M11.7 reconoce la secuencia de 136-147 y estas corresponden a secuencias cardiospecíficas sin homología con TnTf. Esto esta acorde con los hallazgos de que las elevaciones de cTnT y cTnI en daño renal representan daño miocelular verdadero con significancia pronóstica.

En relación a la calibración de los ensayos la información de las empresas productoras de los materiales de calibración es muy variable. El material de calibración óptimo que se recomienda es el complejo TIC derivado de tejido cardíaco.

Tomando en cuenta las características de la muestra para cada ensayo, la muestra óptima parece ser suero, pero hay problemas debido a microcoágulos de fibrina o micropartículas, usualmente agregados de lipoproteínas. Las muestras de plasma obtenidas con EDTA pueden ser usadas en la minoría de los sistemas de ensayo. El efecto del EDTA parece ser mínimo en ensayos para cTnT pero este efecto es más grande y variable para los ensayos de cTnI. El impacto del EDTA es debido al secuestro del calcio que altera la unión de TnC y cTnI. La molécula de cTnI esta cargada positivamente ( $pI=9.87$ ) por lo que puede unirse a la heparina, un polianión cargado negativamente.

Por otro lado la molécula de cTnT parece ser muy estable a temperatura ambiente, a  $4^{\circ}$  C y en congelación. Las muestras que se han reanalizado después de un período largo de tiempo de hasta 5 años a  $-70^{\circ}$  C, no muestran degradación significativa y no hay cambios significativos por 5 ciclos de congelación.

Para cTnI, la mayoría de los ensayos tiene seleccionados epítopes en la región estable de 30-110 residuos de aminoácidos. Esto es cierto para el caso de Stratus CS, RxL, Opus Plus,

Immulite, ACS:180 (región N terminal de los residuos 27-39 y residuos 70-87) y AxSYM (residuos 87-91 y 20-39).

Como se expuso en capítulos anteriores , la fosforilación es parte de la regulación de la función del complejo troponina - tropomiosina y puede provocar cambios conformacionales. No se conoce si esto ocurre *in vitro* o tiene impacto en los resultados de los ensayos. También hay sitios potenciales de oxidación de grupos SH que inducen cambios conformacionales *in vitro*. Se sabe que esto afecta los resultados de algunos de los sistemas de ensayo disponibles.

Respecto a la sensibilidad y especificidad de cTn para mionecrosis, se ha detectado daño cardíaco en una serie de situaciones clínicas no esperadas. Esto ha provocado que la cardioespecificidad de cTn sea cuestionada. Hay 2 importantes hallazgos que confirman la validez de las mediciones de cTn como marcadores verdaderos de daño cardíaco. Primero la elevación no esperada de cTnI en una población de pacientes de la unidad de cuidados intensivos que se asocia con un pronóstico adverso. Segundo , la correlación de los hallazgos histopatológicos con los resultados bioquímicos demuestran que los valores de cTnT elevados pueden ser relacionados directamente con mionecrosis cardíaca.

Los hallazgos que relacionan elevaciones de cTnT y cTnI con pronóstico adverso han dado lugar a considerar que la medición de cTn puede ser considerada como un marcador de ruptura de placa. La secuencia de eventos es que la ruptura de la placa con cicatrización intraplaca es seguida por formación de un agregado inestable de plaquetas sobre la placa. Hay 2 posibles eventos subsecuentes. Puede haber placas que cicatricen o puede haber agregación progresiva de plaquetas y fragmentación que producen embolia por plaquetas y posteriormente microinfartos, esto sugiere que debe haber 2 valores de corte , uno para el IAM y un segundo valor de corte para la angina inestable de alto riesgo.

Aunque hay quienes utilizan a la cTnT como el biomarcador de preferencia, creemos que existe suficiente evidencia para elegir a la cTnI como el marcador de elección del daño

miocárdico, pero a final de cuentas dependerá del costo y de la disponibilidad de los equipos para realizar las pruebas concernientes a estos biomarcadores.

## 7. CONCLUSIONES

A través de la realización de este trabajo hemos podido concluir los siguientes puntos:

1. Aunque hay una vasta información acerca de las troponinas, aún es necesario hacer estudios que nos ayuden a determinar: a) el T<sub>1/2</sub> de la troponina I en suero y b) la cinética de liberación de la cTnI, ya que no está bien establecida la fuente de esta proteína, es decir, si es liberada durante la isquemia, la necrosis celular o bien desde el pool citoplasmático.
2. Es importante conocer la estructura molecular de las troponinas ya que esta información es necesaria para: a) el desarrollo de los ensayos, que requieren conocimientos de la expresión, estabilidad e impedimento estérico de los epítopes; b) los requerimientos de la muestra y c) los efectos de la matriz.
3. Basándonos en los dos puntos anteriores se podrán establecer los valores de corte de la concentración de cTnI en 2 casos: a) IAM y b) Angina Inestable de alto riesgo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Wu AHB. Biochemical markers of cardiac damage: from traditional enzymes to Cardiac-specific proteins. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59 (Suppl 230): 74-82R.
2. <http://www.infomedonline.com.ve/CONSOCIE/IIIencuentro/pcardiolo.htm>
3. Karmen A, Wroblewski F, LaDue JS. Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1954; 34: 126-133
4. Wroblewski F, LaDue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exper Biol Med* 1955; 90: 210-213
5. Dreyfus JC, Schapira G, Resnais J, Scebat L. La creatine kinase serique dans le dianostic de l'infarctus myocardique. *Rev Franc Etud Clin et Biol.* 1960; 5: 386-411.
6. Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J* 1955; 61: 116-122.
7. Rosalki SB. An improved procedures for serum creatine phosphokinase determination. *J Lab Clin Med* 1967; 69:696-705.
8. Horder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. International federation of clinical chemistry, scientific division committee on enzymes: approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2).*Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 435-56.
9. Adams JE III; Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical Markers of myocardial injury. Is MB Creatine Kinase the choice for the 1990s?. *Circulation* 1993; 88 (2): 750-763.
10. Bhayana V, Henderson AR. Biochemical Markers of Myocardial damage. *Clin Biochem* 1995; 28 (1) : 1-29.
11. Stone MJ, Willerson JT, Gomez-Sanchez CE, Waterman MR. Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 1975; 56: 1337-1339.
12. Wu AHB, Laios I, Green S, Gomet TG, Wong SS, Parmaley L, Thonnesen A, Plaisier B, Orlando R. Immunoassays for serum and urine myoglobin: myoglobin clearanse assessed as a risk factor for acute renal failure. *Clin Chem* 1994; 40: 795-802.
13. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermier K, Scheffold T, Kubler W. Enzyme linked immunoassay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *L Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 2203-2214.

14. Wu AHB. Role of serum biochemical markers in clinical trials. In: Myocardial damage. Early detection by novel biochemical markers. Eds. Kaski JC, Holt DW, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1998, pp. 189-199.
15. Hamm CW, Ravkilde J, gerhardt W, Jorgensen P, Peheim E, Ljungdahl L. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med* 1992; 327: 146-150.
16. Collison PO, John C, Cramp DG, Canepa-Anson R. Prospective randomized controlled trial of point of care testing with central laboratory testing for cardiac enzyme measurement. (abstract). *Clin Chem* 1998; 44:A69.
17. Coudrey L, MD. The troponins. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1173-1180.
18. Dean KJ. Biochemistry and molecular biology of troponin I and T. In: Cardiac markers. Ed. Wu AHB, Humana, Totowa NJ, 1998. 193-204.
19. Gerhardt W, Ljungdahl L. Troponin T: a sensitive and specific diagnosis and prognostic marker of myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 47-57.
20. Wu AHB. Analytical and clinical evaluation of new diagnostic tests for myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 11-21.
21. Brounwald E, MD, Sonnenblick EH, MD, Ross J, MD, " Tratado de cardiología"; 4ª Ed. Vol. 1, Medicina cardiovascular; Parte II, Función Circulatoria Normal y Anormal; Cap 13 Mecanismos de contracción y relajación cardiacas. 1993, Ed. Interamericana McGraw Hill P.P 391-404.
22. <http://www.med.unibs.it/~marchesi/muscle.html>
23. Rayment I, Rypniewski W, Schimidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 1993; 261:50-58.
24. <http://www.ucr.ac.cr/~gacetapc/TROPONIN.HTM>
25. Malhotra A. Role of regulatory proteins (troponin - tropomyosin) in pathologic states. *Mol Cell Biochem* 1994; 135:43-50.
26. Perry SV. Troponin I: Inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem* 1999; 190: 9-32.
27. Hastings KEM. Molecular evolution of the vertebrate troponin I gene family. *Gene: structure and function* 1997; 22: 205-211.
28. Holmes KC. The actomyosin interaction and its control by tropomyosin. *Biophys J.* 1995; 68: 2s-7s.
29. Chalovich JM, Chock PB, Eisenberg E. Mechanism of action of troponin \* tropomyosin. Inhibition of actomyosin ATPase activity without inhibition of myosin binding to actin. *J Biol Chem* 1981; 256(2): 575-578.

30. Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. **Science** 1993; 261: 58-65.
31. Borejdo AJ, Interaction of the heavy and light chains of cardiac myosin subfragment-1 with F-actin. **Circ Res.**1997; 81: 688-693.
32. Hibberd MG, Trentham DR. Relationship between chemical and mechanical events during muscular contraction. **Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.** 1986; 15: 119-161.
33. Farah CS, Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. **FASEB J.** 1995 ; 9: 755-767.
34. S. Sideman and R. Beyar, "Molecular and Subcellular Cardiology: Effects of structure and function"; Chapter 12, Troponin C – Troponin I interactions and molecular signalling in cardiac myofilaments, by R. John Solaro; Plenum Press, New York, 1995. p.p. 109-115.
35. Westfall M, Metzger JM. Troponin I isoforms and Chimeras: Tuning the molecular Switch of Cardiac Contraction. **News Physiol Sci** 2001; 16: 278-281.
36. Tao T, Gong B-J, Leavis PC. Calcium-induced movement of troponin-I relative to actin in skeletal muscle thin filaments. **Science** 1990; 247: 1339-1341.
37. Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M. Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. **Circulation** 1999; 99: 505-510.
38. Chandra M, Dong W-L, Pan B-S, Cheung HC, Solaro RJ. Effect of protein kinase A phosphorylation between cardiac troponin I and the N-terminal Domain of cardiac troponin C. **Biochemistry** 1997; 36: 13305-13311.
39. Zhang R, Zhao J-J, Potter JD. Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca<sup>2+</sup> affinity of cardiac troponin C. **J Biol Chem.** 1995; 270 (51): 30773-30780.
40. Solaro J, Rarick HM. Troponin and Tropomyosin. Proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. **Circ Res.** 1998 ; 83:471-480.
41. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. **Circ Res.** 1995; 76: 1036-1048.
42. Zarco G. P., "Bases Moleculares de la Cardiología Clínica", Editorial Médica Panamericana, Madrid 1996.
43. [http://www.gtcv.org/info\\_juanatey.htm](http://www.gtcv.org/info_juanatey.htm)
44. Braunwald E. MD. Unstable Angina. A classification. **Circulation** 1989; 80(2): 410-414.

45. <http://www.medicos.sa.cr/actamed/n7/sindrome.htm>
46. Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Pettersson K, Lövgren T, Severina ME, Pulkki K, Vuopio-Pulkki LM, Gusev NB. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as a complex. *Clin Chem* 1997; 43(8):1379-1385.
47. Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, Esakova TV, Kolosova OV, Pettersson K, Lövgren T, Bulargina TV, Trifonov IR, Gratsiansky NA, Pulkki K, Voipio Pulkki LM, Gusev NB. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin Chem* 1998;44(12): 2433-2440.
48. Wu AHB, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998; 44(6): 1198-1208.
49. Katrukha A, Bereznikova A, Pettersson K. New approach to standardisation of human cardiac troponin I (cTnI). *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59 (Suppl 230): 124-127.
50. Wu AHB. A comparison of cardiac troponin T and cardiac troponin I in patients with acute coronary syndromes. *Coronary Artery Dis* 1999; 10:69-74.
51. Bertinchant JP, Larue C, Pemel I, Ledermann B, Fabbro-Peray P, Beck L, Calzolari C, Trinquier S, Nigond J, Pau B. Release kinetics of serum cardiac troponin I in ischemic myocardial injury. *Clin Biochem* 1996; 29(6): 587-594.
52. McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1999; 84: 9-20.
53. Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia/reperfusion in rat hearts. Identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res* 1998; 82: 261-271.
54. Antman EM. Troponin measurements in Ischemic heart disease: more than just a black and white picture. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38 (4): 987-990.
55. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. It's time for a change for a troponin standard. *Circulation* 2000; 102: 1216-1220. ( Editorial ).
56. Noe Dennis A., M.D., Rock Robert C., M.D., "Laboratory Medicine", Williams & Wilkins, U.S.A. 1994, Capitulo 17, p. 297.
57. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW. Et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST segment elevation Myocardial Infarction:Executive Summary and Recommendations. A report of the American College of Cardiology/American

- Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of patients with Unstable Angina). *Circulation* 2000; 102:1193-1209.
58. Lucia P, Coppola A, Manetti LL, Sebastián ML, Colliardo A, Cerroni F, De Martinis C, Strappini PM. Cardiac troponin I in acute coronary ischemic syndromes. Epidemiological and clinical correlates. *I J Cardiol* 2001; 77: 215-222.
  59. Hamm CW, Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. *Circulation* 2002 ; 106: 2871-2872.
  60. Müller-Bardoff M, Weidtmann B, Giannitsis E, Kurowski V, Katus HA. Release kinetics of cardiac troponin T in survivors of confirmed severe pulmonary embolism. *Clin Chem* 2002; 48 (4): 673-675.
  61. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 1997; 95 (1): 163-168.
  62. Apple FS, Murakami MAM, Pearce LA, Herzog CA. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation* 2002: 106 : 2941-2945.
  63. Aviles RJ, Askari AT, Lindhal B, Wallentin L, Jia G, Ohman M, Mahaffey KW, Newby LK, Califf RM, Simoons ML, Topol EJ, Lauer MS. Troponin T levels in patients with acute coronary syndromes, with or without renal dysfunction. *N Engl J Med* 2002; 346 (26) 2047-2052.
  64. Ishii J, Nomura M, Okuma T, Minagawa T, Naruse H, Mori Y, Ishikawa T, Kurokawa H, Hirano T, Kondo T, Nagamura Y, Ezaki K, Hishida H. Risk stratification using serum concentrations of cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease on chronic maintenance dialysis. *Clin Chim Acta* 2001;312: 69-79.
  65. Del Rey JM, Madrid AH, Novo L, Sánchez A, Martín J, Rubí J, Pallarés E, Kais J, Villa BG, Manzano JG, Silvestre I, Jiménez A, Ripoll E, Moro C. Evaluación de marcadores de lesión miocárdica tras la ablación con radiofrecuencia. Utilidad de la troponina I. *Rev Esp Cardio* 1997; 50 (8): 552-560.
  66. Fuchs S, Koenowski R, Mehran R, Lansky AJ, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Clark CE, Stone GW, Leon MB. Prognostic value of cardiac troponin I levels following catheter-based coronary interventions. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1077-1082.
  67. Carlson RJ, Vavone A, McConell JP, Buritt M, Castle MC, Grill D, Jaffe AS. Effect of myocardial ischemia on cardiac Troponin I and T. *Am J Cardiol* 2002; 89: 224-226
  68. Panteghini M. Present Issues in the determination of Troponins and Other Markers of Cardiac Damage. *Clin Biochem* 2000, 33 (3): 161-166.

69. Christenson RH, Duh SH, Apple FS, Bodor GS, Bunk DM, Dalluge J, Panteghini M, Potter JD, Welch MJ, Wu AHB, Kahn SE. Standardization of Cardiac Troponin I Assays: Round Robin of Ten Candidate Reference Materials. *Clin Chem* 2001; 47(3): 431-437.
70. Wu AHB, Apple FS, Gibler WB, Jesse R, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: Recommendations for the use of Cardiac Markers in Coronary Artery Diseases. *Clin Chem* 1999; 45(7):1104-1121.
71. Laboratorios Abbott. Folleto del ensayo AxSYM® Troponina I Es, B3C293 utilizado en el Laboratorio de Química del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"
72. <http://www.acclc.es/invitroveritas/vol2/art31.html>
73. Wenk RE. Mechanism of Interference by hemolysis in Immunoassays and Requirements for Sample Quality. *Clin Chem* 1998; 44(12): 2554. (Letter).
74. Christenson RH, Apple FS, Morgan DL, Alonsozana GL, Mascotti K, Olson M, McCormack RT, Wians FH Jr, Keffer JH, Duh SH. Cardiac troponin I measurement with the ACCESS® immunoassay system: analytical and clinical performance characteristics. *Clin Chem* 1998; 44(1):52-60.
75. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Landenson JH. Development of Monoclonal Antibodies for an Assay of Cardiac Troponin I and Preliminary Results in Suspected Cases of Myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 38(11): 2203-2214.
76. Beckman Coulter Instruments. Manual de operación para sistema de inmunoensayo ACCESS®.
77. <http://www.beckman.com/products/instrument/immunoassay/access.asp>
78. <http://www.labtrader.com/newSite/detail.php>
79. ABBOTT AxSYM® SYSTEM operations manual Volume 1. 66-6747/R3-February 1996.
80. <http://www.abbottdiagnostics.com>
81. Sanhai WR, Romero LF, Hickey G, Ruttle D, Christenson RH. Performance characteristics of a revised cardiac Troponin I assay for the Opus™ plus immunoassay system. *Clin Biochem* 2001; 34: 579-582.
82. <http://www.labx.com/web/rankin1/imagepage.cfm?pic=11682.JPG>
83. Collison PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Ann Clin Biochem* 2001; 38 : 423 – 449.
84. Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. The sensitivity of cardiac markers: an evidence-based approach. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 1097-1106