

Estudio del polimorfismo leu33/pro33 del receptor glicoproteico plaquetario IIIa (PIA) y su relación con la reestenosis postangioplastia coronaria con *stent* en una población argentina

DIEGO D. GRINFELD¹, RICARDO SARMIENTO², CLAUDIO DIZEO³, ALEJANDRO CHERRO⁴, JAVIER SCAGLIA⁵, FERNANDO CARTA⁶, ROBERTO NORDABY⁷, MIGUEL A. RICCIPELLI⁸, ROGELIO MACHADO⁹, ANÍBAL CAMPO¹⁰

RESUMEN

Introducción

En pacientes con el polimorfismo del receptor plaquetario IIIa (PIA2), más en homocigotos PIA2/A2, se observó un porcentaje mayor de reestenosis postangioplastia coronaria con *stent* que en los pacientes PIA1/A1 o normales.

Objetivo

Determinar la presencia del alelo polimórfico PIA2 en pacientes con reestenosis postangioplastia con *stent* en una población argentina; evaluar porcentaje de PIA2/A2 entre los reestenosadores y determinar la penetrancia del alelo polimórfico PIA2 en una población de nuestro país sin antecedentes coronarios.

Métodos

Se evaluaron 45 pacientes, que integraron tres poblaciones. Diez sin antecedentes coronarios (9 hombres, 30 ± 5 años). Dieciséis pacientes con angioplastia (13 hombres, 62 ± 11 años) con control angiográfico a los 7 ± 1 mes que no evidenció reestenosis y 19 con reestenosis postangioplastia (16 hombres, 60 ± 12 años). Se consideró reestenosis una lesión mayor del 50% en el reestudio. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en busca de la presencia del alelo PIA2. Se utilizó la prueba de Fischer para comparaciones.

Resultados

De los 19 pacientes reestenosadores, 9 presentaron el alelo A2 (47%); de los 16 pacientes no reestenosadores presentaron el alelo A2 sólo el 13% ($p < 0,04$). De los 10 pacientes sin antecedentes se detectó un solo A2 (10%). Sólo 2 pacientes eran homocigotos A2/A2 y se encontraron en el grupo reestenosador.

Conclusión

La presencia del alelo A2 (PIA1/A2 o PIA2/A2) fue significativamente mayor en los pacientes con reestenosis, lo cual podría ser un predictor de reestenosis postangioplastia con *stent* y su detección previa podría tener implicaciones terapéuticas.

REV ARGENT CARDIOL 2003;71: 425-429.

Recibido: 2/06/03

Aceptado: 28/08/03

Dirección para separatas:

Diego David Grinfeld,

La Rioja 951 (1221)

Buenos Aires, Argentina. E-mail:

diego.grinfeld@hotmail.com.

Telfax: (011) 4959-1695 o

Tel. (0221) 474-1106.

Palabras clave

> Genética - Reestenosis - Polimorfismos

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio del proyecto "Genoma humano", los trabajos científicos para la detección y la prevención de enfermedades en relación con la genética se han incrementado. La cardiología no ha sido una excepción.

Se han detectado muchas alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo de enfermedad coronaria; una de ellas es el polimorfismo PIA2 de las glicoproteínas de membrana plaquetaria IIb-IIIa, más específicamente su fracción IIIa, (1, 2) la cual se ha relacionado con un incremento de la reestenosis postangioplastia trans-

Servicio de Cardiología y Hemodinamia del Hospital Francés de Buenos Aires

¹ Para optar a Miembro Titular SAC

² Residente de 4^o año de Cardiología, Hospital Francés.

³ Jefe de Servicio de Hemodinamia, Hospital Francés.

⁴ Coordinador de la Unidad Coronaria, Hospital Francés.

⁵ Staff de Hemodinamia, Hospital Francés.

⁶ Bioquímico, Master en Ingeniería Genética y Biología Molecular. GeneLab, Laboratorio de Genética y Endocrinología, La Plata.

⁷ Residente de 4^o año de Cardiología Hospital Francés.

⁸ Jefe de Unidad Coronaria, Hospital Francés.

⁹ Jefe de Servicio de Hemodinamia, Hospital Cosme Argerich.

¹⁰ Jefe de Ecocardiografía, Hospital Francés.

¹⁰ Jefe de Servicio de Cardiología. Hospital Francés.

luminal coronaria (ATC) con *stent*, (3, 4) mayor agregación plaquetaria y una respuesta menor a los antiagregantes. (5, 8) El receptor IIb-IIIa es el de mayor expresión en la superficie plaquetaria y el principal responsable de su agregación. El polimorfismo de la subunidad IIIa que intercambia la leucina (leu33) por prolina (pro33) en el aminoácido en posición 33, derivado de la sustitución de una citosina (C) por una timidina (T) en posición 1565 del exón 2 del gen que codifica a este receptor, es el que modifica el antígeno plaquetario PIA1 por PIA2 (9) y es responsable de la mayor afinidad que las plaquetas de estos pacientes tienen por el fibrinógeno y, en consecuencia, su mayor agregación y tendencia a la trombosis. (8-10) En los pacientes portadores del PIA2, sobre todo los homocigotos PIA2/A2 y, en menor medida, los heterocigotos PIA1/A2, se ha observado un porcentaje mayor de reestenosis postangioplastia coronaria (ATC) con *stent* que en los homocigotos PIA1/A1 o "normales" (3, 4) y alteración en la agregación plaquetaria con una respuesta menor a los antiagregantes. Se ha visto una tasa menor de reestenosis en los portadores del polimorfismo PIA2 tratados con abciximab (11) y en aquellos a quienes se les aumentó la dosis de clopidogrel, con escaso aumento de la tendencia al sangrado, pero igualmente con mayor reestenosis que los no portadores. El polimorfismo PIA2 demostró, en algunos estudios, que es una variable independiente de riesgo para reestenosis y no se ha encontrado relación alguna entre éste y los factores de riesgo para reestenosis. (4) Como ya se mencionó, en varios trabajos realizados en los últimos años este polimorfismo se relacionó con mayor agregación plaquetaria, mayor unión al fibrinógeno de estas plaquetas y el consiguiente aumento en la tasa de trombosis. (5, 11)

Teniendo en cuenta que las características genéticas varían en las distintas etnias (12) y se ven influidas por el medio ambiente y considerando además que ninguno de los trabajos realizados presentó pruebas contundentes y definitivas sobre este polimorfismo, se necesita una cantidad mayor de estudios para confirmar los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 45 pacientes, que integraron tres poblaciones. Diez sin antecedentes coronarios (30 ± 5 años, 9 hombres), 16 pacientes con angioplastia con *stent* exitosa (62 ± 11 años, 13 hombres) con control angiográfico a los 7 ± 1 mes que no evidenció reestenosis y 19 con reestenosis *intra**stent* con control angiográfico (60 ± 12 años, 16 hombres). Se consideró reestenosis una lesión mayor del 50% en el reestudio. Se realizó genotipificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en busca de la presencia de homocigotos PIA1/A1, heterocigotos PIA1/A2 y homocigotos PIA2/A2. Los hallazgos angiográficos y de laboratorio fueron ciegos tanto para el genetista como para el cardiólogo intervencionista.

Extracción de ADN: se extrajo ADN de sangre (10 ml), obtenida por punción venosa con EDTA, mediante una lisis de leucocitos con sol TNE buffer, 10 mmol/L Tris Base, 10 mmol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA. Esto se resuspendió en

ABREVIATURAS

ATC	Angioplastia transluminal coronaria
GP	Glicorreceptor plaquetario
Leu33/pro33	Leucina33/prolina33
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Proteína de restricción de longitud de fragmentos

solución de NaCl 75 mmol/L y EDTA 25 mmol/L. Se sometió a proteinasa K durante toda la noche a 65°C, se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y se extrajo el DNA con isopropanol frío. Se retiró el DNA de dicha solución y se resuspendió en solución de TE (0,1 M de Tris y 0,001 M de EDTA, pH 8).

PCR y RFLP (restriction fragment length protein): para identificar el genotipo PIA se utilizaron los siguientes primers: 5' TTAAGATCCTGCTGTTTCTCTT3' y 5' TCTCTCCAACCCCGCAAAGAGT3'. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, luego se realizaron 34 ciclos de 94°C por 60 seg, 57°C por 45 seg y 72°C por 60 seg. Por último se hizo una extensión final de 15 min a 72°C. Se obtuvo así un producto amplificado de 266 pares de bases, el que luego fue digerido con la enzima de restricción MspI. Los genotipos polimórficos de esta digestión se identificaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y revelados con una solución de bromuro de etidio 1 micromolar (Figura 1).

Debido a que la reestenosis *intra**stent* sigue siendo una de las limitaciones de la ATC, considerando los múltiples factores que la determinan, (13, 14) entre ellos factores genéticos, y teniendo en cuenta las variaciones que éstos presentan en las distintas etnias y poblaciones de todo el mundo, es nuestra intención evaluar: a) La presencia del alelo polimórfico PIA2 en pacientes con reestenosis post-ATC

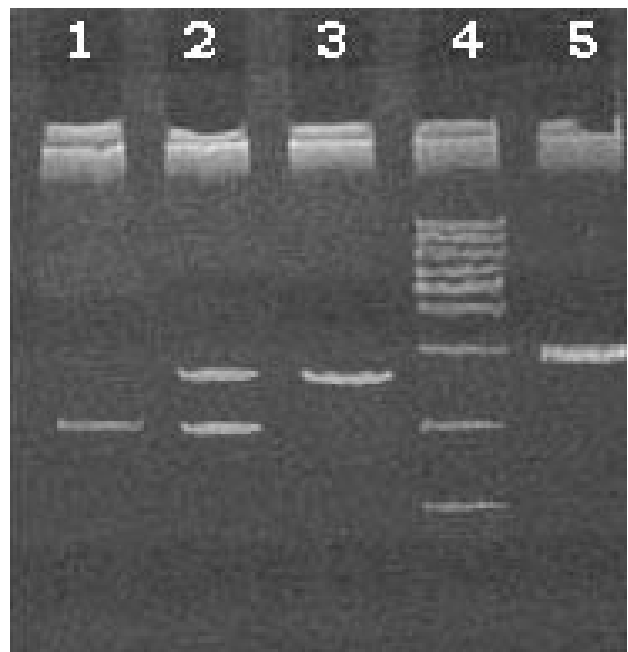


Fig. 1. Gel de agarosa al 1,5% donde se evidencian los alelos polimórficos del PIA.

Calle 1: PIA2/A2; calle 2: PIA1/A2; calle 3: PIA1/A1; calle 4: escalera de 100 pares de bases; calle 5: sin cortar.

con *stent* en una población argentina, b) evaluar si los homocigotos PIA2/A2 se presentan en un porcentaje mayor entre los reestenosadores que los heterocigotos PIA1/A2 y los homocigotos PIA1/A1, c) determinar la penetrancia del alelo polimórfico PIA2 en una población de nuestro país sin antecedentes coronarios.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las variables discretas se evaluaron mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fischer, con dependencia de las características de las muestras, y las variables continuas mediante la prueba de la t de Student. Las relaciones entre reestenosis y la presencia del alelo PIA2, así como el posible efecto de diversas variables clínicas y hemodinámicas se evaluaron con técnicas multivariadas, en particular mediante regresión logística. La significación estadística se aceptará para $p < 0,05$. (15)

RESULTADOS

Entre los 19 pacientes con reestenosis se detectaron 9 con el alelo A2 (47%), mientras que en los 16 pacientes que no habían sufrido reestenosis la prevalencia del A2 fue de sólo el 13% ($p < 0,04$) (Tabla 1). Entre los 10 pacientes sin antecedentes coronarios se detectó un solo A2 (10%) (Figura 3). Sólo 2 pacientes eran homocigotos A2/A2 y se encontraron en el grupo reestenosador.

Los porcentajes de presencia del alelo plaquetario PIA, ya sea en su presentación PIA1/A1, PIA1/A2 y PIA2/A2, son comparables a los obtenidos en la literatura consultada (Figura 4).

La penetrancia de este polimorfismo en la población general, aquí determinada en un grupo de 10 pacientes sin antecedentes coronarios, y en los portadores de enfermedad coronaria fue similar a la encontrada en la bibliografía, lo cual expresa quizá la posibilidad de que se pueda extrapolar a poblaciones mayores.

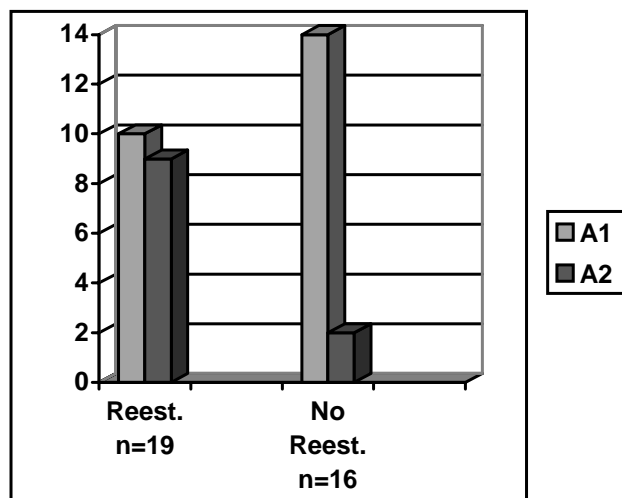


Fig. 2. Relación de PIA2 en reestenosadores (Reest) y no reestenosadores (No reest).

Tabla 1
Resultados*

	Reestenosadores (n = 19)	No reestenosadores (n = 16)	p
A2/A1 (% A2)	9 / 10 (47%)	2 / 16 (13%)	< 0,04
Edad	60 ± 12	62 ± 11	NS
Sexo (M/F)	16 / 3	13 / 3	NS
DA	14 (74%)	10 (63%)	NS
Factores de riesgo (Σ)	2,32	1,94	NS

* Relación entre reestenosadores y no reestenosadores con el alelo PIA2 y con los factores de riesgo: edad, sexo, arteria descendente anterior y la sumatoria (Σ) de otros factores de riesgo cardiovasculares (HTA, dislipemia, tabaquismo, diabetes, hiperuricemia). DA: descendente anterior.

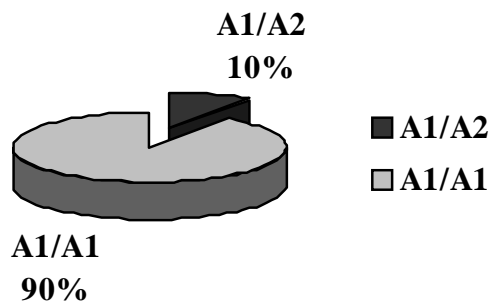


Fig. 3. Porcentaje de A1/A2 en población sin antecedentes coronarios.

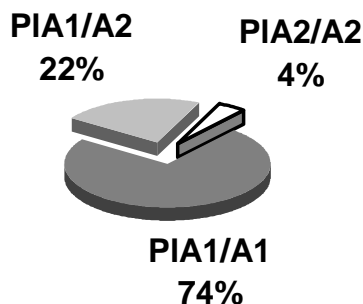


Fig.4. Porcentajes del alelo PIA de la población en estudio

DISCUSIÓN

De los resultados antes expresados se desprende que el alelo polimórfico PIA2 tiene relación con la presencia de reestenosis post-ATC con *stent*, ya que se detectó en el 47% de los pacientes del grupo de reestenosis, mientras que sólo se halló en el 13% de los del grupo no reestenosado ($p < 0,04$). Estos hallazgos adquieren mayor relevancia si se toma en consideración que ninguno de los otros factores de riesgo que se tuvieron en cuenta en este trabajo presentaron una significación estadística cuando se compararon con la pre-

sencia del alelo, reconociendo lo limitado de la muestra. Esto podría demostrar que el polimorfismo (PIA2) sería un factor de riesgo para tener en cuenta para reestenosis *intrastent*.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran la existencia del polimorfismo en todas sus variantes entre la población en estudio y, teniendo en cuenta los estudios previos, el polimorfismo del GP IIIa, PIA2 y la reestenosis post-ATC con *stent* podrían relacionarse directamente. Se presenta como un factor de riesgo, ya que ninguno de los otros factores tomados en cuenta, ya sean edad, sexo, que la ATC se haya realizado en la arteria descendente anterior –considerada la arteria coronaria con mayor tasa de reestenosis–, ni la sumatoria de otros factores como la hipertensión arterial, el tabaquismo, la dislipemia o la diabetes, mostraron relación con el alelo PIA2. Es decir que la presencia de otros factores de riesgo no tuvieron relación alguna con la presencia del alelo (Tabla 1).

Si consideramos que la mayoría de las enfermedades reconocen un componente genético importante y otro ambiental en su fisiopatología y que la variabilidad genética que se presenta en las distintas razas y etnias pueden modificar los resultados de estudios que intenten buscar un determinante genético único como culpable de una enfermedad, entenderemos el porqué de los distintos resultados que se encuentran en la bibliografía mundial con respecto a éste u otros polimorfismos o mutaciones génicas. No sólo se debe tener en cuenta esto, sino también el método utilizado, la población comparada y los puntos finales de cada trabajo para determinar si los resultados expresados en ellos son comparables.

Por ejemplo, desde el primer trabajo realizado por Weis y colaboradores en 1986, en el que se demostró la relación existente entre el PIA2 y el infarto agudo de miocardio, sobre todo en pacientes menores de 60 años, (9) se han desarrollado numerosos estudios en el intento de repetir sus resultados con logros disímiles, sobre todo en lo que respecta a la relación de este polimorfismo con el IAM o la enfermedad coronaria, no así con la reestenosis *intrastent*. Cuando se intentó relacionar el PIA2 con la reestenosis *intrastent*, Kastrati y colaboradores y Walter y colaboradores lo lograron. (3, 4). Sin embargo Laule y colaboradores no confirmaron estos hallazgos; (16) esto podría obedecer al tipo de población por ellos analizada y a puntos finales no comparables con los otros dos estudios. Otros autores demostraron que los portadores de este polimorfismo además de mayor riesgo de enfermedad coronaria y reestenosis *intrastent*, tienen mayor agregación plaquetaria, menor respuesta a la aspirina y al clopidogrel y una respuesta alterada a los inhibidores IIb-IIIa. (3-11) Si se tiene en cuenta el mecanismo fisiopatológico para la producción de la reestenosis *intrastent*, se puede interpretar claramente que este aumento en la agregación y esta respuesta menor a los antiagregantes plaquetarios podría ser una causa primaria en la reestenosis.

Debido a que el método científico requiere repetidas confirmaciones para poder aseverar un resultado y teniendo en cuenta la antes mencionada variabilidad genética interracial y étnica es que nosotros realizamos este trabajo para poder demostrar la presencia del alelo polimórfico del glicorreceptor plaquetario de membrana IIIa (PIA2) en una población argentina y comparar sus porcentajes en los tres grupos estudiados y evaluar una tendencia en los portadores en relación con la reestenosis *intrastent*.

Dentro de las limitaciones del estudio debemos reconocer que el número de pacientes fue reducido y que éste no fue un estudio prospectivo; sin embargo, teniendo en cuenta los objetivos que se buscaron y reconociendo que se hallaron todas las variables del polimorfismo y que la diferencia entre los dos grupos fue estadísticamente significativa, podemos suponer que estos resultados podrían confirmarse en una población mayor. Esto es una posibilidad y no una afirmación.

CONCLUSIONES

Estos resultados nos muestran que el alelo polimórfico PIA2 es detectable en todas sus variantes en una población argentina. Teniendo en cuenta éstos y otros resultados de trabajos sobre el tema, debería considerarse que la presencia del alelo A2 (PIA1/A2 o PIA2/A2) podría ser un predictor de reestenosis post-ATC con *stent* y que su detección preprocedimiento podría tener implicaciones terapéuticas.

Dado el desarrollo de los *stents* recubiertos con inhibidores de la replicación celular (p. ej., rapamicina) y su bajo porcentaje de reestenosis, (17) aunque de alto costo, la genotipificación de los pacientes podría ayudarnos a decidir en quiénes se justificaría la utilización de este tipo de *stents*.

SUMMARY

Study of the relationship between the leu33/pro33 polymorphism of platelet glycoprotein receptor IIIa and post-coronary angioplasty in-stent restenosis in an argentinian population

Background

In patients with IIIa platelet receptor PIA2 polymorphism, mainly in PIA2/A2 homozygotes, the percentage of post-coronary angioplasty in-stent restenosis is higher than in normal patients or in PIA1/A1 homozygotes.

Objective

To evaluate the presence of the PIA2 allele in patients with in-stent restenosis, to assess the percentage of PIA2/A2 homozygotes among these patients, and to determine the prevalence of the PIA2 polymorphism in a population free of coronary disease.

Methods

Forty-five patients in 3 different populations were evaluated, including 10 patients without coronary disease (9 men, 30 ± 5 years old), 16 patients (13 men, 62 ± 11 years old)

with angioplasty and without restenosis at angiographic control (7 ± 1 months post-angioplasty), and 19 patients with in-stent restenosis (16 men, 60 ± 12 years old). Restenosis was defined as a lesion greater than 50% of the stent lumen at reevaluation. The presence of the PIA2 allele was assessed by polymerase chain reaction. Results were compared by means of the Fischer test.

Results

The PIA2 allele was detected in 9 (47%) of the 19 patients with restenosis and in 2 (13%) of the 16 patients without restenosis ($p < 0.04$). In the group without coronary disease the PIA2 allele was found in only one patient (10%). Only 2 PIA2/A2 homozygous were found, both in the restenosis group.

Conclusions

The presence of the PIA2 allele (PIA1/A2 or PIA2/A2) was significantly higher among in-stent restenosis patients. The presence of this allele could be a predictor of post-stenting restenosis, and its early detection could have important implications in decision making.

Key words: Restenosis - Genetics - Polymorphism

BIBLIOGRAFÍA

- Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989;83:1778-81.
- Kunichi T, Newman JP. The Biochemistry of platelet-specific antigens. En: A. Hassig, editor. *Current Studies in Hematology and Blood Transfusion*. Basel: S. Kaarger; 1986. p. 18.
- Kastrati A, Schomig A, Seyfarth M, Koch W, Elezi S, Bottiger C, et al. PIA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 1999;99:1005-10.
- Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 1997;350:1217-9.
- Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, et al. Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000;101:1013-8.
- Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, et al. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A(2) in subjects with Pl(A2) polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol* 2000;110:911-8.
- Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Platelet glycoprotein IIIa Pl(a) polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001;104:140-4.
- Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Pl(A2) polymorphism of beta(3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. *Circulation* 2001;104:2666-72.
- Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996;334:1090-4.
- Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, et al. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PIA2, ZwB) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 1999;20:742-7.
- Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PIA2 polymorphism. *Am Heart J* 2002;143:76-82.
- Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white, and Korean populations. *Transfusion* 1995;35:863-7.
- Bandieri JD. Influencia de los factores reológicos y biomecánicos en la aterosclerosis y la reestenosis. Parte I. *Rev Argent Cardiol* 1997; 65:287-295.
- Bandieri JD. Influencia de los factores reológicos y biomecánicos en la aterosclerosis y la reestenosis. Parte II. *Rev Argent Cardiol* 1997; 65:397-308.
- Armitage P, Berry G. *Statistical Methods in Medical Research*. 3ª ed., Oxford, London: Blackwell Science; 1996.p. 195.
- Laule M, Cascorbi I, Stangl V, Bielecke C, Wernecke KD, Mrozikiewicz PM, et al. A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa and association with excess procedural risk for coronary catheter interventions: a case-controlled study. *Lancet* 1999;353:708-12.
- Serruys PW, Degertekin M, Tanabe K, Abizaid A, Sousa JE, Colombo A, et al. Intravascular ultrasound findings in the multicenter, randomized, double-blind RAVEL (RANdomized study with the sirolimus-eluting VELOCITY balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery Lesions) trial. *Circulation* 2002;106:798-803.