

Anticuerpos antirreceptores adrenérgicos beta con actividad agonista parcial en pacientes con cardiopatía eléctrica primaria

P. A. CHALE °, M. VALLAZZA, E. FEIGELSON, S. CARAMES, I. FERRARI, M. LEVIN, M. ELIZARI ^{ao}, M. B. ROSENBAUM [®]

División Cardiología, Hospital Ramos Mejía e Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI - CONICET), Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 9/95 Aceptado: 9/95

Dirección para separatas: Urquiza 609, (1221) Buenos Aires, Argentina

^a Miembro Titular SAC

^o Fellow ACC-FAHA

^a HFACC-FAHA

Antecedentes

En estudios recientes se demostró que en la cardiomiopatía dilatada idiopática y en la enfermedad de Chagas crónica existen anticuerpos séricos dirigidos contra péptidos correspondientes a las secuencias de la segunda asa extracelular de los receptores adrenérgicos 131 y 132. La prevalencia de estos anticuerpos fue estudiada en pacientes con "anormalidades eléctricas primarias": arritmias auriculares, arritmias ventriculares y trastornos de conducción en ausencia de alteraciones cardíacas estructurales.

Material y método

En 153 pacientes (57 con anormalidades eléctricas primarias, 29 con cardiomiopatía dilatada idiopática y 67 con enfermedad de Chagas crónica) y 101 controles sanos y cardiopatas, la presencia de receptores adrenérgicos 131 y 132 de la segunda asa extracelular fue detectada por medio de un inmunoensayo enzimático. En 9 casos seropositivos seleccionados se estudió el efecto cronotrópico de la fracción IgG sobre un cultivo de cardiomiocitos de rata recién nacida.

Resultados

Niveles elevados de receptores adrenérgicos 131 y/o 142 de la segunda asa extracelular fueron detectados en 11/21 (52,3%; $p < 0,01$) de los pacientes con arritmias ventriculares, en 5/14 (35,7%; $p < 0,05$) de los casos con trastornos de conducción, en 3/22 (13,6%; p : ns) de los pacientes con arritmias auriculares, en 11/29 (37,9%; $p < 0,05$) de los casos de cardiomiopatía dilatada idiopática y en 31/67 (46,3%; $p < 0,05$) de los pacientes chagásicos, en comparación con 15/101 (14,8%) del grupo control. La IgG de los casos seropositivos produjo un efecto cronotrópico positivo rápido y marcado, que fue mediado por estimulación de los receptores 131 y 132 en las arritmias ventriculares primarias y sólo de los 131 en la cardiomiopatía dilatada idiopática.

Conclusiones

Las arritmias ventriculares y, en menor medida, los trastornos de conducción primarios presentan, al igual que la cardiomiopatía dilatada idiopática y la enfermedad de Chagas crónica, una elevada prevalencia de anticuerpos que interactúan con epítopes funcionales de los receptores adrenérgicos β . La presencia de una alteración inmunorregulatoria común sugeriría un nexo etiopatogénico entre las anormalidades eléctricas primarias y la cardiomiopatía dilatada idiopática. REV ARGENT CARDIOL 1996; 64 (2): 119-127.

Palabras clave Receptores adrenérgicos beta - Arritmias auriculares - Arritmias ventriculares - Bloqueos cardíacos - Cardiomiopatía dilatada idiopática - Enfermedad de Chagas

En la última década, el conocimiento de la estructura molecular de los receptores β_3 adrenérgicos experimentó progresos notables. La secuencia de aminoácidos de los receptores adrenérgicos 131 y 132 fue derivada de las secuencias correspondientes del ácido desoxirribonucleico (1-3) y se postuló que la segunda asa extracelular de esos receptores contiene los epítopes de las células T y B necesarios para la inducción de una respuesta inmune. (4) La síntesis de dos péptidos correspondientes a las secuencias teóricas de la segunda asa extracelular de los receptores adrenérgicos 111 y 132 humanos permitió desarrollar un método de detección de anticuerpos dirigidos contra esos receptores en el suero de pacientes. A partir de ello fue posible demostrar que los pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática (una enfermedad en la cual la autoinmunidad parece desempeñar un papel etiopatogénico fundamental) (5-7) reconocen de manera monoespecífica al receptor adrenérgico 131. (8) Los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 131 purificados por afinidad mostraron un efecto inhibitorio sobre la unión de radioligandos al receptor 131 de las células C6 del glioma de la rata, reconocieron la proteína del receptor por *immunoblot* y se unieron *in situ* al tejido miocárdico humano. Esos mismos anticuerpos desarrollaron un efecto cronotrópico positivo franco y prolongado en un cultivo de cardiomiocitos de rata recién nacida. Por otra parte, los anticuerpos antirreceptores β_2 adrenérgicos fueron inducidos en el conejo por inyección del péptido 91 y purificados por afinidad. Los anticuerpos así inducidos mostraron las mismas propiedades que los anticuerpos hallados en los pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. Estudios ulteriores permitieron establecer que anticuerpos dirigidos contra los péptidos 131 y 122 están también presentes en la enfermedad de Chagas crónica, (9, 10) una cardiomiopatía dilatada específica en cuya patogenia participarían mecanismos de autoinmunidad. (11, 12)

Teniendo en cuenta que tanto la cardiomiopatía dilatada idiopática como la cardiomiopatía crónica chagásica se acompañan con frecuencia de una variedad de arritmias cardíacas y trastornos de la conducción, decidimos investigar la presencia de anticuerpos antirreceptores β_3 adrenérgicos en pacientes con arritmias y trastornos de conducción no vinculados con estas cardiomiopatías ni con cualquier otra anomalía cardíaca ostensible, para determinar si la misma alteración de la inmunorregulación descrita en las cardiomiopatías dilatada idiopática y chagásica está presente en esas "anormalidades eléctricas" de origen incierto.

Las arritmias y los trastornos de la conducción que ocurren en pacientes con corazón estructuralmente

sano son bien conocidas por el cardiólogo clínico, que a menudo tiene serias dificultades para identificar la etiología y patogenia de estas anomalías, que incluyen arritmias auriculares y ventriculares frecuentes, disfunción sinusal y diversas formas de bloqueo intraventricular y auriculoventricular. Tales alteraciones pueden ser denominadas en conjunto "anormalidades eléctricas primarias". El objetivo principal de este estudio fue evaluar la prevalencia de anticuerpos antirreceptores β_3 adrenérgicos en pacientes con "anormalidades eléctricas primarias" en comparación con controles sanos y cardiopatas y con pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y enfermedad de Chagas crónica.

MATERIAL Y METODO

a. Población

Doscientos cincuenta y cuatro pacientes del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía participaron en el estudio y fueron asignados a cuatro grupos. El Grupo 1 incluyó 57 pacientes con "anormalidades eléctricas primarias" (31 hombres, 26 mujeres; edad promedio 41,7 años y edades extremas, 15 y 73 años). Los criterios de inclusión fueron la presencia de arritmias auriculares (Grupo 1A), arritmias ventriculares (Grupo 1B) o trastornos de la conducción (Grupo 1C). Las características principales de las "anormalidades eléctricas" se detallan en la Tabla 1.

La ausencia de cualquier otra alteración cardíaca (o cualquier otra enfermedad aguda o crónica) fue establecida sobre la base de: 1) una cuidadosa historia y examen clínicos; 2) análisis habituales de laboratorio normales, incluyendo la serología para la enfermedad de Chagas; 3) ausencia de cualquier otra anomalía electrocardiográfica aparte de las arritmias y los trastornos de conducción; 4) ecocardiograma bidimensional normal; 5) prueba ergométrica graduada normal.

El Grupo 2 incluyó 101 individuos control, de los cuales 68 eran donantes de sangre sanos (Grupo 2A) (57 hombres, 11 mujeres; edad promedio 32,9 años; rango: 20-43 años) y 33 tenían cardiopatías diversas exceptuando la cardiomiopatía dilatada idiopática o la cardiomiopatía chagásica crónica (Grupo 2B) (25 hombres, 8 mujeres, edad promedio 58,2; rango: 28-79 años). La Tabla 2 describe el diagnóstico clínico en los 33 pacientes del grupo control con cardiopatía.

El Grupo 3 incluyó 29 pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática (18 hombres, 11 mujeres, edad promedio 45,1 años; rango: 14-75 años).

El Grupo 4 estuvo integrado por 67 pacientes con enfermedad de Chagas crónica (25 hombres, 42 mujeres; edad promedio 43 años; rango: 16-69 años).

Tabla 1
Número de sueros que reconocieron los péptidos beta 1 y/o beta 2 en 57 pacientes con diferentes tipos de anomalías eléctricas primarias

	Tipo de anomalía eléctrica	Número de pacientes	Número de sueros positivos
Grupo 1A: arritmias auriculares (n: 22)	Fibrilación y/o aleteo auricular paroxístico	7	0
	Extrasístoles auriculares frecuentes*	12	3
	Disfunción del nódulo sinusal	3	0
Grupo 1B: arritmias ventriculares (n: 21)	Extrasístoles ventriculares uniformes, frecuentes, sin formas repetitivas**	6	3
	Extrasístoles ventriculares uniformes, frecuentes, con formas repetitivas	4	1
	Extrasístoles ventriculares multiformes, frecuentes, sin formas repetitivas	2	0
	Extrasístoles ventriculares multiformes, frecuentes, con formas repetitivas	8	6
	Taquicardia/fibrilación ventricular	1	0
Grupo 1C: trastornos de la conducción (n: 14)	Bloqueos intraventriculares***	10	3
	Bloqueos auriculo-ventriculares****	4	2

* Número de extraestímulos auriculares \geq 1.000/24 horas en los ECG de Holter. ** Número de extrasístoles ventriculares 2:30/hora en ECG con registro Holter. *** Cinco pacientes con bloqueo de rama izquierda, 4 casos de hemibloqueo anterior (uno de ellos con bloqueo de rama izquierda dependiente de la frecuencia) y 1 paciente con bloqueo de rama derecha más hemibloqueo anterior izquierdo. **** Tres casos de bloqueo auriculoventricular completo y uno de bloqueo auriculoventricular de segundo grado.

De esta manera fue posible comparar la prevalencia de los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 9 en las "anomalías eléctricas primarias", la cardiopatía dilatada idiopática y la enfermedad de Chagas crónica (al igual que en los individuos control) en pacientes provenientes de la misma área geográfica. El diagnóstico de cardiopatía dilatada idiopática fue realizado sobre la base de criterios descriptos previamente. (13)

b. Detección de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13 por inmunoensayo enzimático

Después de completar todos los estudios clínicos, se obtuvieron muestras de sangre, se separaron los sueros y los mismos fueron diluidos en glicerol al 50% (vol/vol) y almacenados a -20°C hasta su uso. Cuando se contó con una cantidad suficiente de sueros (entre 30 a 90 días después de la extracción de sangre), los mismos fueron procesados para detectar anticuerpos dirigidos contra los péptidos sintéticos 81 y 9 2 utilizando el método de inmunoensayo enzimático descripto por Magnusson y colaboradores. (8) Los péptidos fueron sintetizados con un

sintetizador automático, desalinizados y almacenados a -20°C hasta su uso. Los péptidos sintéticos corresponden a las secuencias teóricas de la segunda asa extracelular de los receptores β_3 adrenérgicos (Figura 1).

El péptido 121 corresponde a la secuencia de ami-

Tabla 2
Diagnóstico clínico y número de sueros que reconocieron los péptidos beta 1 y beta 2 en 33 controles con cardiopatía

Diagnóstico clínico	Número de pacientes	Número de seropositivos
Cardiopatía hipertrófica	15	2
Cardiopatía isquémica	7	0
Valvulopatía	5	0
Cardiopatía hipertensiva	2	0
Cardiopatía alcohólica	1	0
Sarcoidosis cardíaca	1	0
Enfermedad de Kawasaki	1	0
Parálisis periódica familiar con arritmias ventriculares	1	0

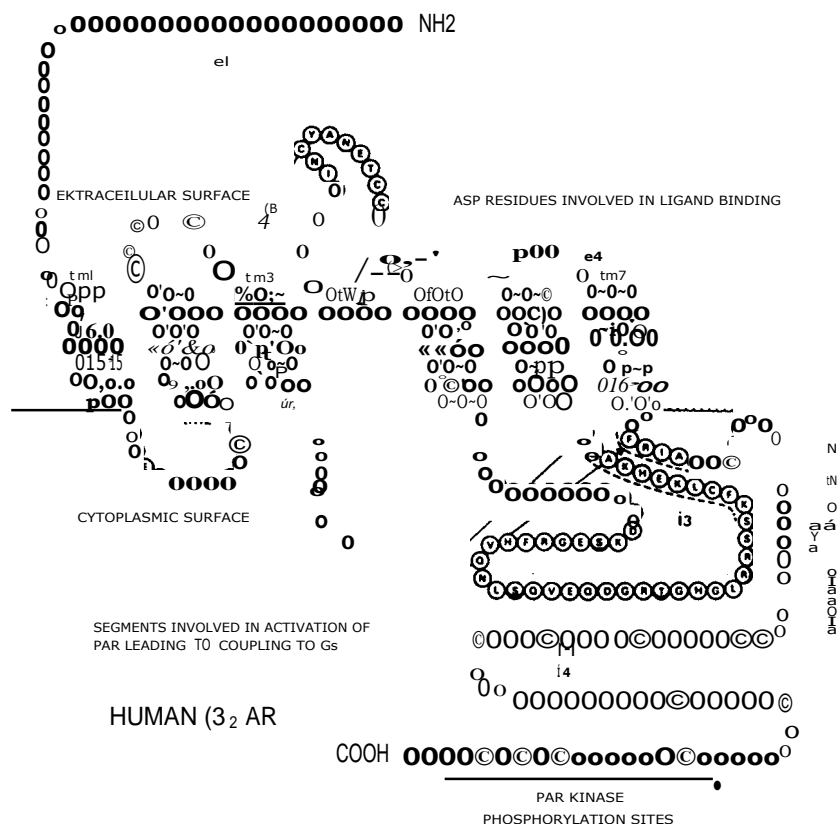


Fig. 1. Estructura molecular del receptor adrenérgico beta 1 humano. La flecha señala la segunda asa extracelular.

noácidos 183 a 208 de los receptores adrenérgicos 131(H-W W R-A-E-S-D-E-A-R-R-C-Y N-D-P-K-C-C-D-F-V T N-R) y el péptido 132 a la secuencia 172 a 197 de los receptores adrenérgicos 132 (H-W- Y R-A-T H-Q-E-A-I-N-C-Y A-N-E-T-C-C-D-F-F-T N-Q). Cincuenta µl de una solución de carbonato de sodio (0,1 M/litro) suplementada con betamercaptoetanol al 1% (vol/vol) y conteniendo 50 µg/ml del péptido fueron adsorbidos en platos de microtitulación durante 1 hora a temperatura ambiente y saturados luego con solución salina tampón-fosfato (16 mM/litro de fosfato, 150 mM/litro de cloruro de sodio, pH 7,4) suplementada con 3% (vol/vol) de leche descremada, 0,1% (vol/vol) de Tween 20 y 0,01% (vol/vol) de Timerosal (PMT). A la solución que contenía los péptidos se le agregaron 50 µg de las diluciones de los sueros 1:20 a 1:160 y se los mantuvo durante una noche a 4°C. Después de tres lavados adicionales los anticuerpos unidos a los péptidos fueron detectados por incubación de las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de estreptavidina-peroxidasa en PMT (1 µg/ml). Después de otros tres lavados se agregó el sustrato de cromogénico peróxido de hidrógeno (2,5 mM/litro)-2,2'-azino-di-benzotiazoline)-ácido sulfónico (2 mM). Las densidades ópticas (DO) fueron leídas 30 minutos después a 405 nm en un lector microELISA (Molecular Devices). Todas las determinaciones fueron realizadas en el mismo laboratorio en cuatro lotes

separados (durante un período de 18 meses) en condiciones "ciegas" excepto para los controles sanos. Cada lote de sueros incluyó 10 a 50% de controles sanos. Los sueros fueron considerados positivos cuando sus DO excedieron en más de 2 desvíos estándar el promedio de las DO de los controles después de excluir aquellos sueros controles cuyas DO sobrepasaron ese límite (controles positivos).

c. Pruebas funcionales

En 9 pacientes seleccionados (4 con "anormalidades eléctricas primarias", 4 con miocardiopatía dilatada idiopática y 1 control sano) cuyos sueros reconocieron los péptidos 131 y 132 se aisló la fracción IgG por precipitación con sulfato de amonio y se evaluaron sus efectos funcionales cronotrópicos sobre la frecuencia de latidos de cultivos de cardiomiocitos de ratas recién nacidas, tal como fue descrito por Wallukat y colaboradores. (14) Los cardiomiocitos fueron disociados de trozos pequeños (de aproximadamente 1 mm³) de miocardio ventricular con una solución de tripsina al 0,2% y cultivados a 37°C durante 4 días como monocapas (90.000 células/cm²). El día del experimento el medio fue reemplazado y las células fueron incubadas durante 2 horas como monocapas en un agitador lento. Durante esta etapa, las células fueron sensibilizadas para la respuesta a los receptores adrenérgicos 132 agregando 10 mM/l de

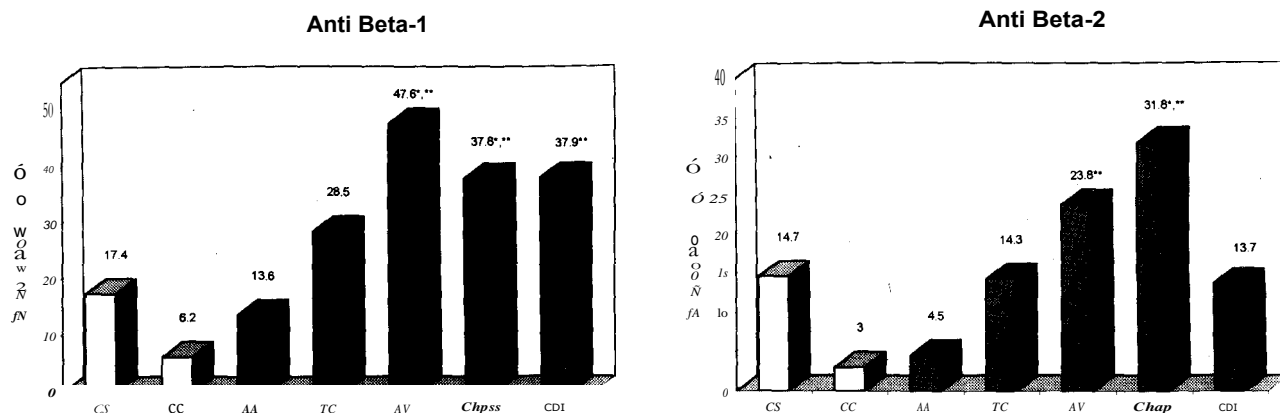


Fig. 2. Porcentaje de sueros que reconocieron los péptidos 91 (a la izquierda) y 112 (a la derecha) en pacientes con arritmias auriculares (AA), trastornos de conducción (TC), arritmias ventriculares primarias (AV), cardiomiopatía dilatada idiopática (CDI) y enfermedad de Chagas crónica (Chagas) comparados con controles sanos (CS) y cardiopatas (CC). * P < 0,05 comparado con controles sanos. ** P < 0,05 comparado con controles cardiopatas. Para más detalles ver el texto.

ácido 15-hidroxicositetraénico. (15) Posteriormente el cultivo fue transferido a la platina termostatzada (37°C) de un microscopio invertido Zeiss y se observaron 10 campos circulares de la monocapa celular a través de la perforación de un metal templado. La frecuencia de latidos de una célula o un acúmulo de células que se contraían en forma sincrónica en cada uno de los 10 campos fue determinada por períodos de 15 segundos por vez. Este procedimiento fue repetido en dos oportunidades en diferentes cultivos para obtener resultados de un total de 10 células o acúmulos de células y antes y 60 minutos después de la preincubación con la IgG de los pacientes diluida al 1:10-1:100. El conteo fue repetido después del agregado en forma sucesiva (sin lavado) del bloqueante selectivo de los receptores adrenérgicos 111 bisoprolol (1 mM/litro) y del bloqueante selectivo de los receptores adrenérgicos 112 ICI-118.551 (30 nM/litro). Todas las pruebas funcionales fueron realizadas "a ciegas".

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza (Software Statview SE+Graphics TM version 1.03) para definir la significación estadística de las diferencias en la prevalencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 111 y 112 en los distintos grupos de pacientes. Se consideró significativo un valor de p < 0,05. La frecuencia de latidos en los cultivos de cardiomiocitos de ratas después de agregar la IgG fue comparada con la del período control mediante la prueba de Student para datos apareados. Los resultados fueron expresados como el valor promedio ± el error estándar. Se consideró significativo un valor de p < 0,05.

RESULTADOS

La prevalencia de anticuerpos dirigidos contra los receptores adrenérgicos IR fue diferente en los tres

grupos de pacientes con "anormalidades eléctricas primarias". Anticuerpos que reconocieron los péptidos 91, 112 o ambos fueron detectados en 11 de 21 pacientes (52,3%; p < 0,01) con arritmias ventriculares, en 5 de 14 pacientes (35,7%; p < 0,05) con trastornos de conducción y en 3 de 22 pacientes (13,6%; p < 0,05) con arritmias auriculares, así como en 15 de 101 individuos control (14,8%). Por otra parte, 11 de los 29 pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática (37,9%; p < 0,05) y 31 de los 67 casos de enfermedad de Chagas crónica (46,3%; p < 0,05) presentaron anticuerpos dirigidos contra los receptores B adrenérgicos. Cuando la prevalencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 111 y 112 fue analizada en forma independiente y los resultados en los pacientes con "anormalidades eléctricas primarias", cardiomiopatía dilatada idiopática y enfermedad de Chagas crónica fueron comparados con los obtenidos en los controles sanos y cardiopatas, se hicieron evidentes otras diferencias (Figura 2). No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 111 o 112 entre los controles sanos y cardiopatas. En cambio, la prevalencia de anticuerpos que reconocieron el péptido 131 en los pacientes con arritmias ventriculares primarias, enfermedad de Chagas crónica y cardiomiopatía dilatada idiopática fue significativamente mayor que en los controles sanos y cardiopatas.

Por otra parte, sólo los pacientes con arritmias ventriculares primarias y enfermedad de Chagas crónica presentaron anticuerpos dirigidos contra el receptor adrenérgico 92 en un porcentaje significativamente mayor que los controles cardiopáticos, aunque las diferencias no alcanzaron el nivel de significación estadística cuando se los comparó con los controles sanos. El porcentaje de sueros de los pacientes con trastornos de conducción primarios que reconocieron el péptido 111 fue notoriamente supe-

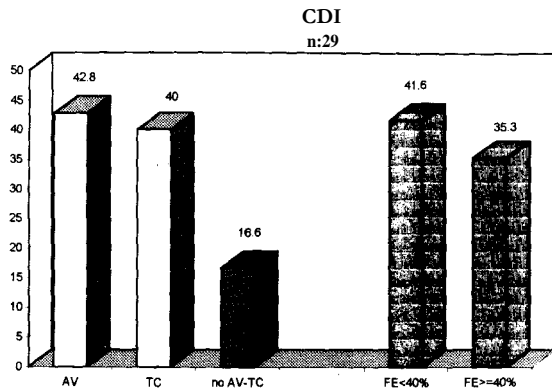


Fig. 3. Porcentaje de sueros que reconocieron el péptido QI en 29 pacientes con cardiopatía dilatada idiopática agrupados por la presencia de arritmias ventriculares (AV) o trastornos de conducción (TC) y ausencia de esta alteraciones (No AV-TC) y según la fracción de eyección en reposo (FE). Para más detalles ver el texto.

rrior al de los controles sanos, aunque el tamaño relativamente reducido de la muestra determinó que las diferencias carecieran de significación estadística. Finalmente, la prevalencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 931 y 132 en los pacientes con arritmias auriculares primarias fue similar a la de los controles.

Dado que en la cardiopatía dilatada idiopática las arritmias ventriculares y los trastornos de conducción son frecuentes, (13) decidimos comparar la prevalencia de los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13 en pacientes con cardiopatía dilatada idiopática que presentaron arritmias ventriculares y/ o trastornos de la conducción (23 de los 29 casos) y en los que no mostraron esas anormalidades (los 6 casos restantes).

La Figura 3 muestra que los pacientes con arritmias ventriculares y trastornos de conducción presentaron una prevalencia elevada de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13 y que esos anticuerpos estuvieron prácticamente ausentes en los pacientes que no tenían esas anormalidades. Por otra parte, la prevalencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 9 fue similar en los pacientes con fracción de eyección < 40% y > 40%.

En cambio, no se pudo establecer tal correlación entre arritmias ventriculares y trastornos de conducción y presencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13 en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Efectos funcionales de los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos Q

La frecuencia basal de los cardiomiocitos de rata recién nacida fue de 140 ± 20 latidos/minuto. La Figura 4 muestra que la IgG obtenida de dos pacientes con arritmias ventriculares primarias, cuyos sueros reco-

nocieron tanto el péptido 131 como el 132, ejercieron un marcado efecto cronotrópico positivo que fue neutralizado parcialmente por el bloqueante selectivo 131 bisoprolol y abolido totalmente por el bloqueante selectivo 132 ICI-118.551. Es evidente que el efecto cronotrópico positivo de los anticuerpos fue mediado por estimulación tanto de los receptores adrenérgicos 91 como de los 92. Por el contrario, la IgG de dos pacientes con cardiopatía dilatada idiopática, cuyos sueros reconocieron solamente el péptido 141 en el inmunoensayo enzimático, indujeron una respuesta cronotrópica positiva que fue totalmente abolida por el bisoprolol, indicando que ese efecto era mediado exclusivamente por estimulación de los receptores adrenérgicos 131. Una respuesta idéntica ocurrió en otros dos pacientes con cardiopatía dilatada idiopática (no incluidos en la figura) y ha sido descrita para los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 91 purificados por afinidad. (17)

En el único paciente con un bloqueo intraventricular primario, cuyo suero reconoció solamente el péptido 91, las respuestas a la IgG y al bisoprolol fueron similares a las observadas en los pacientes con cardiopatía dilatada idiopática. En uno de los tres pacientes con arritmias ventriculares primarias y en un control sano cuyos sueros reconocieron solamente el péptido 131, la IgG fue incapaz de producir un efecto cronotrópico significativo. En otros cuatro controles sanos de un estudio previo, cuyos sueros reconocieron el péptido 131, se demostró la misma ausencia de actividad funcional, lo que sugiere la existencia de anticuerpos "naturales" que pueden reconocer los péptidos sintéticos pero no los epítopes funcionales del receptor adrenérgico 13.

DISCUSION

Los resultados descriptos confirman la elevada prevalencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13 en pacientes con cardiopatía dilatada idiopática y enfermedad de Chagas crónica y muestran que esos mismos anticuerpos están también presentes en un porcentaje similar o aún mayor de pacientes con arritmias ventriculares y/o trastornos de conducción primarios. Por otra parte, la IgG de los pacientes con cardiopatía dilatada idiopática y con "arritmias ventriculares primarias", al igual que la de muchos pacientes con enfermedad de Chagas "crónica" desarrolla un efecto cronotrópico positivo similar en los cardiomiocitos de rata recién nacida, que está mediado por la estimulación de los receptores adrenérgicos 91 en los primeros y de los receptores adrenérgicos 131 y 142 en los últimos. Estas similitudes nos llevaron a pensar inicialmente que las arritmias ventriculares y/o los trastornos de conducción primarios podían ser las manifestaciones más precoces de una futura cardiopatía dilatada idiopática o formas abortivas de la

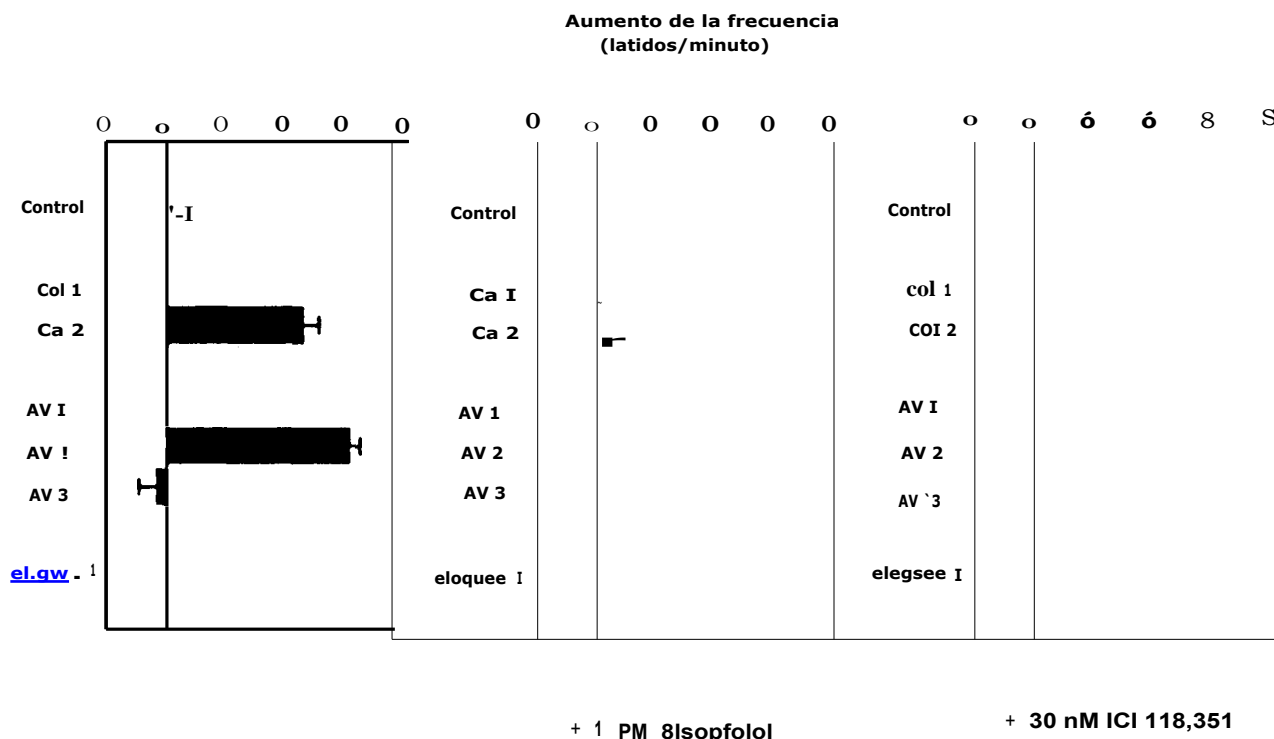


Fig. 4. Efecto cronotrópico positivo (aumento de la frecuencia en latidos/minuto) inducido por la inmunoglobulina G de un grupo seleccionado de pacientes seropositivos en cultivos de cardiomiocitos de rata recién nacida. Los sueros de un control sano (Control), 2 pacientes con cardiopatía dilatada idiopática (CDI1 y CDI2), un paciente con arritmias ventriculares primarias (AV) y el único paciente con bloqueo intraventricular (Bloqueo 1) reconocieron sólo el péptido 131. Dos de los tres sueros de pacientes con arritmias ventriculares primarias (AV1 y AV2) reconocieron tanto el péptido 131 como el 92. Los paneles del medio y la derecha muestran los efectos de un bloqueador 111 selectivo (bisoprolol) y un bloqueador 82 selectivo (ICI-118.551) agregados en forma sucesiva y sin lavado, respectivamente. Ver el texto para más detalles.

misma enfermedad. Sin embargo, algunos hallazgos inesperados y sorprendentes generaron dudas con respecto a la validez de esta hipótesis. La elevada prevalencia de los anticuerpos en nuestros pacientes con cardiopatía dilatada idiopática ocurrió únicamente en aquellos que presentaban arritmias ventriculares o trastornos de la conducción (Figura 2).

Estos resultados son similares a los publicados por Paci y colaboradores, (18) quienes evaluaron la presencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos B por la inhibición de la unión de ligandos radioactivos al tejido miocárdico y mostraron que 6 de 20 pacientes (30%) presentaban esos anticuerpos cuando la cardiopatía dilatada se asociaba con arritmias ventriculares complejas y sólo 1 de otros 20 (5%) cuando las arritmias estaban ausentes. Estas observaciones sugerirían que los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos B podrían guardar una relación mayor o más directa con las arritmias ventriculares y los trastornos de conducción que con la propia enfermedad miocárdica que lleva a la dilatación y a la insuficiencia cardíaca.

Arritmogenicidad y cardiotoxicidad potencial de los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13

Magnusson y colaboradores (17) mostraron que

una concentración baja (0,02 a 0,41 mM/litro) de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos B1 purificados por afinidad, provenientes de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática o de conejos inmunizados con el péptido 21, produce una fuerte estimulación cronotrópica (hasta el 80% del efecto máximo que desarrolla el isoproterenol) en un cultivo de cardiomiocitos de rata recién nacida. En contraste con el efecto del isoproterenol, rápido y relativamente fugaz, el efecto de los anticuerpos persiste por horas. (17) La ausencia de desensibilización rápida de los receptores adrenérgicos B podría sostener y reforzar el efecto "agonista-símil" de los anticuerpos. Si estos mismos efectos ocurrieran *in vivo*, los anticuerpos podrían ser tan arritmogénicos como las catecolaminas, aunque ello debe ser probado en modelos experimentales adecuados.

Reevaluación del significado clínico de las arritmias ventriculares y los trastornos de conducción primarios

La asociación de las "anormalidades eléctricas primarias" con los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos B obliga a reexaminar el significado clínico de esas alteraciones. En varios de nuestros pacientes con cardiopatía dilatada idiopática severa pudimos

documentar la presencia de bloqueo de rama izquierda, arritmias ventriculares o ambas alteraciones electrocardiográficas cuando el tamaño cardíaco era todavía normal, lo que indica que las anormalidades eléctricas fueron las manifestaciones más precoces del proceso inmunopatológico que condujo al desarrollo de la cardiomiopatía dilatada manifiesta. Estos hallazgos resaltan la necesidad de realizar estudios de seguimiento prospectivos para determinar si las anormalidades eléctricas asociadas con los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos Q pueden constituir marcadores diagnósticos o pronósticos de la cardiomiopatía dilatada idiopática.

Anticuerpos antirreceptores adrenérgicos en individuos normales

Nuestros resultados muestran que individuos sanos presentan una prevalencia relativamente elevada de anticuerpos que reconocen los péptidos 141 y/o 132. La especificidad y sensibilidad del inmunoensayo enzimático utilizado en nuestro estudio no han sido aún definidas con precisión. Sin embargo, ello no va en desmedro de la utilidad práctica de este procedimiento para la detección de los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 13. Este método relativamente simple ha servido para establecer que la cardiomiopatía dilatada idiopática, las arritmias ventriculares primarias y la enfermedad de Chagas crónica son las únicas enfermedades asociadas con una elevada prevalencia de tales anticuerpos. La validez de nuestros resultados es sustentada, además, por los siguientes hallazgos: 1) la prevalencia de los anticuerpos en nuestros pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática fue similar a la demostrada previamente con el mismo método (5) o con la técnica de inhibición de ligandos radioactivos; (16,18) 2) los resultados fueron esencialmente similares en cada uno de los cuatro grupos de sueros de todos nuestros pacientes, tanto en lo que respecta a los controles como a los enfermos; 3) la identificación correcta de los anticuerpos antirreceptores adrenérgicos 131 y 142 fue confirmada en los pacientes seropositivos con una prueba funcional (Figura 3). Sin embargo, la prueba funcional es muy compleja y laboriosa y por lo tanto poco apta para ser utilizada en un número importante de pacientes como el de nuestro estudio; 4) por otra parte, los resultados seropositivos en los individuos control implican la existencia de anticuerpos naturales desprovistos de cualquier efecto funcional. Estos "falsos positivos" se transforman en negativos cuando el inmunoensayo enzimático es realizado con IgG en lugar de suero (observaciones no publicadas).

Conclusiones e implicaciones clínicas

Las arritmias ventriculares y los trastornos de con-

ducción primarios, al igual que la cardiomiopatía dilatada idiopática y la enfermedad de Chagas crónica están asociados con una elevada prevalencia de anticuerpos que interactúan con epítopes funcionales de la segunda asa ventricular de los receptores adrenérgicos 13. En consecuencia, estas anormalidades cardíacas parecen estar vinculadas a través de un mismo proceso inmunorregulatorio anormal que involucra a los receptores adrenérgicos 13. Los anticuerpos tienen efectos "catecolamino-símil" que podrían facilitar la aparición de arritmias ventriculares y desempeñar un papel patogénico en el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada idiopática. Estas observaciones abren nuevas perspectivas para el estudio de la patogenia de estas enfermedades y pueden tener consecuencias importantes para su diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

SUMMARY

AUTOANTIBODIES AGAINST BETA ADRENERGIC RECEPTORS IN PATIENTS WITH PRIMARY ELECTRICAL CARDIAC ABNORMALITIES

Background

Using synthetic peptides corresponding to the predicted sequences for the second extracellular loop of the human beta 1 and beta 2-adrenoceptors as antigenic targets, autoantibodies directed against the beta-adrenoceptors were recently shown to occur in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. Based on these observations we intended to determine the prevalence of autoantibodies directed against the beta-adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities, including atrial arrhythmias, ventricular arrhythmias and conduction disturbances, in the absence of any other cardiac abnormality.

Material and method

One hundred and fifty three patients (57 with primary electrical abnormalities, 29 with idiopathic dilated cardiomyopathy and 67 with chronic Chagas' disease) and 101 healthy and cardiopathic control subjects were studied. Antibodies against the beta 1 and beta 2 peptides were detected with an enzyme immunoassay performed in blinded manner. In nine selected (seropositive) cases, the immunoglobulin G (IgG) fraction was tested for functional effects on the rate beating of cultured neonatal rat cardiomyocytes.

Results

Antibodies recognizing the beta 1 and beta 2 peptides were found in 11 (52.3%) of 21 patients with ventricular arrhythmias ($p < 0.01$), 5 (35.7%) of 14 patients with conduction disturbances ($p < 0.05$), 3 (13.6%) of 22 patients with atrial arrhythmias ($p < 0.05$), 11 (37.9%) of 29 patients with dilated cardiomyopathy ($p < 0.05$) and 31 (46.3%) of 67 patients with chronic Chagas' disease ($p < 0.05$) compared with 15 (14.8%) of 101 control subjects. A rapid increase in the beating rate of the cultured myocytes was induced by IgG from a selected group of patients, suggesting an agonist-like interaction with a functional epitope. This response was mediated by stimulation of both the beta 1 and beta 2-adrenoceptors in the patients with primary ventricular arrhythmias but only the beta 1-adrenoceptors in the patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.

Conclusions

Primary ventricular arrhythmias and conduction disturbances, like idiopathic dilated cardiomyopathy, and chronic Chagas' disease show a high prevalence of antibodies interacting with functional epitopes of the beta-adrenoceptors, suggesting a common or similar abnormal immunoregulatory process.

Key words Beta adrenergic receptors - Atrial arrhythmias - Ventricular arrhythmias - Conduction blocks - Idiopathic dilated cardiomyopathy - Chagas' disease

Agradecimiento

Este trabajo fue subvencionado por la Fundación de Investigaciones Cardiológicas Einthoven.

Los autores agradecen la colaboración de la Sra. Cecilia Mc Keon en la preparación de este manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- Kobilka BK, Dixon RAF, Frielle T y col. cDNA for the human 92 adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 87:46-50.
- Emorine LJ, Marullo S, Delavier-Klutchko C, Caveri SV, Durien Trautmann O, Strosberg AD. Structure of the gene for human B2-adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6995-6999.
- Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning of the cDNA for the human B1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7920-7924.
- Magnusson Y, Hoyer S, Leugagne R y col. Antigenic analysis of the second extracellular loop of the human B-adrenergic receptors. *Clin Exp Immunol* 1989; 78:42-48.
- Goodwin JP Mechanisms in cardiomyopathies. *J Moll Cell Cardiol* 1985;17: 5-9.
- Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P, Yacoub MA. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS. PAGE and Western blotting. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:1378-1384.
- Herskowitz A, Neumann DA, Ansari AA. Concepts of autoimmunity applied to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1385-1388.
- Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S y col. Mapping of a functional autoimmune epitope on the 91 adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1658-1663.
- Rosenbaum MB, Chiale PA, Schejtmán D, Levin M, Elizari MV. Antibodies to B-adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; 5: 367-375.
- Chiale P, Elizari MV, Rosenbaum MB y col. Sera of chagasic patients recognize functional autoimmune epitopes on G protein coupled cardiovascular receptors (abstract). Presented at the Annual Meeting on Chagas' disease. Caxambu, Brazil, November, 1993.
- Rosenbaum MB. Chagasic cardiomyopathy. *Frog Cardiovasc Dis* 1964; 7:199-225.
- Levitus GL. Autoinmunidad humoral en la enfermedad de Chagas crónica: anticuerpos contra las proteínas ribosomales P. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, 1991.
- Kopescky SL, Gersh BJ. Dilated cardiomyopathy and myocarditis: Natural history, etiology, clinical manifestations and management. *Curr Probl Cardiol* 1987; 575-647.
- Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic 13-adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta* 1987; 46: 634-639.
- Wallukat G, Nemezc G, Farkas T, Kuehn H, Wollenberger A. Modulation of the 13-adrenergic response in cultured rat heart cells. I. Beta-adrenergic supersensitivity is induced by lactate via a phospholipase A2 and 15-lipoxygenase involving pathway. *Mol Cell Biochem* 1991; 102: 35-47.
- Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against B-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1989; 64: 97-103.
- Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the B-1 adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89: 2760-2767.
- Pacci A, Neglia D, Cirimboli S y col. Anti 13-receptor antibodies in dilated cardiomyopathy: relationships with ventricular dysfunction and arrhythmias (abstract). *Circulation* 1993; 88 (2): 460.