

Prevalencia y efectos funcionales y bioquímicos de los anticuerpos antirreceptores autonómicos cardíacos en pacientes con arritmias ventriculares y disfunción sinusal

PABLO A. CHIALE, INES FERRARI, EVELINA MAHLER, MARINA A. VALLAZZA, MARIANO J. LEVIN, MARCELO V. ELIZARI, MAURICIO B. ROSENBAUM

RESUMEN

Antecedentes

Los anticuerpos circulantes que reconocen y estimulan los receptores autonómicos (RA) (β -adrenérgicos y M_2 colinérgico) se han demostrado en diversas cardiopatías. Sin embargo, el vínculo potencial entre las arritmias presentes en esas cardiopatías y los anticuerpos anti-RA y los efectos funcionales y bioquímicos de esos anticuerpos no se han investigado en forma sistemática.

Objetivos

1. Evaluar la prevalencia de anticuerpos anti-RA de las células miocárdicas en pacientes con arritmias ventriculares y/o disfunción sinusal. 2. Determinar los efectos funcionales y bioquímicos de esos anticuerpos.

Métodos

Se estudiaron 28 pacientes con arritmias ventriculares (grupo I), 13 con disfunción sinusal (grupo II) y 5 con ambas anormalidades (grupo III), de etiología primaria o debidas a miocardiopatía crónica chagásica o dilatada idiopática y 10 voluntarios sanos (grupo IV). Se evaluaron los efectos cronotrópicos de las fracciones IgG sobre cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas antes y después de la exposición a la atropina y el propranolol, para detectar los anticuerpos anti-RA y estudiar su acción funcional sobre los receptores correspondientes. En 10 casos seleccionados se inmunopurificaron los anticuerpos antirreceptor β_1 -adrenérgico o M_2 colinérgico y se exploraron sus efectos funcionales en el mismo sistema *in vitro*. Los efectos bioquímicos de la IgG de 9 pacientes del grupo I, de 6 del grupo II, de 2 del grupo III y de 3 controles sanos se estudiaron en células COS7 transfectadas con los genes de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos (a través del aumento en la producción de AMPc) y M_2 colinérgico (por el aumento en la producción de fosfatidilinositol [PI]).

Resultados

Las IgG de los controles sanos no modificaron la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos ni presentaron anticuerpos anti-RA. Las IgG de los pacientes del grupo I desarrollaron una acción cronotrópica positiva, con una prevalencia elevada de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (75%) y baja de anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico (10,7%). En marcado contraste, las

División Cardiología, Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía e Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) - CONICET

Trabajo recibido para su publicación: 6/99. Aceptado: 8/99

Dirección para separatas: Dr. Pablo A. Chiale, División Cardiología, Hospital J. M. Ramos Mejía, Urquiza 609, (1221) Buenos Aires, Argentina

Este estudio fue subsidiado por la Fundación de Investigaciones Cardiológicas Einthoven (FICE) y por subvenciones de la European Commission - The World Health Organization/Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, la Universidad de Buenos Aires (Proyecto 01/TW 18) y ANPC-FONCYT-SECYT-Argentina (Proyecto BID 802-OC-AR-PICT 05-00103-02030)

Trabajo de Temas Libres, XXVI Congreso Argentino de Cardiología 1999

IgG de los pacientes del grupo II deprimieron el cronotropismo de los cardiomiocitos, con una prevalencia elevada de anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico (76,9%) y baja de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (15,4%). Es de destacar que las IgG de los 5 pacientes del grupo III no tuvieron un efecto cronotrópico significativo pero presentaron una prevalencia elevada de anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico (80%) e intermedia de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (40%). El estudio de los efectos cronotrópicos de los anticuerpos anti-RA inmunopurificados confirmó los resultados que se obtuvieron con las IgG correspondientes. En concordancia con los resultados de los estudios funcionales, las IgG de los pacientes del grupo I indujeron un aumento marcado y sostenido del AMPc, pero no del PI, mientras que las IgG de los pacientes del grupo II produjeron un incremento ostensible y persistente del PI, pero no del AMPc.

Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran: 1) Una correlación muy marcada entre anticuerpos circulantes antirreceptores β -adrenérgicos y arritmias ventriculares (primarias o debidas a las miocardiopatías dilatada idiopática o crónica chagásica) y entre anticuerpos circulantes antirreceptor M_2 colinérgico y disfunción sinusal (primaria o chagásica). 2) Que los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico son infrecuentes en los pacientes con arritmias ventriculares sin disfunción sinusal concomitante y que los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos son excepcionales en aquellos con disfunción sinusal "pura". 3) Que los anticuerpos anti-RA producen una estimulación sostenida de los receptores correspondientes, con un aumento marcado en la producción de AMPc por parte de los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos e inhibición por parte de los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico. Nuestros hallazgos permiten avizorar nuevas perspectivas para el conocimiento de la etiología y la fisiopatología de las arritmias ventriculares y la disfunción sinusal y pueden tener implicaciones para la terapéutica de esas anomalías eléctricas. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 399-413.

Palabras clave Arritmias ventriculares primarias - Miocardiopatía crónica chagásica - Miocardiopatía dilatada idiopática - Receptores β -adrenérgicos - Receptor M_2 colinérgico - Propranolol - Atropina

INTRODUCCION

En los últimos años se han demostrado anticuerpos circulantes que reconocen y estimulan los receptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico de la membrana de las células miocárdicas en diversas cardiopatías, en las cuales las taquiarritmias ventriculares y las bradiarritmias son un componente habitual del cuadro clínico. (1-6) Es conocido que el predominio del tono simpático y los niveles elevados de catecolaminas circulantes pueden desempeñar un papel importante en la fisiopatogenia de las arritmias ventriculares (7, 8) y que la estimulación vagal puede deprimir la actividad del nódulo sinusal y deteriorar la conducción nodal AV. (9, 10) En consecuencia, es razonable suponer que los anticuerpos que estimulan los receptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico cardíacos podrían participar en la patogenia de las arritmias ventriculares y de las bradiarritmias, respectivamente.

Se ha sugerido que los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos están vinculados a las arritmias ventriculares de la miocardiopatía dilatada idiopática (4, 11) y que los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico se asocian con la disfunción sinusal "pri-

maria" y chagásica (5) y con otras arritmias presentes en la miocardiopatía crónica chagásica. (6) Sin embargo, la prevalencia y los efectos funcionales y bioquímicos de esos anticuerpos no se han investigado de manera sistemática en pacientes con diferentes arritmias cardíacas. Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar el nexo potencial entre los anticuerpos antirreceptores autonómicos y las arritmias (ectopia ventricular frecuente y/o disfunción sinusal) que se observan en diferentes cardiopatías, 2) establecer los efectos funcionales de esos anticuerpos en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas y 3) estudiar sus efectos bioquímicos sobre preparados de células transfectadas con los genes que codifican para las proteínas de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos y M_2 colinérgico.

METODOS

Pacientes

En el estudio se incorporaron 46 pacientes y 10 voluntarios sanos (Tabla 1) que integraron cuatro grupos.

El grupo I incluyó 28 pacientes con arritmias ven-

Tabla 1
Características clínicas de la población estudiada

Grupo	Nº de pacientes	Edad	Sexo	Tipo de arritmia	Diagnóstico
I (AV)	28	46,2 (31-68)	F: 18 M: 10	Extrasístolia ventricular frecuente	Arritmia ventricular primaria: 14 p Miocardiopatía crónica chagásica: 9 p Miocardiopatía dilatada idiopática: 5 p
II (DNS)	13	45,4 (22-68)	F: 9 M: 4	Disfunción del nódulo sinusal	Disfunción del nódulo sinusal primaria: 4 p Miocardiopatía chagásica crónica: 9 p
III (AV y DNS)	5	48,2 (22-60)	F: 1 M: 4	Extrasístolia ventricular frecuente y disfunción del nódulo sinusal	Arritmia ventricular y disfunción del nódulo sinusal primaria: 1 p Miocardiopatía crónica chagásica: 4 p
IV (CS)	10	45,5 (30-65)	F: 5 M: 5	Ninguna	Individuos sanos

AV: Arritmia ventricular. DNS: Disfunción del nódulo sinusal. CS: Controles sanos. F: Femenino. M: Masculino. p: Pacientes.

triculares (14 no presentaban anomalías cardíacas estructurales, 9 padecían miocardiopatía crónica chagásica y 5 miocardiopatía dilatada idiopática).

El grupo II lo constituyeron 13 pacientes con disfunción sinusal de etiología chagásica (9 pacientes) o idiopática (4 pacientes).

El grupo III incluyó 5 pacientes con arritmias ventriculares y disfunción sinusal (4 por miocardiopatía crónica chagásica y el restante sin sustrato estructural evidente).

El grupo IV (control) estuvo compuesto por 10 individuos sanos.

Evaluación cardiológica

La evaluación de los pacientes incluyó un examen clínico y cardiológico completo, serología para la enfermedad de Chagas, un electrocardiograma en reposo, un ecocardiograma bidimensional, un estudio de perfusión miocárdica con Talio 201 en esfuerzo y reposo y un electrocardiograma Holter de 24 horas. En 5 pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática se realizó una cinecoronariografía para excluir la etiología isquémica por patología de las arterias coronarias. Veintisiete pacientes (12 con arritmias ventriculares, 13 con disfunción sinusal y 2 con ambas anomalías) fueron sometidos a un estudio electrofisiológico.

Los diagnósticos de miocardiopatía crónica chagásica y miocardiopatía dilatada idiopática se realizaron sobre la base de criterios publicados con anterioridad. (12, 13) Se consideró que las arritmias eran "primarias" cuando se detectaron anomalías cardíacas estructurales y las pruebas serológicas para la enfermedad de Chagas eran negativas.

Todos los pacientes con arritmias ventriculares presentaron más de 30 extrasístoles ventriculares por hora en el electrocardiograma de Holter de 24 horas. En nuestra población con elevada densidad de

actividad ectópica ventricular (33 pacientes), el número de extrasístoles ventriculares (uniformes o multiformes) varió de 866 a 18.615/24 horas. Veintiún pacientes presentaron formas repetitivas (dúplas en 20 pacientes, 6 de los cuales también tuvieron episodios autolimitados de taquicardia ventricular, y salvas de taquicardia ventricular autolimitada en el restante). Siete pacientes tuvieron uno o más episodios de taquicardia ventricular sostenida antes de ser incluidos en el estudio, y en 5 de ellos la arritmia se pudo inducir por estimulación ventricular programada durante el estudio electrofisiológico.

El diagnóstico de disfunción sinusal se realizó sobre la base de criterios publicados con anterioridad. (14) Se consideró disfunción sinusal "pura" a la que no se acompañó de arritmias ventriculares (10 pacientes) o coexistió con un número no significativo de extrasístoles ventriculares (menor de 1/hora, 3 pacientes) durante el estudio electrocardiográfico Holter.

Procesamiento de los sueros

Una vez completados los estudios clínicos, se obtuvieron muestras de sangre y se separaron y codificaron los sueros y las fracciones IgG para evaluar sus efectos cronotrópicos sobre un cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas con actividad automática espontánea, método que sirvió para el doble propósito de detectar los anticuerpos antirreceptores autonómicos y estudiar sus efectos funcionales. En 10 pacientes seleccionados se inmunopurificaron anticuerpos antirreceptor β_1 -adrenérgico o M_2 colinérgico para estudiar sus efectos cronotrópicos sobre la misma preparación *in vitro* y corroborar los resultados obtenidos con las fracciones IgG correspondientes. El efecto bioquímico de las fracciones IgG de 9 pacientes con arritmias ventriculares, de 6 con disfunción sinusal, de 2 con arritmias ventricu-

lares y disfunción sinusal y de 3 controles normales se estudió con células COS7 transfectadas con plásmidos que contenían los genes que codifican para los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos y M_2 colinérgico.

Fraccionamiento de las inmunoglobulinas G

Los sueros se diluyeron al 1:5 en cloruro de sodio 150 mM y fosfato de sodio 10 mM a un pH de 7,4 (PBS) y las fracciones IgG se separaron por precipitación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a saturación. El precipitado se disolvió en PBS en una dilución 1:1. Se realizó un inmunoensayo enzimático con anticuerpos de conejo anticadena μ humana biotinilados para demostrar que los niveles de contaminación con la fracción IgM eran menores del 10%. A continuación, las fracciones IgG se dializaron por lo menos durante 36 horas contra PBS.

Inmunopurificación de los anticuerpos antirreceptores autonómicos

Los anticuerpos monoespecíficos contra los receptores M_2 y β_1 -adrenérgico se inmunopurificaron utilizando péptidos sintéticos con la misma secuencia de aminoácidos que el segundo bucle extracelular de los receptores humanos correspondientes:

M_2 : VRTVEDGECYIQFFSNAVVTFGTAI;

β_1 : HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR. Los péptidos M_2 o β_1 se acoplaron a sefarosa-CNBr (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Suecia). La fracción IgG se incubó durante toda la noche a 4°C con 300 μg de los péptidos M_2 o β_1 acoplados a la sefarosa. Antes de lavar la columna repetidas veces con PBS, se recuperó la fracción de anticuerpos no retenida (*flow through-IgG fraction*). La elución de los anticuerpos antirreceptor β_1 -adrenérgico se realizó en un tampón de glicina 0,2 M a un pH de 2,8 y se neutralizó con tampón TRIS 1M a un pH de 8,0. Los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico se eluyeron con tiocianato de potasio 3M y se dializaron de inmediato contra PBS. A continuación se realizó un ensayo de Bradford, para evaluar la concentración proteica, y un inmunoensayo enzimático (14) contra los péptidos utilizados para purificar los anticuerpos, con todas las fracciones.

Detección de los anticuerpos antirreceptores autonómicos y evaluación de sus efectos funcionales

Los efectos cronotrópicos de las fracciones IgG y de los anticuerpos inmunopurificados se evaluaron en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas con actividad autonómica espontánea. Las células se obtuvieron de corazón de ratas Wistar de 1 a 4 días de edad por disgregación con una solución de tripsinacolagenasa. Los cardiomiocitos se cultivaron como

monocapas durante 4 días a 37°C con una atmósfera que contenía 5% de CO_2 en un medio Eagle Dulbecco modificado-F12 (DMEM/F-12, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) con 5% de suero fetal bovino. La frecuencia de latidos de los cardiomiocitos en condiciones basales (medida en 10 campos diferentes a 37°C en la platina termostatizada de un microscopio invertido) fue de 120 ± 24 /minuto. Las mediciones se repitieron una hora después de la exposición de los cardiomiocitos a las fracciones IgG (dilución 1:50) con el agregado ulterior de atropina (10^{-7}M) y de propranolol (10^{-7}M). Por último, se estimularon los cardiomiocitos con el agonista betaadrenérgico isoproterenol (10^{-5}M). Todas las pruebas funcionales se realizaron sin que el operador tuviera conocimiento del diagnóstico clínico, y se repitieron como mínimo en tres oportunidades para determinar la reproducibilidad de los resultados.

Se consideró que las pruebas funcionales indicaban la presencia de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos cuando la fracción IgG indujo un incremento estadísticamente significativo de la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos (en comparación con las fracciones IgG del grupo control) que fue neutralizado por el propranolol.

Se consideró que los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico estaban presentes cuando la fracción IgG produjo una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos (en comparación con las fracciones IgG del grupo control) que fue antagonizada por la atropina.

La fracción IgG de un paciente puede contener tanto anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico como antirreceptores β -adrenérgicos, cuyos efectos cronotrópicos pueden neutralizarse mutuamente. Por lo tanto, un aumento significativo del cronotropismo de los cardiomiocitos después del agregado de atropina, a su vez antagonizado por el propranolol, se interpretó que era indicativo de la presencia de ambos tipos de anticuerpos antirreceptores autonómicos, aun cuando la fracción IgG no hubiese modificado la actividad cronotrópica de los cardiomiocitos antes de la exposición a los bloqueadores autonómicos.

Estudio de los efectos bioquímicos de los anticuerpos antirreceptores autonómicos

En la Figura 1 se esquematiza la secuencia de los procedimientos de inclusión del ADNc en los vectores, transfección, expresión y medición de la producción de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) o de fosfatidilinositol (PI) luego del agente inductor.

Vectores de expresión. Se utilizaron diferentes vectores de expresión de acuerdo con el receptor autonómico cuya estimulación por los anticuerpos fuese explorada: 1) los vectores de expresión pBC,

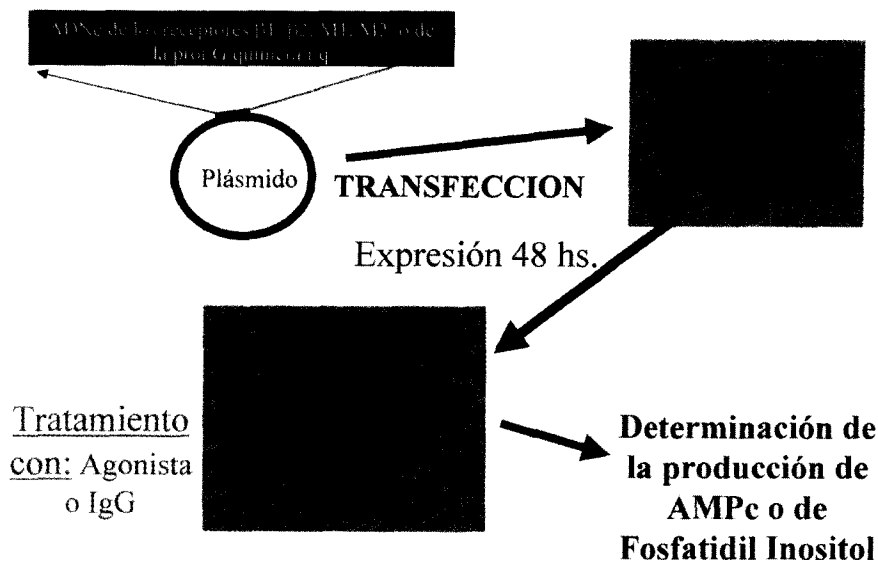


Fig. 1. Esquema de la transfección de las células COS7 con los ADNc que codifican para los receptores autonómicos cardíacos. El ADNc de los receptores autonómicos y de la proteína G i/q es incorporado a un plásmido con el cual son transfectadas las células. Durante un período de 48 horas, los receptores son sintetizados por las células y se expresan a nivel de la membrana celular. Los transfectantes ricos en un receptor determinado se emplean para evaluar los efectos de agonistas o de la IgG sobre la producción de AMPc o de PI.

que contenía el ADNc que codifica para el receptor β_1 -adrenérgico humano, y pSVL, con el ADNc que codifica para el receptor β_2 -adrenérgico de rata (provistos por el Dr. Jurgen, National Institute of Health, Maryland, Estados Unidos) y 2) los vectores de expresión pCEFL, que contenían el ADNc del receptor M_1 colinérgico, OB, con el gen del receptor M_2 colinérgico, y pCDNA1, con el gen de la proteína Gi/q (quimera de las proteínas Gq y Gi) (donados por el Dr. Gutkind, National Institute of Health, Maryland, Estados Unidos). (15) Como control de transfección se utilizó el plásmido de expresión pCMV con el gen de la β galactosidasa. (16) Los plásmidos se amplificaron en cultivo de *Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene) y se purificaron en columnas de cromatografía Quiagen Maxiprep Kits, antes de ser utilizados para transfectar las células COS7. (17)

Cultivo de células COS7 y transfección. Las células COS7 (18, 19) se cultivaron en medio de cultivo Eagle Dulbecco modificado (D-MEM), con 10% (v/v) de suero fetal bovino (D-MEM/FCS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se colocaron en placas de cultivo de 60 mm para obtener una densidad de 1×10^6 células/placa. El día de la transfección se aspiró el medio y se lo reemplazó por 4 ml de medio que contenía 100 μ M de cloroquina, 250 μ g/ml de DEAE-dextrano y 1 μ g del plásmido de expresión seleccionado. Se incubó durante 2 horas a 37°C, luego se aspiró y se agregó un tampón fosfato (PBS) al 10% (v/v) con dimetil sulfóxido. Las células se lavaron de inmediato con PBS y se incubaron durante 48 horas en 4 ml de medio completo D-MEM/FCS. Doce horas antes de la determinación de la concentración de AMPc o de PI se cambió el medio por otro sin suero. Cuando se

transfectó con el plásmido control pCMV, la actividad de la β galactosidasa se midió por una reacción colorimétrica. La eficiencia de la transfección fue del 75%.

Determinación de la concentración intracelular de AMPc. La determinación de la concentración intracelular de AMPc (20) se realizó en células COS7 transfectadas con los genes que codifican para los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos y que presentaron un porcentaje de confluencia del 90%. Doce horas antes de la determinación, se hambreadon las células incubándolas en medio sin suero y lavándolas dos veces con PBS para incubarlas luego en 2 ml de PBS suplementado con inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, 10 μ M. La expresión correcta de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos y el acoplamiento al sistema de transducción de señales se evaluó por el aumento en la producción de AMPc en las células transfectadas con esos receptores, en respuesta a la estimulación con concentraciones crecientes de isoproterenol y comparándolo con el obtenido en células transfectadas con el gen de la β galactosidasa (Figura 2). Para construir las curvas del efecto de las fracciones IgG en función del tiempo, los cultivos se incubaron durante 5, 30 y 60 minutos a una concentración final de 1:50. Cuando se realizaron curvas del efecto de las IgG en función de la concentración, se utilizaron diluciones al 1:100, 1:50 y 1:25. Se tomaron alícuotas de 500 μ l, que fueron liofilizadas y luego diluidas en 100 μ l de tampón tris-EDTA. Se determinó la concentración de AMPc utilizando un *kit* comercial marcado con tritio [3 H]cAMP (Diagnostic Products Corporation) basado sobre el principio de competencia con una proteína que reconoce y se une al AMPc, manteniendo esta proteína y el [3 H]cAMP constantes y agregando cantidades crecientes de

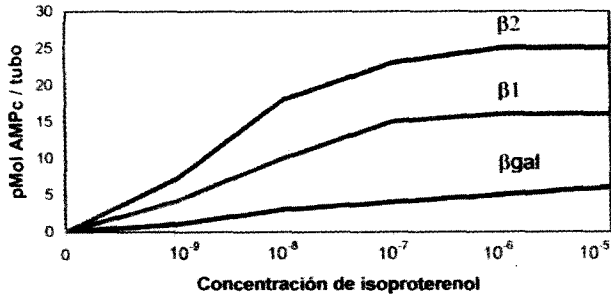


Fig. 2. Efecto de concentraciones crecientes de isoproterenol sobre la producción de AMPc en células COS7 transfectadas con los genes de la β galactosidasa (β Gal) y de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos. El isoproterenol activa la producción de AMPc en las células transfectadas con los genes de los receptores β -adrenérgicos pero no en las células transfectadas con el gen de la β Gal (control negativo). El aumento en la producción de AMPc es proporcional a la concentración molar de isoproterenol y los niveles alcanzados dependen de la densidad de los receptores autonómicos expresados en las células transfectadas.

AMPc sin marcar. Con los valores obtenidos se construyó una curva de calibración a partir de la cual la producción de AMPc para determinar en las muestras (AMPc marcado) se expresó en pMol AMPc / tubo.

Determinación de la producción de fosfatidilinositol. La transducción de señales del receptor M_2 colinérgico (17, 18) se hace, primordialmente, a través de la subunidad α inhibitoria (α_i) de la proteína G, que actúa sobre la adenilatoclasa para producir una disminución del AMPc, y de la activación de los canales de potasio. Sin embargo, la disminución del AMPc es difícil de cuantificar, ya que primero se debería activar el sistema de la adenilatoclasa con un agonista betaadrenérgico y luego inhibirlo con un agonista colinérgico o, para los propósitos de nuestro estudio, con las fracciones IgG que contengan anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico. Pero para ello se deben tener en cuenta no sólo las concentraciones de ambos agonistas, sino también la duración del efecto de cada uno y la posible desensibilización de los receptores inducida por ellos, factores que afectan la confiabilidad de las mediciones. La transducción de señales del receptor M_1 colinérgico se hace principalmente a través de la subunidad α_q de la proteína G, que activa a la fosfolipasa C, con lo cual se incrementa la producción de diacilglicerol y de PI como segundos mensajeros. Decidimos utilizar una quimera de las subunidades α_i y α_q de la proteína G, que contiene la porción aminoterminal de la subunidad α_i (que es activada por el receptor M_2) y los últimos cinco aminoácidos de la subunidad α_q (que son los que interactúan con el efector). Con el empleo de células COS7 cotransfectadas con el gen correspondiente al receptor M_2 colinérgico y la proteína G quimera i/q, es posible activar el receptor M_2 colinérgico y medir el aumen-

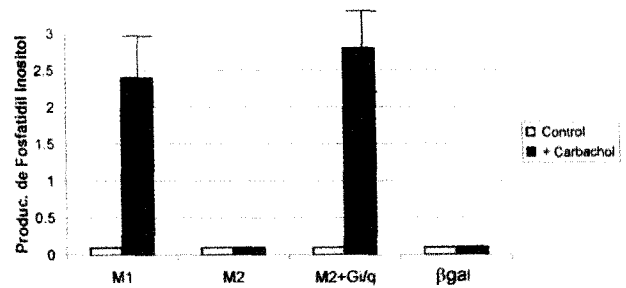


Fig. 3. Efecto del agonista colinérgico carbachol sobre la producción de PI en células COS7 transfectadas con el ADNc de los receptores M_1 y M_2 colinérgicos y cotransfectadas con el ADNc del receptor M_2 colinérgico y de la proteína Gi/q. El agonista colinérgico aumenta la producción de PI en las células transfectadas con el gen del receptor M_1 colinérgico, pero no en aquellas que contienen el gen del receptor M_2 colinérgico o el de la β Gal (control negativo). Sin embargo, en las células cotransfectadas con los genes del receptor M_2 colinérgico y de la proteína Gi/q, el carbachol estimula la producción de PI en forma ostensible.

to de PI. Para evaluar el acoplamiento correcto del sistema, las células cotransfectadas se incubaron con carbachol (agonista de los receptores colinérgicos) 100 μ M, se midió el aumento de PI y se comparó con el obtenido con el mismo agonista en células transfectadas sólo con el receptor M_1 colinérgico (control positivo) y con el gen de la β galactosidasa (control negativo) (Figura 3).

Cultivos subconfluentes de células COS7 transfectadas con el ADNc del receptor M_1 (control positivo) o cotransfectadas con el ADNc del gen del receptor M_2 y la proteína Gi/q se incubaron hasta el equilibrio (24 horas) en medio con 2 μ Ci/ml de $myo[^3H]$ inositol (20 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemical Inc). Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se incubaron por 20 minutos en medio D-MEM sin suero con LiCl 10 mM. Luego se agregó carbachol o la fracción IgG de un control o de un paciente (concentración final 1:50) y se incubó por una hora a 37°C. Finalmente, el medio se aspiró y se detuvo la reacción con 0,5 ml de NaOH 0,1 M y se incubó nuevamente a 37°C por una hora. Esta solución alcalina se neutralizó con 0,25 ml de ácido fórmico 0,2 M. La fracción de PI se aisló por cromatografía de intercambio iónico y se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía. Los pacientes fueron informados acerca de las características del estudio y prestaron su conformidad por escrito.

Análisis estadístico

Para establecer la significación estadística de los cambios en la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos inducidos por las diferentes intervenciones

se utilizaron pruebas ANOVA y de Tukey, y para comparar los resultados entre los grupos, la prueba MANOVA (Software Statistica 5.1/97).

Los efectos de las fracciones IgG sobre la producción de AMPc en las células transfectadas con los genes de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos se evaluaron mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Dunns). Para el análisis de los cambios en la producción de PI en las células cotransfectadas con los genes del receptor M_2 colinérgico y la proteína Gi/q se empleó la prueba de Mann-Whitney *rank sum*. Se consideraron significativas las diferencias con un nivel de probabilidad $p < 0,05$.

RESULTADOS

La prevalencia de anticuerpos antirreceptores autonómicos en relación con las arritmias cardíacas

En la Figura 4 se muestra el efecto cronotrópico de las fracciones IgG de los 46 pacientes y de los 10 controles sanos en los cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas. Las fracciones IgG de los controles sanos no indujeron cambios ostensibles. En marcado contraste, las fracciones IgG de los pacientes con arritmias ventriculares incrementaron de manera notable la frecuencia de latidos y las de los pacientes con disfunción sinusal desarrollaron una acción depresora pronunciada del cronotropismo. El promedio de la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos expuestos a las fracciones IgG de los pacientes con arritmias ventriculares y disfunción sinusal fue similar al que se obtuvo con las fracciones IgG de los voluntarios sanos. No obstante, la dispersión de los valores fue mucho mayor en este grupo que en los restantes, hecho que se podría atribuir a la presencia de anticuerpos con acción depresora o estimulante de la actividad cronotrópica de los cardiomiocitos, respectivamente (véase más adelante), y al número reducido de pacientes que presentaban ambos tipos de anomalías eléctricas.

En la Figura 5 se muestra la prevalencia de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico en los cuatro grupos, de acuerdo con los efectos cronotrópicos de las fracciones IgG antes de la exposición a la atropina y al propranolol y después de ella. En los voluntarios sanos no se detectaron anticuerpos antirreceptores autonómicos. Los pacientes con arritmias ventriculares presentaron una prevalencia elevada de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (75%; $p < 0,001$ en comparación con los grupos II y IV) y relativamente baja de anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico (10,7%; $p < 0,05$ en comparación con el grupo IV). En marcado contraste, los pacientes con disfunción sinusal presentaron una prevalencia elevada de anticuerpos antirrecep-

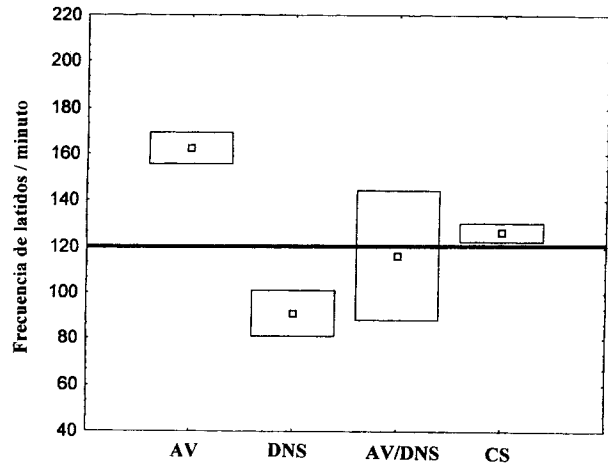


Fig. 4. Efectos cronotrópicos de las fracciones IgG sobre los cardiomiocitos de ratas neonatas. Los cuadrados pequeños representan el promedio de la frecuencia de latidos y los rectángulos grandes, el error estándar. AV: Arritmias ventriculares. DNS: Disfunción del nódulo sinusal. AV/DNS: Arritmias ventriculares y disfunción sinusal. CS: Controles sanos. La línea horizontal al nivel de 122 latidos/minuto corresponde al promedio de la frecuencia basal de los cardiomiocitos. Para su descripción, véase el texto.

tor M_2 colinérgico (76,9%; $p < 0,001$ en comparación con los grupos I y IV) y una prevalencia baja de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (15,4%; $p < 0,10$ en comparación con el grupo IV). Por lo tanto, la prevalencia de los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos en los pacientes con arritmias ventriculares y de los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico en los pacientes con disfunción sinusal fue claramente mayor que en los controles sanos. Ade-

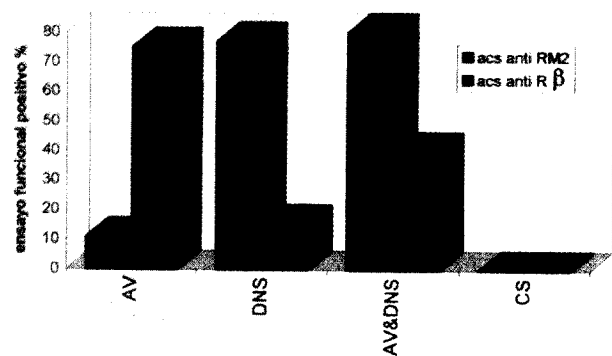


Fig. 5. Prevalencia de anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico en los cuatro grupos, evaluados por los efectos de las fracciones IgG sobre el cronotropismo de los cardiomiocitos de ratas neonatas, antes del agregado de atropina y propranolol y después de él. Las barras representan los porcentajes de las fracciones IgG que contenían anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (en azul) o M_2 colinérgico (en púrpura). acs anti- RM_2 : Anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico. acs anti- $R\beta$: Anticuerpos antirreceptor betaadrenérgico. Para el resto de las abreviaturas, véase la Figura 4. Véase el texto para su descripción detallada.

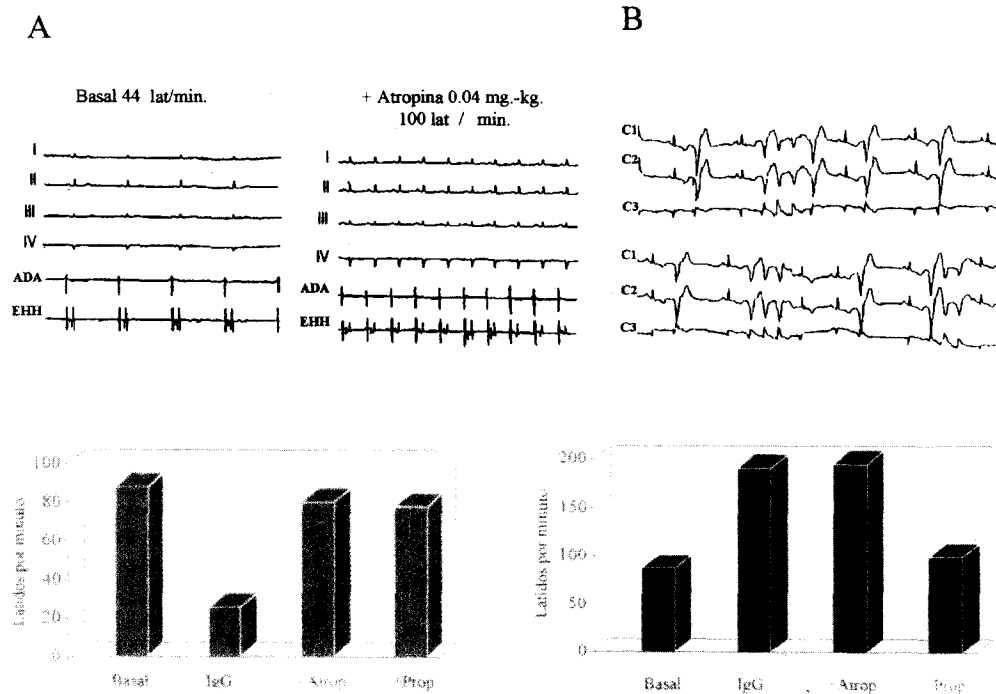


Fig. 6. Correlación entre los hallazgos electrocardiográficos (arriba) y los efectos cronotrópicos *in vitro* de las fracciones IgG (abajo) de un paciente con disfunción sinusal primaria "pura" (A) y de otro paciente con miocardiopatía crónica chagásica, arritmias ventriculares y función sinusal normal (B). En A se muestra un registro simultáneo de las derivaciones I, II, III y IV y los electrogramas de la aurícula derecha alta (ADA) y del haz de His (EHH). En B se muestran tres derivaciones simultáneas de un registro ECG Holter (C1, C2, C3). Las barras representan la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos. Atrop: Atropina. Prop: Propranolol. Para su descripción, véase el texto.

más, la prevalencia de los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos fue mucho mayor en los pacientes con arritmias ventriculares que en los que presentaban disfunción sinusal y la situación inversa se observó en relación con los anticuerpos antirreceptores M_2 colinérgicos. Por otra parte, en los pacientes con arritmias ventriculares y disfunción sinusal, la prevalencia de anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico (80%) fue similar a la hallada en los pacientes con disfunción sinusal (76,9%), mientras que la prevalencia de los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (40%) fue intermedia entre los valores encontrados en los pacientes con arritmias ventriculares (75%; $p \leq 0,10$, ns) o con disfunción sinusal "pura" (15,4%; $p \leq 0,30$, ns).

En la Figura 6 se correlacionan los hallazgos electrocardiográficos con los efectos cronotrópicos *in vitro* de las fracciones IgG de dos pacientes: uno con una disfunción sinusal idiopática "pura" (A) y el otro con extrasístoles ventriculares frecuentes y repetitivas de etiología chagásica y función sinusal normal (B). En el paciente con disfunción sinusal (Figura 6A), la bradicardia sinusal se corrigió con la administración endovenosa de atropina. El efecto cronotrópico de la fracción IgG de ese paciente sobre el cultivo de cardiomiocitos antes del agregado de atropina y después de él fue concordante con los hallazgos clíni-

cos. La lentificación pronunciada de la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos inducida por la fracción IgG fue neutralizada por completo por la atropina, hecho que indica la presencia de anticuerpos circulares antirreceptor M_2 colinérgico.

En la parte superior de la Figura 6B, una tira seleccionada de un registro electrocardiográfico de Holter muestra las características de la ectopia ventricular. La fracción IgG de este paciente tuvo un efecto cronotrópico positivo marcado sobre el cultivo de cardiomiocitos, que fue abolido por el propranolol, evidencia de la presencia de anticuerpos circulantes antirreceptores β -adrenérgicos.

El análisis individual de los efectos de las fracciones IgG reveló un espectro amplio de cambios cronotrópicos, tanto cuantitativos como cualitativos, atribuibles a una contribución variable de los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico, en cada caso particular (véase más adelante).

Es de destacar que los efectos cronotrópicos de las fracciones IgG de 9 pacientes con anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos y de 2 pacientes con anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico fueron suprimidos en forma parcial por los bloqueantes de los receptores correspondientes. Este hecho no se puede atribuir a una concentración insuficiente del

bloqueador del receptor autonómico en el medio porque concentraciones de atropina y propranolol mayores de 1 μ M produjeron un efecto tóxico sobre los cardiomiocitos, con ausencia total de actividad cronotrópica o aparición de un ritmo lento e irregular. Por lo tanto, la persistencia de un efecto cronotrópico leve o moderado, pero significativo, después del agregado de atropina o propranolol sugeriría la presencia de anticuerpos que podrían actuar sobre otros receptores de la membrana y/o sobre canales iónicos que influyen sobre el cronotropismo de los cardiomiocitos.

El efecto cronotrópico de los anticuerpos inmunopurificados

Los resultados que se obtuvieron del análisis de los efectos de las fracciones IgG y de sus modificaciones luego de la exposición a la atropina y el propranolol indican, de manera indirecta, la presencia de anticuerpos que estimulan específicamente a los receptores M_2 colinérgicos y/o β -adrenérgicos. Para obtener una evidencia más directa y validar estos hallazgos, se inmunopurificaron anticuerpos antirreceptores β_1 -adrenérgico o M_2 colinérgico de las fracciones IgG de 10 casos seleccionados y los efectos cronotrópicos de esos anticuerpos y de la fracción *flow through* IgG se evaluaron en el mismo sistema *in vitro*.

En la totalidad de los casos, los resultados que se obtuvieron en los cultivos de cardiomiocitos con los anticuerpos inmunopurificados fueron concordantes con los que se hallaron cuando se emplearon las fracciones IgG del suero. En la Figura 7 se muestra el efecto cronotrópico de la fracción IgG de un paciente con miocardiopatía crónica chagásica, arritmias ventriculares y disfunción sinusal en comparación con el de los anticuerpos antirreceptor M_2

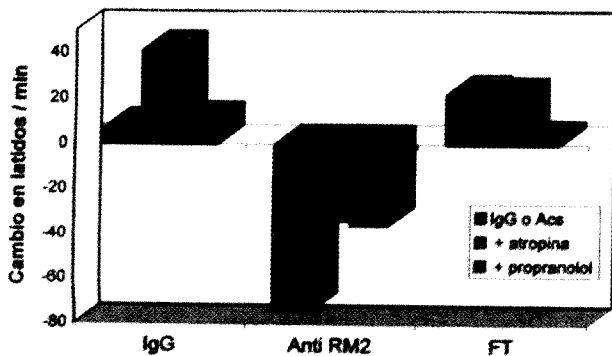


Fig. 7. Efecto cronotrópico de la fracción IgG, de los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico inmunopurificados (anti-RM₂) y de la fracción *flow-through*-IgG (FT) de un paciente chagásico con arritmias ventriculares y disfunción sinusal, antes del agregado de atropina y propranolol y después de él. Acs: Anticuerpos. Véase el texto para su descripción detallada.

colinérgico inmunopurificados y la fracción *flow through* IgG (obtenidos de la fracción IgG del mismo paciente), antes del agregado de atropina y propranolol y después de él. La fracción IgG no modificó la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos. Sin embargo, el agregado de atropina develó un efecto cronotrópico positivo muy marcado que fue abolido por el propranolol. Estos hallazgos indican la coexistencia de anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico y antirreceptores β -adrenérgicos. Los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico inmunopurificados de esa fracción IgG desarrollaron una acción cronotrópica negativa intensa, que fue antagonizada por la atropina, mientras que la fracción *flow through* IgG (que contenía anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos) tuvo un efecto cronotrópico positivo que fue suprimido por el propranolol. De esta manera, se confirmó que la fracción IgG de ese paciente tenía, en efecto, ambos tipos de anticuerpos antirreceptores autonómicos, cuyos efectos cronotrópicos se neutralizaban.

Los efectos bioquímicos de los anticuerpos antirreceptores autonómicos. Modificación de la producción de segundos mensajeros

Los resultados de los efectos bioquímicos de las fracciones IgG de 9 pacientes del grupo I (que contenían anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos), de 6 pacientes del grupo II (con anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico) y 2 pacientes del grupo III (una con ambos tipos de anticuerpos y otra con anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos) en comparación con los de las fracciones IgG de 3 controles sanos se resumen en la Figura 8. Las fracciones IgG de estos últimos no modificaron la producción de los segundos mensajeros. Las fracciones IgG de los pacientes con arritmias ventriculares incrementaron en forma ostensible la producción de AMPc en las

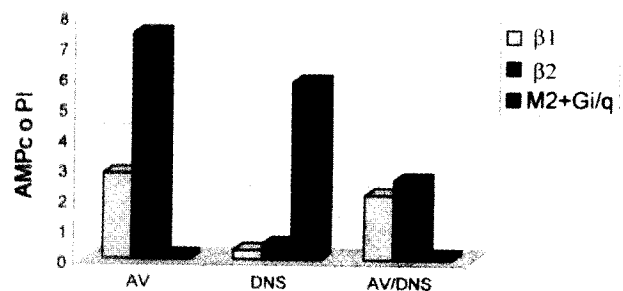


Fig. 8. Efectos bioquímicos de las IgG de pacientes con arritmia ventricular (AV), disfunción sinusal (DNS) y ambas anormalidades (AV/DNS). El aumento en la producción de AMPc o PI se expresa en veces con respecto al promedio de los controles sanos. β_1 : Transfectantes β_1 . β_2 : Transfectantes β_2 . M_2+Gi/q : Cotransfectantes M_2 + proteína G quimera. Para los transfectantes β_1 y β_2 se midió la producción de AMPc; para los cotransfectantes M_2+Gi/q , la concentración de PI. Véase la descripción en el texto.

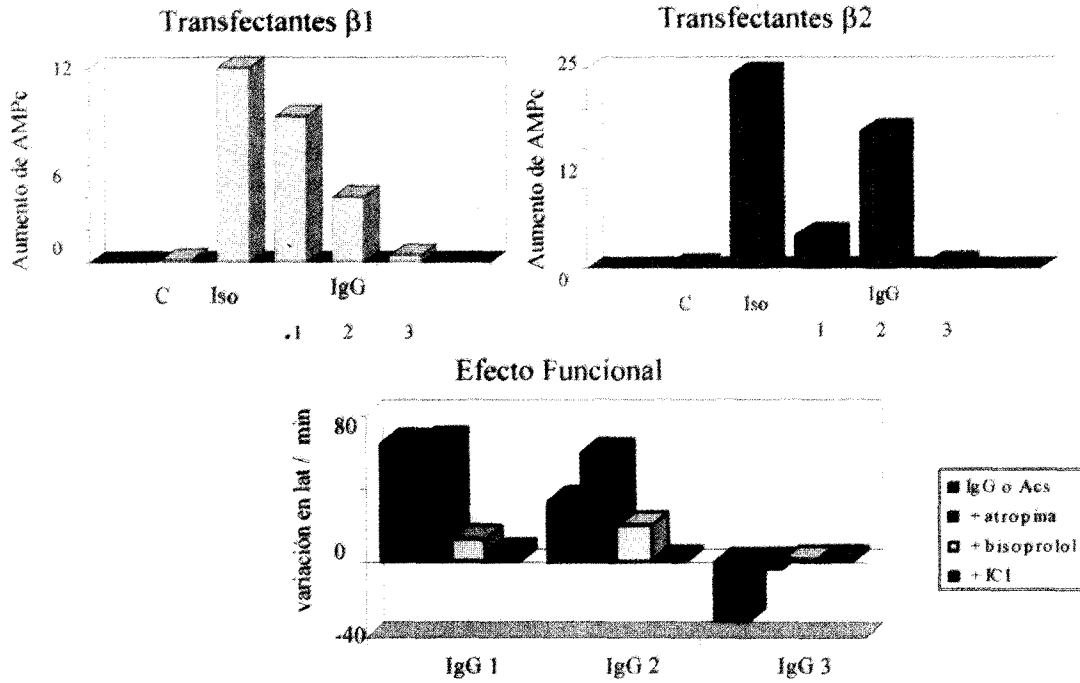


Fig. 9. Efectos del isoproterenol (Iso) y de las fracciones IgG de 2 pacientes con arritmias ventriculares y anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (IgG₁ e IgG₂) y de un paciente con disfunción sinusal y anticuerpos antirreceptor M₂ colinérgico (IgG₃) sobre la producción de AMPc en células COS7 transfectadas con los genes de los receptores β_1 (izquierda) y β_2 -adrenérgicos (derecha). C: Fracción IgG de un control sano. La IgG₁ aumenta más la producción de AMPc en las células transfectadas con el gen del receptor β_1 -adrenérgico que en las que contienen el gen del receptor β_2 -adrenérgico y lo opuesto ocurre con la IgG₂. En cambio, la IgG₃ no modifica la producción de AMPc. En la parte inferior de la figura se observan los efectos cronotrópicos de las mismas fracciones IgG antes del agregado de atropina, bisoprolol (bloqueante β_1 -adrenérgico selectivo) e ICI 118.551 (bloqueante β_2 -adrenérgico selectivo) y después de él.

células transfectadas con los receptores β_1 ($2,8 \pm 1,1$ veces *versus* $0,25 \pm 0,36$ veces en el grupo II; $p < 0,001$) o β_2 -adrenérgicos ($7,4 \pm 5,4$ veces *versus* $0,55 \pm 0,26$ veces en el grupo II; $p < 0,001$), pero no modificaron

la concentración de PI. En marcado contraste, las fracciones IgG de los pacientes con disfunción sinusal sólo indujeron un aumento del PI en cotransfectantes receptor M₂ colinérgico/proteína G i/q ($5,8 \pm 4,5$

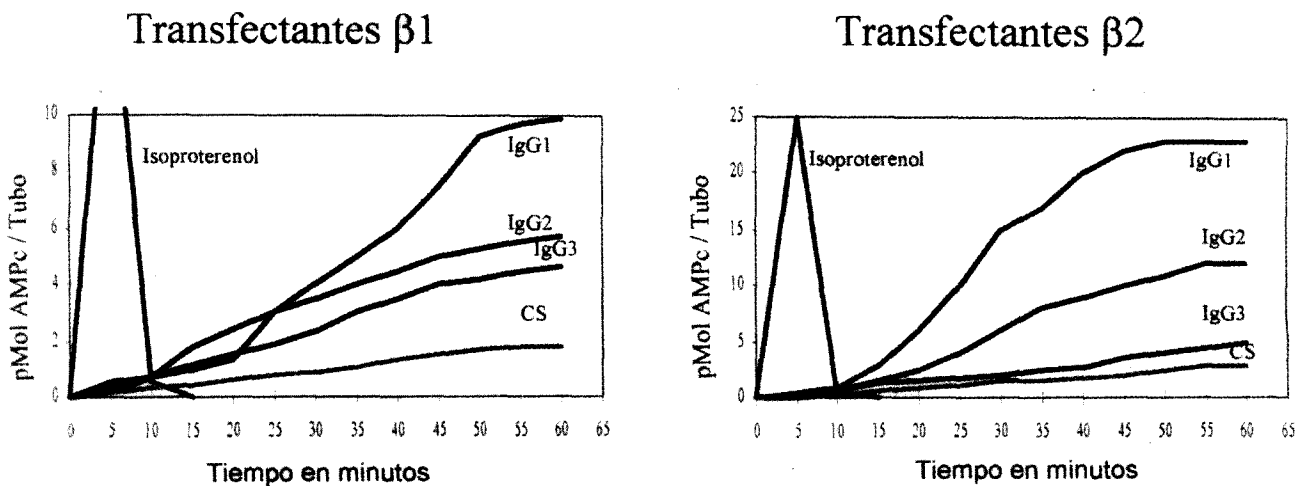


Fig. 10. Estimulación de la producción de AMPc en células COS7 transfectadas con los genes de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos, inducida por isoproterenol y por las fracciones IgG de 3 pacientes con efecto cronotrópico positivo (IgG₁, IgG₂, IgG₃) sobre los cardiomiocitos de ratas neonatas, en comparación con la fracción IgG de un control sano (CS). El isoproterenol provoca un aumento rápido pero efímero de la producción de AMPc (debido al fenómeno de desensibilización rápida de los receptores). Las IgG, en cambio, desarrollan una acción estimulante más gradual pero sostenida (ausencia de desensibilización).

veces *versus* $0,13 \pm 0,12$ en el grupo I; $p < 0,05$). Por último, en los 2 pacientes con arritmias ventriculares y disfunción sinusal sólo se observó aumento del AMPc. Estos hallazgos indican que los anticuerpos antirreceptores β_1 y β_2 -adrenérgicos estimulan el receptor correspondiente e interactúan con la proteína G_s , lo que induce un aumento en la producción de AMPc e, indirectamente, que los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico interactúan con la proteína G_i para disminuir la producción de AMPc. Ello explica los efectos de ambos anticuerpos sobre el cronotropismo de los cardiomiocitos.

En la Figura 9 se muestra el efecto de las fracciones IgG de 2 pacientes con arritmia ventricular y anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (IgG₁ e IgG₂) y de un paciente con disfunción sinusal y anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico sobre la producción de AMPc en células COS7 transfectadas con los genes de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos. La IgG₁, que contenía una proporción mayor de anticuerpos antirreceptor β_1 -adrenérgico que de anticuerpos antirreceptor β_2 -adrenérgico, estimuló mucho más la producción de AMPc en las células COS7 transfectadas con el gen del receptor β_1 -adrenérgico. En cambio, la IgG₂, con una proporción mayor de anticuerpos antirreceptor β_2 -adrenérgico, indujo un incremento más marcado de la producción de AMPc en las células COS7 transfectadas con el gen del receptor β_2 -adrenérgico. La IgG₃, por su parte, al igual que la IgG de un control sano, no modificó la concentración de AMPc. La estimulación de los receptores β -adrenérgicos que producen los anticuerpos, evaluada a través del incremento en la producción de AMPc, es persistente, al contrario de lo que ocurre con el isoproterenol (Figura 10). Ello indica que los anticuerpos no inducen el fenómeno de desensibilización rápida de los receptores, que es característico de los agonistas, hecho que contribuiría a potenciar sus efectos funcionales y miocardiopáticos (véase más adelante).

En la Figura 11 se ilustran los efectos cronotrópicos y bioquímicos (sobre la producción de PI en células COS7 transfectadas con los genes del receptor M_2 colinérgico y de la proteína G_i/q) de las fracciones IgG de 2 pacientes con disfunción sinusal (IgG₁ e IgG₂) y de uno con arritmia ventricular (IgG₃). La IgG₁ contenía sólo anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico, la IgG₂ contenía anticuerpos antirreceptores M_2 colinérgico y β -adrenérgicos y la IgG₃, sólo anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos. La IgG₁ y la IgG₂, al igual que el agonista colinérgico carbachol, estimularon en forma marcada la producción de PI. La IgG₃, en cambio, careció de efecto sobre la concentración de este segundo mensajero. Estos cambios indican, de manera indirecta, que la IgG₁ y la IgG₂ estimularon al receptor M_2 colinérgico, he-

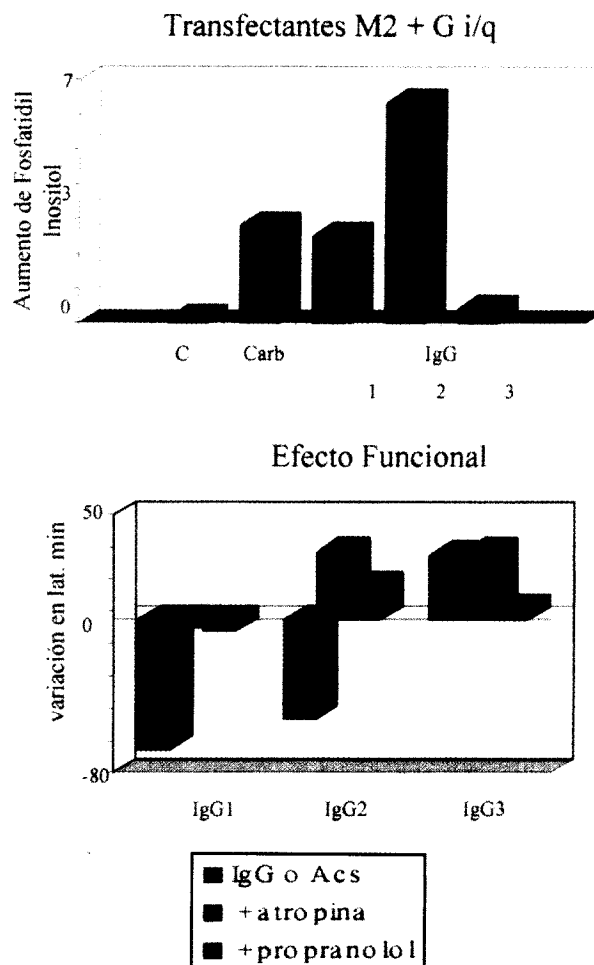


Fig. 11. Efectos cronotrópicos (izquierda) y sobre la producción de PI en células cotransfectadas con los genes del receptor M_2 colinérgico y de la proteína G_i/q (derecha) de las fracciones IgG de 2 pacientes con disfunción sinusal y anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico (IgG₁ e IgG₂) y de un paciente con arritmia ventricular y anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos (IgG₃). La IgG₁ y la IgG₂ redujeron en forma muy acentuada la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos, efecto que fue antagonizado por la atropina; la IgG₃ tuvo un efecto cronotrópico positivo, que fue neutralizado por el propranolol. Las fracciones IgG₁ e IgG₂, al igual que el agonista colinérgico carbachol, indujeron un aumento importante en la producción de PI; la fracción IgG₃, en cambio, careció de efectos sobre la producción del segundo mensajero. C: Fracción IgG de un control sano.

cho que se debería traducir en una disminución en la producción de AMPc.

DISCUSION

Nuestros resultados muestran una correlación estrecha entre la presencia de anticuerpos circulantes antirreceptores β -adrenérgicos y las arritmias ventriculares que ocurren en el contexto de las miocardiopatías dilatada idiopática y crónica chagásica o en corazones sin anomalías estructurales, así como entre la presencia de anticuerpos circulantes antirreceptor M_2 colinérgico y la disfunción sinusal

primaria o de etiología chagásica. También es evidente que los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos son poco frecuentes en los pacientes sin arritmias ventriculares y que otro tanto ocurre con los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico en los pacientes con función sinusal normal. Por otra parte, los anticuerpos circulantes antirreceptor M_2 colinérgico son raros en los pacientes con arritmias ventriculares "puras" (sin compromiso simultáneo de la función sinusal), mientras que los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos están presentes sólo por excepción en los pacientes con disfunción sinusal "pura" (sin arritmias ventriculares concomitantes).

Como se describió, las fracciones IgG de algunos pacientes contienen tanto anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos como antirreceptor M_2 colinérgico, que estimulan los receptores correspondientes y cuyos efectos funcionales sobre las células miocárdicas pueden neutralizarse mutuamente en proporciones variables. Cuando el efecto cronotrópico de la fracción IgG es neutro, se podría anticipar que los anticuerpos no deberían desarrollar ninguna acción arritmogénica potencial, lo que invalidaría la relación entre anticuerpos y arritmias, al menos en algunos pacientes. Sin embargo, es razonable postular que el efecto funcional neto de las fracciones IgG circulantes sobre el tejido miocárdico puede depender no sólo de la concentración relativa de cada tipo de anticuerpo antirreceptor autonómico, sino también de la densidad relativa de receptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico presentes en diferentes sectores del corazón. Así, las acciones funcionales de los anticuerpos antirreceptor M_2 colinérgico deberían prevalecer en los nódulos sinusal y AV, que poseen una rica inervación colinérgica y una elevada densidad de receptores colinérgicos. De hecho, se ha establecido que la acción inhibitoria de la estimulación vagal sobre el nódulo sinusal predomina sobre la estimulación simpática cuando ambos sistemas son activados en forma simultánea. (21-23) Por el contrario, los efectos funcionales de los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos deberían predominar en el ventrículo, donde prevalecen la inervación y los receptores β -adrenérgicos. (24) De acuerdo con este criterio, la presencia simultánea de ambos tipos de anticuerpos antirreceptores autonómicos que ha sido demostrada en pacientes con miocardiopatía crónica chagásica (14) puede explicar la coexistencia tan frecuente de disfunción sinusal y arritmias ventriculares complejas (dos de los hallazgos clínicos más comunes y llamativos de esta enfermedad), al igual que el hecho de que la frecuencia cardíaca suele ser relativamente baja en los pacientes chagásicos con insuficiencia cardíaca. Es de destacar que en un artículo reciente, Matsui y colaboradores (25) mostraron que conejos inmunizados

en forma simultánea con los péptidos correspondientes al segundo bucle extracelular de los receptores β_1 -adrenérgico y M_2 colinérgico desarrollan una miocardiopatía con hipertrofia ventricular izquierda, infiltrados inflamatorios de intensidad moderada y fibrosis intersticial leve a moderada.

Efectos bioquímicos, arritmogénicos y miocardiopáticos de los anticuerpos antirreceptores autonómicos

Las pruebas funcionales que se realizaron con las fracciones IgG y los anticuerpos inmunopurificados de nuestros pacientes indican que los anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico estimulan los receptores correspondientes de la membrana de las células miocárdicas. Nuestras determinaciones bioquímicas en células COS7 transfectadas con los genes de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos mostraron que los anticuerpos que reconocen a esos receptores inducen incrementos significativos de la concentración de AMP cíclico, hallazgos que coinciden con los de una publicación reciente que empleó células CHW. (26) Por otra parte, hemos mostrado que los anticuerpos que reconocen al receptor M_2 colinérgico inducen un aumento en la producción de PI, lo que indica de manera indirecta su efecto sobre la proteína Gi. Ello concuerda con la disminución del AMP cíclico en membranas del ventrículo de rata que observaron Fu y colaboradores. (27) Es importante enfatizar que la estimulación de los receptores autonómicos por los anticuerpos es menos intensa que la que producen los agonistas pero mucho más persistente, como quedó demostrado mediante el estudio de sus efectos cronotrópicos que realizaron Magnusson y colaboradores (28) y por la hiperproducción prolongada de segundos mensajeros descrita en nuestros resultados. Las acciones "adrenérgica" y "colinérgica" de los anticuerpos podrían desempeñar un papel de primera magnitud en la fisiopatogenia de las arritmias ventriculares y de la disfunción sinusal, respectivamente, tal como lo hace la estimulación por los neuromediadores adrenérgicos y colinérgicos. Aun cuando no se han proporcionado pruebas directas de las propiedades arritmogénicas de los anticuerpos antirreceptores autonómicos, un artículo reciente de Farías de Oliveira y colaboradores (5) mostró que la fracción IgG de pacientes con miocardiopatía crónica chagásica induce bradicardia y bloqueo AV en un preparado de Langendorf de corazón de conejo. Además, Müller y colaboradores (29) describieron que las arritmias ventriculares más severas que ocurren en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y anticuerpos circulantes antirreceptor β_1 -adrenérgico se pueden prevenir por inmuoadsorción, un procedimiento que elimina los anticuerpos de la circulación por períodos prolongados.

Los anticuerpos antirreceptores autonómicos podrían desempeñar un papel en la patogenia de las arritmias cardíacas no sólo o simplemente por sus efectos estimulantes sobre los receptores correspondientes y los cambios consiguientes en las propiedades electrofisiológicas de los tejidos miocárdicos, sino provocando un daño estructural de las células miocárdicas. Matsui y colaboradores (30) describieron que la inmunización crónica (durante un año) de conejos con los péptidos sintéticos β_1 o M_2 (con la misma secuencia de aminoácidos del segundo bucle extracelular de los receptores correspondientes) induce una forma de miocardiopatía con dilatación ventricular (mucho más conspicua en el ventrículo derecho) y las características histológicas de una miocarditis crónica. En ese mismo estudio, 2 de 8 conejos inmunizados con el péptido β_1 murieron en forma súbita, hecho que sugiere un mecanismo arritmico. Por otra parte, los efectos miocardiopáticos de la inmunización con los péptidos β_1 y M_2 se pueden prevenir con el tratamiento simultáneo con metoprolol en el primer caso, o con otenzepad en el segundo (Fu M, comunicación personal). En dos artículos recientes, se mostró que la inmuoadsorción produce una mejoría notable de la función ventricular y de las dimensiones del ventrículo izquierdo en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática, insuficiencia cardíaca y anticuerpos circulantes antirreceptor β_1 -adrenérgico. (31, 32) El efecto benéfico de la inmuoadsorción persiste hasta que los anticuerpos reaparecen en la circulación.

La naturaleza del trastorno inmunológico responsable de la aparición de los anticuerpos antirreceptores autonómicos

Evidencias experimentales incuestionables indican que, en condiciones apropiadas, los receptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgicos pueden ser inmunogénicos. (30, 33) Sin embargo, los factores que desencadenan la anormalidad inmunorregulatoria que compromete a los receptores autonómicos en las cardiopatías se desconocen. Un estudio reciente de Kaplan y colaboradores (34) arrojó luz sobre la naturaleza de los anticuerpos que reconocen y estimulan los receptores autonómicos cardíacos en pacientes con miocardiopatía crónica chagásica. Los anticuerpos dirigidos contra una proteína ribosómica P de *Trypanosoma cruzi* también reaccionan con el receptor β_1 -adrenérgico y lo estimulan. Este hecho se atribuyó a la presencia de una porción de residuos acídicos (EEEDDD) en el péptido R13 del parásito, que es homólogo a un epítipo del segundo bucle extracelular del receptor β_1 -adrenérgico (AESDE). Por lo tanto, los anticuerpos que reconocen y estimulan los receptores autonómicos de la membrana de las células miocárdicas pueden estar, al menos

en parte, dirigidos contra antígenos de un agente infeccioso y ser independientes de una reacción autoinmune que compromete a los receptores β -adrenérgicos y M_2 colinérgico.

IMPLICACIONES

Los resultados de nuestro estudio permiten entrever un nexo patogénico entre los anticuerpos antirreceptores autonómicos cardíacos y las arritmias que ocurren en el contexto de cardiopatías en las cuales existen alteraciones de la inmunorregulación. Este nuevo concepto puede conducir al desarrollo de investigaciones que mejoren nuestros conocimientos sobre la etiología y la fisiopatología de las arritmias cardíacas, con eventuales derivaciones para su tratamiento.

La arritmogenicidad de los anticuerpos aún se debe demostrar en forma fehaciente a través de nuevas investigaciones clínicas y experimentales. La posible presencia de otros anticuerpos con efectos funcionales sobre las células miocárdicas, sugerida en este estudio, debería estimular investigaciones tendientes a identificar su naturaleza molecular.

SUMMARY

PREVALENCE AND FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS ON ANTI-AUTONOMIC CARDIAC RECEPTOR ANTIBODIES IN PATIENTS WITH VENTRICULAR ARRHYTHMIAS AND RENAL FAILURE

Background

Anti- β adrenergic and anti- M_2 -cholinergic receptor antibodies have been demonstrated in various heart diseases. The relationship between the arrhythmias occurring in those heart diseases and the antibodies as well as the functional and biochemical effects of the antibodies have not been systematically investigated.

Objectives

To assess the prevalence as well as the functional and biochemical effects of the circulating antiautonomic membrane receptor antibodies (AARAb) in patients with cardiac arrhythmias.

Methods

Four groups of individuals were studied. Group I: 28 patients with ventricular arrhythmias. Group II: 13 patients with sinus node dysfunction. Group III: 5 patients with both ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. Group IV: 10 healthy controls. The chronotropic effects of the IgG fractions were assessed on cultured neonatal rat cardiomyocytes before and after exposure to atropine and

propranolol to detect of anti-M₂-cholinergic and/or anti-β-adrenergic receptor antibodies. In 10 selected cases, immunopurified anti-β₁-adrenergic receptor or anti-M₂-cholinergic receptor antibodies were obtained and their chronotropic effects were explored in the same experimental set-up. The biochemical effects of the IgG from 17 patients (group I: 9 patients; group II: 6 patients; group III: 2 patients) and 3 healthy controls were assessed on COS7 cells transfected with genes encoding for β₁ and β₂ adrenergic receptors (by the increment in cAMP) and M₂ cholinergic receptors (by the increment in phosphatidylinositol: PI).

Results

IgG from healthy controls had no chronotropic effects and, accordingly, AARAb were not detected. The IgG from the group I patients exerted a positive chronotropic action, with a high prevalence of anti-β-adrenergic receptor antibodies (75%) and a low prevalence of anti-M₂-cholinergic receptor antibodies (10.7%). In contrast, the IgG from group II patients had a depressing chronotropic effect, with a high prevalence of anti-M₂ cholinergic receptor antibodies (76.9%) and a low prevalence of anti-β-adrenergic receptor antibodies (15.4%). No significant chronotropic effects were elicited by the IgG from group III patients, but a high prevalence of anti-M₂ cholinergic receptor antibodies (80%) and an intermediate prevalence of anti-β-adrenergic receptor antibodies (40%) could be demonstrated. The study of the chronotropic effect of the immunopurified antibodies was confirmed the results obtained with the corresponding IgG fractions. In agreement with the results of the functional tests, the IgG from group I patients induced a clear-cut and long-lasting increment of cAMP but no of PI, whereas the IgG from group II patients evoked a marked augmentation of PI without affecting cAMP production.

Conclusions

Our results demonstrate a strong correlation between anti-β-adrenergic receptor antibodies and ventricular arrhythmias (primary or due to Chagas' heart disease or idiopathic dilated cardiomyopathy) as well as between anti-M₂-cholinergic receptor antibodies and sinus node dysfunction (primary or due to Chagas' heart disease). Anti-M₂-cholinergic receptor antibodies are uncommon in patients with ventricular arrhythmias (unless there is a concomitant involvement of sinus node) and anti-β-adrenergic receptor antibodies are uncommon in patients with "pure" sinus node dysfunction. It was also demonstrated that the AARAb exert a stimulating action on the corresponding receptors. Anti-β-adrenergic receptor antibodies

increase and anti-M₂ adrenergic receptor antibodies inhibit cAMP production. These findings may open new ways towards the knowledge of the etiology and pathophysiology of ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction and may possess important therapeutic implications.

Key words Chagas' heart disease - Idiopathic dilated cardiomyopathy - Primary ventricular arrhythmias - β-adrenergic receptors - M₂-cholinergic receptor - Propranolol - Atropine

Agradecimientos

Expresamos nuestro reconocimiento a los Dres. Ulises Questa, por el análisis estadístico, a Silvio Gutkind y Omar Coso por su colaboración y asesoramiento en los estudios bioquímicos y a la Sra. Cecilia Mc Keon por su ayuda en la confección del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. Wallukat G, Moewinski M, Kowal K y col. Autoantibodies against the β-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: β-adrenergic agonism without desensitization. *Eur Heart J* 1991; 12 (Suppl D): 178-181.
2. Rosenbaum MB, Chiale P, Schejtman D y col. Antibodies to β-adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; 5: 367-375.
3. Chiale PA, Rosenbaum MB, Elizari MV y col. High prevalence of antibodies against β₁ and β₂ adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 864-869.
4. Ferrari I, Levin MJ, Elizari MV y col. Cholinergic autoantibodies in sinus node dysfunction. *Lancet* 1997; 350 (9073): 262-263.
5. Fariás de Oliveira S, Pedrosa RC, Nascimento JHM y col. Sera from chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. *Circulation* 1997; 96: 2031-2037.
6. Coumel P, Rosengarten MD, Leclercq JF y col. Role of sympathetic nervous system in non-ischaemic ventricular arrhythmias. *Br Heart J* 1982; 47: 137-147.
7. Zipes DP, Martins JB, Ruffey R y col. Role of the autonomic nervous system in the genesis of ventricular arrhythmias. *En: Rosenbaum MB, Elizari MF. Frontiers of cardiac electrophysiology. The Hague, Martinus Nijhoff* 1983; pp 522-551.
8. Randall WC, Aredell JL. Differential innervation of the heart. *En: Zipes DP, Jalife J. Cardiac electrophysiology and arrhythmias. Orlando, Grunne & Stratton, Inc* 1985; pp 137-144.
9. Gang ES, Oseran DS, Mandel WJ. Sinus node electrogram in patients with the hypersensitive carotid sinus syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 1484-1490.
10. Paci A, Neglia D, Cirimboli S y col. Anti-β-receptor antibodies in dilated cardiomyopathy: Relationships with ventricular dysfunction and arrhythmias. *Circulation* 1993; 88: I-460.
11. Rosenbaum MB. Chagasic cardiomyopathy. *Prog Cardiovasc Dis* 1964; 7: 199-225.
12. Report of the WHO/ISFC. Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44: 672-674.
13. Ferrer MI. The sick sinus syndrome. *Circulation* 1973; 47: 635-641.
14. Elies R, Ferrari I, Wallukat G y col. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 1996; 157: 4203-4211.
15. Conklin BR, Farfel Z, Lustig K y col. Substitution of three aminoacids switches receptor specificity of Gqα to that of Giα. *Nature* 1993; 363: 274-276.
16. Coso O, Chiariello M, Kaliner G y col. Transforming G pro-

- tein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). The Journal of Biol Chem 1995; 270: 5620-5624.
17. Zhang S, Coso OA, Collins R y col. A C-terminal mutant of the G protein β subunit deficient in the activation of phospholipase C- β . The Journal of Biol Chem 1996; 271 (33): 20208-20212.
 18. Crespo P, Xu N, Daniotti JL y col. Signalling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-raf activation. The Journal of Biol Chem 1994; 269 (33): 21103-21109.
 19. Crespo P, Zu N, Simonds WF y col. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein- $\beta\alpha$ subunits. Nature 1994; 369: 418-420.
 20. Xu N, Bradley L, Ambdakar I. A mutant α subunit of G12 potentiate the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci 1995; 90: 6741-6745.
 21. Levy MN. Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. Circ Res 1971; 29: 437-445.
 22. Wit AL, Hoffman BF, Rosen MR. Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. IX Cardiac electrophysiologic effects of β -adrenergic receptors stimulation and blockade. Part A. Am Heart J 1975; 90: 521-533.
 23. Halpern MS, Chiale PA, Nau GJ y col. Effects of isoproterenol on abnormal intraventricular conduction. Circulation 1980; 62: 1357-1364.
 24. Homcy CJ, Vatner SF, Vatner DE. β -adrenergic receptor regulation in the heart in pathophysiologic states: Abnormal adrenergic responsiveness in cardiac disease. Ann Rev Physiol 1991; 53: 137-159.
 25. Matsui S, Katsuda M, Fu M y col. Peptides corresponding to both β_1 and muscarinic-2 receptors induced hypertrophic cardiomyopathy in rabbits. J Am Coll Cardiol 1997; 29: 955-965 (abstract).
 26. Jahn R, Baivin V, Siegmund C y col. Autoantibodies activating human β_1 -adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. Circulation 1999; 99: 649-654.
 27. Fu LX, Walluat G, Hjalmarson A y col. Agonist-like activity of anti-peptide antibodies directed against an autoimmune epitope on the heart muscarinic acetylcholine receptor. Receptors and Channels 1994; 2 (2): 121-130.
 28. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F y col. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the β -adrenoceptor with positive chronotropic effect. Circulation 1994; 89: 2760-2767.
 29. Müller J, Wallukat G, Brandes K y col. Successful therapy of idiopathic dilated cardiomyopathy by IgG immunoadsorption, results of a controlled study. J Am Coll Cardiol 1998; 31 (4): 67-A.
 30. Matsui S, Fu MLX, Katsuda S y col. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 641-655.
 31. Müller J, Wallukat G, Dandel M y col. Treatment of idiopathic dilated cardiomyopathy by IgG immunoadsorption. Circulation 1998; 98: I104 (abstract).
 32. Dörfield WV, Felix SB, Wallukat G y col. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. Circulation 1997; 95: 1994-1997.
 33. Strosberg AD. Biotechnology of beta-adrenergic receptors. Mol Neurobiol 1990; 4 (3-4): 211-250.
 34. Kaplan D, Ferrari I, López Bergami P y col. Antibodies to ribosomal P proteins of *T. cruzi* in Chagas' disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 10301-10306.